

CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Leptospira* spp. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

GUILHERME AUGUSTO ROSA¹; LIANA NUNES BARBOSA²; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE³

¹ LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – guiguilhermer.rosa@gmail.com

² LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – liana.tlo@gmail.com; grassmann.aa@gmail.com

³ LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leptospira* pertence à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (ADLER, 2015) e compreende 22 espécies descritas atualmente (PICARDEAU, 2017). As espécies patogênicas desse gênero são as responsáveis pela leptospirose, uma importante zoonose negligenciada de ocorrência mundial (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Estima-se que anualmente ocorram mais de 59 mil mortes e um milhão de casos graves de leptospirose em humanos (COSTA et al, 2015).

Embora seja um agente etiológico com importância mundial, são poucos os estudos que descrevem a microbiologia básica desse patógeno. O meio de cultura mais utilizado atualmente para o cultivo de leptospirosas é o EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) (ELLINGHAUSEN & MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON & HARRIS, 1967), sendo um meio altamente enriquecido. A partir da sua utilização, o cultivo *in vitro* de leptospirosas foi facilitado, o que permitiu que mais cepas e sorovares fossem cultivados em laboratório (ADLER, 2015).

Porém, o cultivo de leptospirosas ainda é difícil de ser realizado, sensível e fastidioso, acarretando em problemas quantitativos e qualitativos nas culturas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar o perfil de crescimento *in vitro* de espécies patogênicas do gênero *Leptospira* sob diferentes condições de cultivo, como variações de temperatura, recipientes e aeração. Os conhecimentos obtidos nesse trabalho são essenciais para aprimorar as técnicas de cultivo *in vitro* do microrganismo, expandindo os conhecimentos na área e otimizando as pesquisas em leptospirose.

2. METODOLOGIA

Dois meios de cultura EMJH foram utilizados no estudo. O meio EMJH Difco disponível comercialmente foi conforme as recomendações do fabricante. O meio EMJH++ base foi preparado conforme descrito por Grassmann et al, 2015. A composição química completa dos meios está representada na tabela 1.

Três cepas virulentas de *Leptospira* spp. foram avaliadas quanto ao seu perfil de crescimento *in vitro* e para cada condição, uma curva de crescimento bacteriano foi desenvolvida. As cepas utilizadas pertencem às espécies *L. interrogans* (cepas L1-130 e RCA) e *L. kirschneri* (cepa UFPel-61H). As seguintes condições de cultivo foram reproduzidas: i) duas temperaturas de incubação (28°C e 37°C) e ii) três

diferentes recipientes para cultivo (tubos de fundo cônico de 15ml estáticos ou com agitação em *shaker* e, frascos de cultivo celular). O inóculo inicial para a curva de crescimento bacteriano foi de 10^5 leptospiiras/ml no dia 0 da curva e, cada uma das condições testadas, foram realizadas em triplicatas. Diariamente as culturas foram contadas com auxílio de câmara de Petroff-Hauser e a média das três contagens, foi aplicada ao software *GraphPad prism* para análise dos dados. Foram determinadas as taxas de tempo de duplicação em horas, para avaliar quais condições proporcionam o crescimento mais rápido das culturas. Além disso, inóculos iniciais com concentrações variáveis de 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 foram testados para determinar qual são as melhores condições para se cultivar amostras com baixas densidades de leptospiiras de forma ideal, um dos maiores problemas quando se precisa isolar leptospiiras a partir de amostras clínicas onde não sabe-se previamente a concentração de bactérias nas amostras.

Tabela 1 – Composição química dos meios de cultura EMJH Difco e EMJH++

EMJH Difco*	EMJH++**
Fosfato monopotássico	Fosfato monopotássico
Cloreto de sódio	Cloreto de sódio
Cloreto de amônio	Cloreto de amônio
Fosfato dipotássico	Fosfato de sódio
Tiamina	Glicerol 10%
Suplemento: Albumina bovina, Tween 80 e fatores de crescimento para Leptospira.	Hidrolase lactalbumina
	Piruvato de sódio
	Superóxido dismutase
	Suplemento: Albumina bovina fração V, Tiamina, Cloreto de cálcio, Cloreto de magnésio, Sulfato de zinco, Sulfato de manganês, Sulfato de ferro, vitamina B12, Tween 80.
	+ 1% de soro de coelho estéril
R\$ 370,72 por litro	R\$ 288,56 por litro

* Informado pelo fabricante

** Adaptado de GRASSMANN et al., 2015

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de crescimento bacteriano foram geradas de forma eficaz para todas as condições testadas. Esse resultado comprova que ambos os meios de cultura são bons para o cultivo do microrganismo. Em geral, com exceção do meio de cultura EMJH Difco a 37°C, todas as outras condições propiciaram o crescimento de leptospiiras eficientemente (Figura 1). As vantagens de se cultivar leptospiiras a 37°C, quando a temperatura padrão descrita na literatura é 28°C-30°C (ADLER, 2015) podem ser evidenciadas em experimentos com microensaios *in vitro*, onde leptospiiras cultivadas a 37°C quando comparadas as cultivadas a 28°C, expressam diferencialmente genes relacionados a fatores de virulência e patogenicidade (LO et al., 2006; QIN et al., 2006). Essas informações sugerem que leptospiiras mantidas a 37°C durante o cultivo sejam mais virulentas que as mantidas com a temperatura padrão de 28°C.

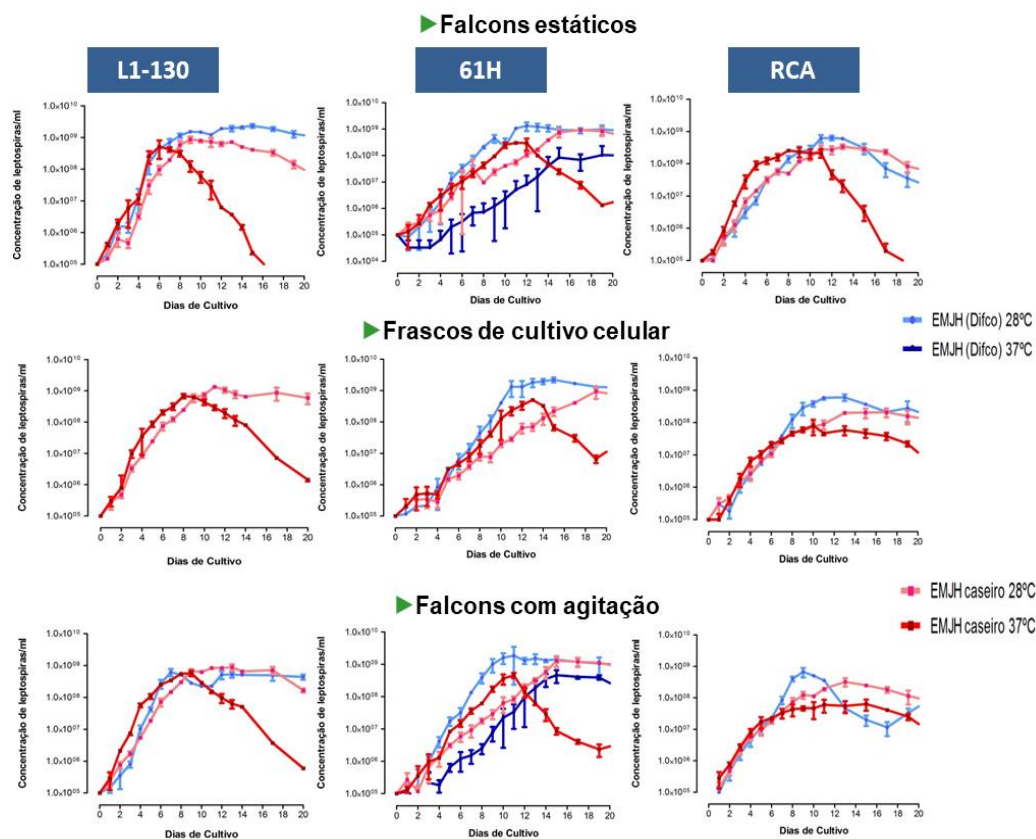


Figura 1 – Curvas de crescimento bacteriano para as espécies *L. interrogans* cepas L1-130 e RCA e *L. kirschneri* cepa UFPEl-61H cultivadas em tubos de fundo cônico (falcons) estáticos e sob agitação e frascos de cultivo celular. As linhas representam a média das três contagens e as barras o desvio padrão

As taxas de tempo de duplicação em horas estão apresentadas na tabela 2. As menores taxas para as culturas duplicarem foram em meio EMJH Difco a 28°C e em tubos mantidos em agitação durante o cultivo, demonstrando que essa condição proporciona o crescimento mais rápido das bactérias. Como bactérias aeróbicas, a maior disposição de oxigênio nessa condição pode ter influenciado o crescimento das culturas (ADLER, 2015).

Tabela 2 – Taxas de tempo de duplicação (em horas) nas culturas de leptospiras

		Tubos estáticos		Frascos de cultivo		Tubos com agitação	
		28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C
L1-130	EMJH Difco	8.802	X	X	X	8.573	X
	EMJH++	9.367	10.35	13.15	11.95	16.72	9.419
RCA	EMJH Difco	17.25	X	15.83	X	14.04	X
	EMJH++	17.60	10.71	22.92	16.80	19.49	16.13
61H	EMJH Difco	15.09	27.56	15.28	X	14.72	23.83
	EMJH++	20.19	22.35	30.80	18.91	26.52	19.20

4. CONCLUSÕES

- Os meios de cultura são eficazes no cultivo de leptospirosas patogênicas.
- Para cultivar a 37°C deve-se utilizar o meio EMJH++.
- As taxas de tempo de duplicação em horas das culturas foram menores em meio EMJH Difco a 28°C, especialmente associado à agitação nas culturas.
- Os dados gerados por este trabalho são um importante guia para delinear eficientemente experimentos em leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. *Leptospira* and Leptospirosis. **Current topics in Microbiology and Immunology**, v.387, doi:10.1007/978-3-662-45059-8, Austrália, 2015. 295p.

ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p. 287-96. 2010.

COSTA, F., et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.9, p. e0003898. 2015.

DIFCO. **Difco™ Leptospira Medium Base EMJH**. Becton, Dickinson and Company, New Jersey, 2011. 2p.

ELLINGHAUSEN, H. C., JR. e MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira* Pomona and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. **American Journal of Veterinary Research**, v.26, p. 45-51. 1965.

GRASSMANN, A., et al. Generation of Mammalian Host-adapted *Leptospira* interrogans by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats. **Bio-protocol**, v.5, e1536, 2015.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V.G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. **Journal of Bacteriology**, v.94, p.27-31, USA, 1967.

LO, M.; BULACH, D. M.; POWELL, D. R.; HAAKE, D.A.; MATSUNAGA, J.; PAUSTIAN, M. L.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. **Infection and Immunity**, v.74, n. 10, p.5848–5859, Washington, 2006.

QIN, J. H.; SHENG, Y. Y.; ZHANG, Z. M.; SHI, Y. Z.; HE, P.; HU, B. Y.; YANG, Y.; LIU, S. G.; ZHAO, G. P.; GUO, X. K. Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar lai strain 56601. **BioMed Central Microbiology**, v. 6, doi:10.1186/1471-2180-6-51, 2006.