

## PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CENTRIFUGAÇÃO DE *Leptospira* spp. A FIM DE OTIMIZAR A MANIPULAÇÃO DO MICRORGANISMO

**ELIAS EDUARDO BARBOSA DA ROSA<sup>1</sup>**; **LIANA NUNES BARBOSA<sup>2</sup>**; **CAROLINA RODRIGUES FÉLIX<sup>3</sup>**; **ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – eliaseduardobarbosa@gmail.com;*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – liana.tlo@gmail.com;*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas - carolinarodriguesfelix@gmail.com;*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas – alanmcb@gmail.com.*

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER, 2015). Esta enfermidade afeta a vida de milhões de pessoas ao redor do globo e atualmente estima-se aproximadamente 59.000 mortes por ano (COSTA et al., 2015). Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2017, somente no Brasil foram confirmados 3.051 casos da doença sendo 264 óbitos. No ano de 2018, até o mês de agosto foram confirmados 1.876 casos e 155 óbitos (SAÚDE, 2018).

As leptospiras possuem um formato alongado e helicoidal com comprimento que costuma variar entre 10 a 20 µm. Além disso, são bastante delgadas com aproximadamente 0,15 µm de diâmetro (PICARDEAU, 2017). Dos mecanismos de patogenicidade, a membrana externa é a principal estrutura de interação com o ambiente e o hospedeiro (ADLER, 2015). Uma das linhas de pesquisa com grande ênfase atualmente é o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose utilizando proteínas de membrana externa deste microrganismo como antígeno (GRASSMANN et al., 2017). Porém, sua membrana externa é bastante frágil (HAAKE et al., 1991) e durante os protocolos laboratoriais rotineiros para manipulação *in vitro* da bactéria, que envolvem desde pipetagens sucessivas até centrifugação acima de 8000 g, pode ocorrer o rompimento da membrana levando a identificação de alvos vacinais de forma errônea, como por exemplo, proteínas citoplasmáticas (SOUZA, 2017). Outro problema relevante é a inviabilização da bactéria, que não permite que o microrganismo se replique *in vitro*.

O objetivo desse trabalho é determinar um protocolo de centrifugação ideal de leptospiras onde se obtenham *pellets* destas bactérias com máxima qualidade e taxa de sobrevivência, sem que as mesmas apresentem danos visíveis ao microscópio e que impeçam a multiplicação *in vitro* do microrganismo.

### 2. METODOLOGIA

Leptospiras patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foram cultivadas em meio de cultura EMJH (Ellinghausen McCullough Johnson Harris) à 28 °C em estufa incubadora B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*). As bactérias foram avaliadas sob microscopia de campo escuro e contadas com auxílio de câmara de Petroff-Hausser antes e após serem realizados os padrões de centrifugação estabelecidos. Foram testados três diferentes padrões de velocidade e tempo de centrifugação (Tabela 1) e amostras de 1 ml de cultivo de leptospiras foram submetidas a esses diferentes padrões conforme descrito. Como

controle positivo, utilizou-se uma cultura de leptospiras com ausência de centrifugação.

**Tabela 1 – Padrões estabelecidos de centrifugações com suas respectivas velocidades e tempos testados**

<b>Padrão</b>	<b>Velocidade por g</b>	<b>Tempo</b>
I	8000	15 minutos
II	3000	20 minutos
III	14000	5 minutos

As culturas de leptospiras foram contadas previamente e uma concentração de  $10^8$  leptospiras/ml foi submetida à centrifugação seguindo as configurações acima.

Os pellets obtidos foram quantificados quanto à viabilidade e ressuspendidos novamente em meio EMJH, para que uma curva de crescimento bacteriano com inóculo de  $10^5$  leptospiras/ml fosse iniciada, testando se as leptospiras eram viáveis e capazes de multiplicar-se *in vitro*. Nos dias 6, 13 e 17 pós-inóculo, as leptospiras foram contadas e uma curva de crescimento foi determinada para cada condição. Todas as análises deste trabalho foram realizadas em triplicatas. Para avaliação dos dados estatísticos e geração das curvas de crescimento, foi utilizado o software GraphPad Prism 6.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O experimento realizado tratou-se de um experimento piloto que foi desenvolvido como a primeira etapa de seleção de padrões de centrifugações. Dessa forma, será repetido com novas configurações de tempo e velocidade uma vez que nenhum dos padrões estabelecidos nesse trabalho levou ao rompimento da membrana e impediu a multiplicação das bactérias *in vitro*. Todos os padrões testados obtiveram crescimento de leptospiras, e as concentrações de leptospiras/ml obtidas em cada padrão estão apresentadas na Tabela 2 e Figura 1.

**Tabela 2 – Concentrações de leptospiras/ml obtidas ao longo da curva de crescimento bacteriano**

<b>Amostra</b>	<b>Dia após inóculo</b>		
	<b>Dia 6</b>	<b>Dia 13</b>	<b>Dia 17</b>
Controle Positivo	$1,17 \times 10^8$	$1,27 \times 10^9$	$5,07 \times 10^8$
Padrão I	$9,03 \times 10^7$	$1,26 \times 10^9$	$1,88 \times 10^9$
Padrão II	$6,03 \times 10^8$	$9,17 \times 10^8$	$6 \times 10^8$
Padrão III	$2,75 \times 10^8$	$5,83 \times 10^8$	$9,33 \times 10^8$

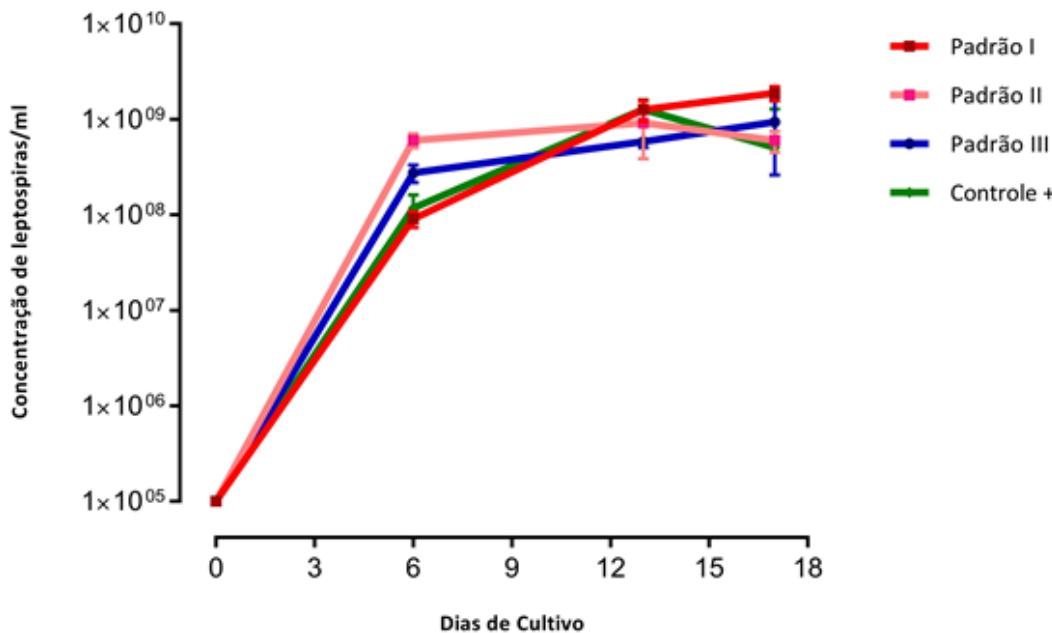


Figura 1 – Curva de crescimento *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 em meio de cultura EMJH à 28°C submetidas a diferentes padrões centrifugação. As linhas representam a média e as barras o desvio padrão das triplicatas

Por último, foi feita a análise estatística dos dados obtidos das curvas de crescimento usando o método two-way ANOVA (*Analysis of Variance*) através do software GraphPad Prism 6. Desta forma, conforme apontado por esta análise, não houve diferença significativa entre os valores.

#### 4. CONCLUSÕES

Deste trabalho, conclui-se que os padrões de centrifugação aos quais as bactérias foram submetidas não foram capazes de romper sua membrana e tampouco inviabilizar seu crescimento *in vitro*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B. *Leptospira and Leptospirosis*. 2015 (Current Topics in Microbiology and Immunology).
- COSTA, F., et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, n.9, p. e0003898. 2015.
- GRASSMANN, A. A., SOUZA, J. D. & MCBRIDE, A. J. 2017b. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? **Front Immunol**, 8, 256.
- HAAKE, D. A., WALKER, E. M., BLANCO, D. R., BOLIN, C. A., MILLER, M. N. & LOVETT, M. A. 1991. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa during in vitro cultivation. **Infect Immun**, 59, 1131-40.
- SOUZA, Jéssica Dias. **Vacinologia reversa e estrutural: Identificação da localização celular de alvos vacinais contra leptospirose**. 2017. 87f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- PICARDEAU, M. 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nat Rev Microbiol**, 15, 297-307.
- PORTAL DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica da Leptospirose**. Acessado em 25 de ago. de 2018. Online. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leptospirose/9805-situacao-epidemiologica-dados>