

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE ALTAS PASSAGENS DE CULTURA *IN VITRO* NA VIRULÊNCIA DE *Leptospira interrogans* CEPA FIOCRUZ L1-130

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

¹ UFPEl, CDTec, Núcleo de Biotecnologia, LPDI – guilherme.rosa@gmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma importante e negligenciada zoonose distribuída mundialmente, estando presente em todos os continentes habitados (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU, 2014). O agente etiológico da doença são bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER, 2015). É uma doença com altos índices de morbidade e mortalidade, estimando-se cerca de 59 mil mortes e um milhão de casos graves de leptospirose anualmente (COSTA et al, 2015).

Ainda que importante, é uma bactéria pouco estudada e há a lacuna de conhecimento sobre diversas características da bactéria, tanto no seu comportamento *in vitro* quanto *in vivo*. Há conhecimento sobre qual é a melhor temperatura de cultivo, aeração, meio de cultura e se tais fatores afetam ou não o comportamento da bactéria (BARBOSA, 2018). Não há a descrição se leptospirosas patogênicas e adaptadas ao hospedeiro mamífero perdem ou não sua virulência após várias gerações *in vitro* sem contato com seus hospedeiros, e se são capazes de recuperar sua virulência. Essas informações são importantes em pesquisa com leptospirose, principalmente quando se trata de estudos com alguma espécie ou cepa patogênica a ser descrita ou a elaboração de uma vacina contra a bactéria.

Este trabalho, portanto, tem como objetivo testar a se a bactéria perde sua capacidade de virulência e adaptação ao hospedeiro mamífero após um alto número de passagens de cultivo *in vitro*, e se são capazes de recuperar tal virulência através de readaptação, a fim de melhorar o conhecimento sobre a bactéria e otimizar pesquisas sobre a doença.

2. METODOLOGIA

Para avaliar se a virulência é ou não afetada com um alto número de passagens *in vitro*, utilizou-se bactérias *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, cultivadas em meio EMJH (Difco) a 28 °C.

Repicou-se as leptospirosas duas vezes por semana, sempre em fase exponencial para manter uma boa qualidade de cultivo até atingir os números de 24, 49 e 74 passagens *in vitro*, para a adaptação ao meio e condições de cultura *in vitro*, o que pode levar a perda de virulência bacteriana (LEHMANN et al, 2015).

A qualidade da cultura bacteriana foi avaliada em microscopia de campo escuro, no número de passagens *in vitro* citados acima. Também armazenou-se amostras destas culturas em nitrogênio líquido. Descongelou-se as leptospirosas e realizou-se a readaptação em 5 ml de meio EMJH, gerando mais uma passagem *in vitro*, e seguiu-se para a contagem em Câmara de Petroff-Hausser antes de cada desafio.

Para as leptospiros com 24 passagens *in vitro*, um protocolo para cultivo *in vivo* foi testado utilizando Câmaras de Membrana de Diálise (DMC) que foram implantadas no peritônio de ratos Wistar fêmeas adultas, da espécie *Rattus norvegicus*, com mais de 250 g (CAIMANO et al, 2014; GRASSMANN et al, 2015). Empregou-se esta metodologia na a fim de recuperar a virulência perdida das leptospiros com 25 passagens *in vitro* com o cultivo em DMC, readaptando as bactérias ao hospedeiro mamífero. As bactérias recuperadas de DMCs foram utilizadas imediatamente para a infecção dos animais e avaliar se recuperaram sua virulência

A Dose Letal 50% (DL₅₀) foi calculada para as culturas depois das passagens, a fim de avaliar se leptospiros perdem sua virulência após diversas passagens *in vitro*. Foram utilizados hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) com 8 a 12 semanas de idade, o modelo animal recomendado para estudos de leptospirose aguda letal. Os grupos foram organizados com quatro animais em cada grupo nos experimentos com 25 passagens *in vitro* e *in vitro* mais DMC, e três animais em cada grupo para os experimentos com 50 e 75 passagens. Para as DL₅₀ com 25 passagens *in vitro* e 25 passagens mais implante em DMCs, os grupos de animais foram inoculados via intraperitoneal com 1 ml de cultivo nas concentrações de 10¹, 10³, 10⁵ e 10⁷ leptospiros/ml. De forma semelhante, se infectou os grupos animais com leptospiros de 50 e 75 passagens, nas concentrações de 10⁰, 10², 10⁴ e 10⁶ leptospiros/ml foram utilizadas para a DL₅₀. Analisou-se os dados obtidos com o software Graphpad Prism 5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para testar a influência da passagem *in vitro* na virulência da espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, realizamos os testes com bactérias com 25, 50 e 75 passagens. As culturas também seriam expostas à readaptação ao hospedeiro mamífero em DMC para recuperar a virulência possivelmente perdida, o que demonstrou-se desnecessário nos casos expostos ao longo dos experimentos.

Desafiou-se animais com leptospiros com 25 passagens *in vitro* para testar se este número era capaz de gerar bactérias avirulentas. Também realizou-se em paralelo o desafio de animais com leptospiros com 25 passagens *in vitro* e que foram implantadas em DMCs, com a finalidade de que se readaptassem ao hospedeiro, assim recuperando sua virulência. Com 25 passagens, as bactérias continuaram virulentas, obtendo a mesma DL₅₀ de 1 leptospira em ambas as condições. Todos os animais dos dois grupos desenvolveram leptospirose aguda, e sua taxa de sobrevivência está representada na Figura 1.

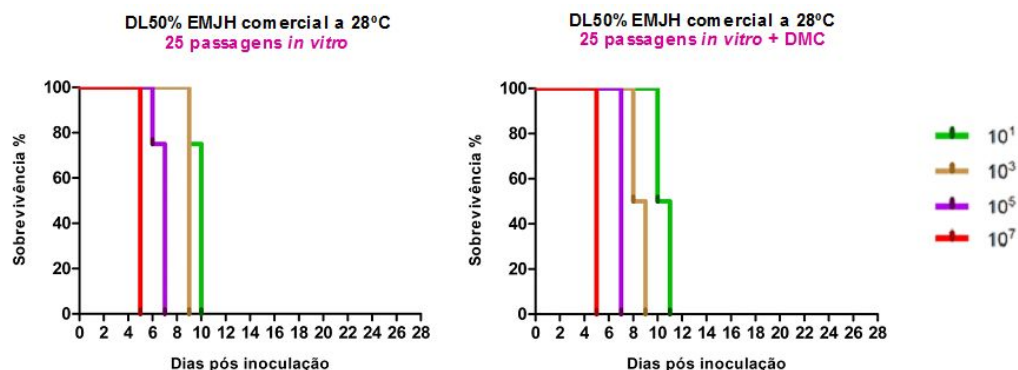


Figura 1 – Sobrevivência dos animais infectados com leptospiros cultivadas *in vitro* por 25 passagens em meio de cultura EMJH a 28 °C.

Obtendo o resultado que 25 passagens não levava a perda de virulência da bactéria, não repetiu-se o uso da DMC nos experimentos com 50 e 75 passagens, pois as bactérias se mostraram capazes de manter sua virulência.

Apesar do aumento do número de passagens *in vitro*, as leptospiros foram capazes de levar os animais de ambos os grupos a desenvolver leptospirose aguda. Tanto as leptospiros com 50 e com 75 também obtiveram DL₅₀ de 1 leptospira. As taxas de sobrevivência dos animais infectados com leptospiros com 50 e 75 passagens estão representadas na Figura 2.

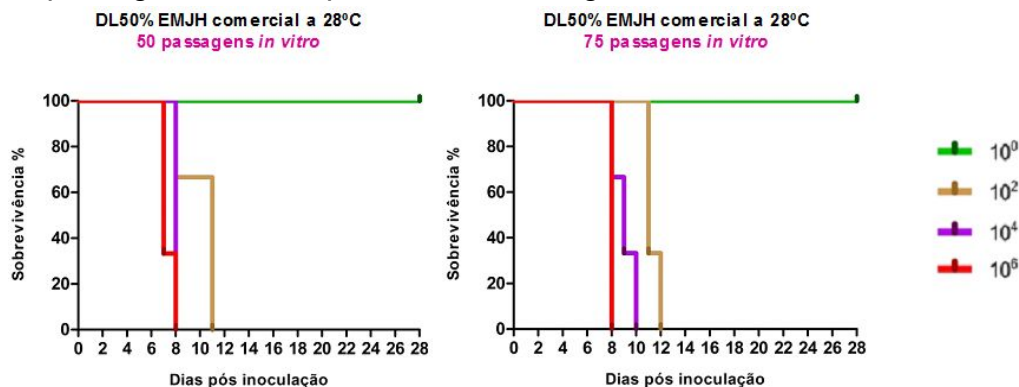


Figura 2 – Sobrevivência dos animais infectados com leptospiros cultivadas *in vitro* por 50 e 75 passagens em meio de cultura EMJH (Difco) a 28 °C.

Na maioria dos casos, culturas com altas passagens *in vitro* levam bactérias patogênicas a perder sua virulência, por motivos como mutações ou expressão diferenciada de genes de virulência, dentre outros motivos (FAINE, 1956; ELLINGHAUSEN, 1973; FRASER e BROWN, 2017).

Os cuidados ao repicar a cultura, como repicar bactérias com boa motilidade em fase exponencial também são importantes na manutenção da virulência, sendo a fase de crescimento exponencial a mais impactante na virulência das leptospiros, e a motilidade é um importante fator de virulência (BARBOSA, 2018). Assim, para a perda de virulência talvez seja importante que os repiques ocorram em fase de crescimento estacionária, obtendo culturas menos saudáveis, o que pode aumentar o acúmulo de mutações na bactéria e a resultante perda na virulência. Os resultados obtidos demonstram que a manutenção de uma cultura saudável em um meio de qualidade é capaz de manter estável a virulência da bactéria.

4. CONCLUSÕES

- As leptospiros testadas sucessivamente passadas em cultura *in vitro* por 25, 50 e 75 vezes não sofreram perda na sua virulência;
- A manutenção de uma cultura saudável, com leptospiros repicadas em fase exponencial cultivadas em um meio de cultura de qualidade pode ajudar na estabilidade da bactéria ao longo das passagens *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 387p. 2015.

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

CAIMANO, M. J., et al. A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **PLoS Pathog**. 10 (3). e1004004. 2014.

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.; 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. **Am. J. Vet. Res.**, v.26, p. 45-51. 1965.

FAINE, S. Virulence in *leptospira* II. The growth in vivo of virulent *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Brit. J. Exp.Pathol.**, v. 38, n. 1, p. 8–14, 1957.

FRASER, T.; et al. Temperature and Oxidative Stress as Triggers for Virulence Gene Expression in Pathogenic *Leptospira* spp. **Frontiers in Microbiology**. 8 (773). p. 1-13. 2017.

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 **J. Bacteriol.** v.94, p.27-31, USA, 1967.

LEHMANN, J. S., et al. Whole Genome Shotgun Sequencing Shows Selection on *Leptospira* Regulatory Proteins During In Vitro Culture Attenuation. **Am J Trop Med Hyg**. 94 (2). p. 302-313. 2015.

BARBOSA, L. N. **Microbiologia básica de *Leptospira* spp.: ferramenta para a otimização dos estudos em leptospirose**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

LO, M; et al. 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.; et al. 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.