

## TESTANDO MEIOS DE CULTURA PARA O ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS

FERRO, Ariana Gayer<sup>1</sup>; SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto<sup>1</sup>; DINIZ, Juliana Alcoforado<sup>2</sup>; GALEANO, Valeria Rocha<sup>1</sup>; FÉLIX, Samuel Rodrigues<sup>1</sup>;  
<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária – UFPel; <sup>2</sup>Centro de Biotecnologia – UFPel

SILVA, Éverton Fagonde<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária – UFPel; <sup>2</sup>Centro de Biotecnologia – UFPel

### 1 INTRODUÇÃO

O isolamento de leptospiiras a partir de amostras clínicas e de tecidos é crucial para o diagnóstico definitivo da infecção em humanos e animais, além do propósito epidemiológico (WHO, 2003). Este procedimento é de particular significância em situações onde o diagnóstico da enfermidade é inadequado ou duvidoso, como nos casos de aborto (Ellis et al., 1982). Para isso, os meios de cultura mais comumente utilizados para o isolamento de leptospiiras são os líquidos e os semi-sólidos, baseados em formulações contendo suplementos a base de albumina e soro de coelho (Faine et al., 1999).

As leptospiiras patogênicas são bactérias fastidiosas que necessitam de requerimentos adicionais para o seu crescimento “in vitro” (Faine et al., 1999). Como fonte primária de carbono e de energia, elas utilizam preferencialmente ácidos graxos saturados de cadeia longa na beta-oxidação (Baseman et al., 1972). Entretanto, estes componentes representam um importante fator limitante para o crescimento das leptospiiras, devido a sua toxicidade quando utilizados em elevados níveis. Esta toxicidade frequentemente é revertida através da adição de albumina e outros componentes como os detergentes (por exemplo, Tween80) (Faine et al., 1999).

Neste contexto, o propósito do presente estudo foi o de testar meios de cultura líquidos com quatro tipos de suplementos, visando o crescimento “in vitro” de três leptospiiras virulentas isoladas no Brasil.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum cepa 4E (Silva et al., 2010), *L. interrogans* sorogrupo Canicola cepa Kito (Silva et al., 2008) e *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae cepa Fiocruz L1-130 (Ko et al., 1999), todas com baixa passagem “in vitro” (menos do que 7 vezes), foram cultivadas a 30°C em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco-EUA), o qual foi adicionado com 10% de suplemento comercial (Difco-EUA), durante o período de 7 dias, conforme a recomendação de WHO (2003). Previamente, as três cepas foram testadas quanto a sua virulência em modelo animal suscetível (*Mesocricetus auratus*).

Para os experimentos, as três cepas que cresceram nas condições acima foram repicadas em 4 preparações diferentes, mantendo-se as demais condições de cultivo conforme é recomendado (WHO, 2003). Todos os meios líquidos foram preparados com o meio EMJH base, suplementados com: - (a) Difco; - (b) soro de coelho; - (c) soro de coelho + Tween80; e - (d) Difco +

Tween80. Durante o experimento, todas as culturas foram contadas em microscopia de campo escuro usando uma câmara de contagem Petroff-Hausser (Faine et al., 1999), nos intervalos de dias referidos como 3-5 dias, 7 dias e 10-14 dias. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas através do Teste de T-Student, sendo considerados estatisticamente diferentes aqueles grupos onde os valores de  $p$  foram menores do que 0,05.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os primeiros meios de cultura para o isolamento de leptospiras foram primeiramente desenvolvidos por Inada e seus colaboradores (1916), os quais descreveram a utilização de meio de cultura base, suplementado com órgãos macerados de animais de laboratório. Desde então, alguns meios de cultura já foram desenvolvidos e entre eles está o meio EMJH base, que é amplamente utilizado com a adição de suplementos comerciais ou oriundos de soros animais.

Com o passar dos anos, o seqüenciamento do genoma de leptospiras e a utilização de ferramentas de biologia molecular, permitiram evidenciar que algumas modificações relacionadas ao cultivo tradicional das leptospiras e para o isolamento primário a partir de amostras clínicas deveriam ser adotados (Nascimento et al., 2004). Bactérias fastidiosas requerem suplementos diferenciados para o seu crescimento, diferentemente de outras, como as pertencentes aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Canicola, as quais são isoladas com uma maior facilidade (Faine et al., 1999).

Em nosso estudo, testamos 4 combinações de suplementos que foram adicionados ao meio base EMJH, utilizando-se para isso, três cepas virulentas isoladas no Brasil. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os suplementos e entre os intervalos de tempo. Entretanto, nas Figuras 1, 2 e 3 observa-se que o suplemento comercial Difco apresentou a melhor performance, com o crescimento variando entre  $1,5$  e  $2 \times 10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$ , aproximadamente, quando comparado aos demais suplementos.

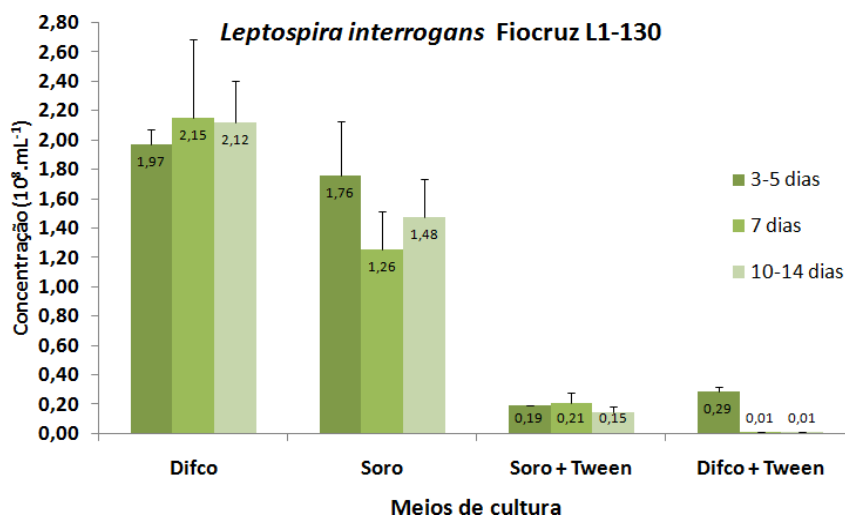


Figura 1. Curva de crescimento da cepa Fiocruz L1-130 de acordo com os 4 diferentes meios de cultura.

Por outro lado, a adição de Tween, diferentemente do que é relatado na literatura, demonstrou um efeito inibidor ao crescimento das três cepas, mesmo quando utilizado com Difco e soro de coelho. Embora o desempenho dos grupos com o soro de coelho tenha evidenciado um crescimento menor do que os grupos Difco, para todas as cepas, este se revela como uma alternativa do ponto de vista financeiro, já que o suplemento Difco possui um custo elevado.

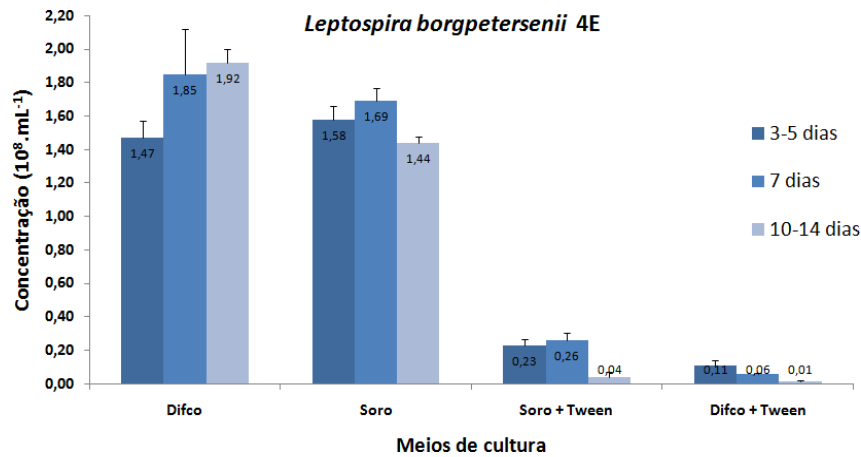


Figura 2. Curva de crescimento da cepa 4E de acordo com os 4 diferentes meios de cultura.

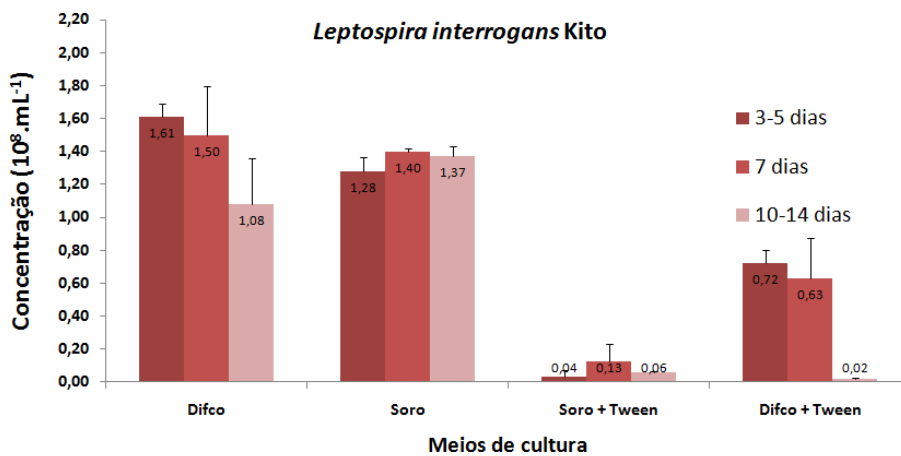


Figura 3. Curva de crescimento da cepa Kito de acordo com os 4 diferentes meios de cultura.

#### 4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o suplemento Difco deve ser utilizado para o isolamento de leptospiros. Além disso, o soro de coelho é uma boa alternativa custo-benefício para este propósito. Outras formulações estão sendo testadas para o cultivo de leptospiros.

## 5 REFERÊNCIAS

BASEMAN, J.B.; COX, C.D. Intermediate energy metabolism of *Leptospira*. **Journal of Bacteriology**, v.97, p. 992-1000, 1972.

ELLIS, W.A.; O'BRIEN, J.J.; NEILL, S.D.; HANNA, J. Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. **Veterinary Records**, v.110, p.178-180, 1982.

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **MediSci: Melbourne**, Australia, 272p.1999.

INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R.; ITO, H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). **Journal of Experimental Medicine**, v.23, p.377-402, 1916.

KO, A.I., REIS, M.G., RIBEIRO DOURADO, C.M., JOHNSON, W.D. Jr., RILEY, L.W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v.354, n.9181, p.820–825. 1999.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F.; LEITE, L. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S. M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.7, p.2164-2172, 2004.

SILVA, É.F., SANTOS, C.S., ATHANAZIO, D.A., SEYFFERT, N., SEIXAS, F.K., CERQUEIRA, G.M., FAGUNDES, M.Q., BROD, C.S., REIS, M.G., DELLAGOSTIN, O.A., KO, A.I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v.26, n.31, p. 3892-3896. 2008.

SILVA, É.F., FELIX, S. R. ; CERQUEIRA, G. M. ; FAGUNDES, M. Q. ; NETO, A. C. P. S. ; GRASSMANN, A. A. ; AMARAL, M. G. ; GALLINA, T. ; DELLAGOSTIN, O. A. . Preliminary Characterization of Mus musculus-Derived Pathogenic Strains of *Leptospira borgpetersenii* Serogroup Ballum in a Hamster Model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 336-337, 2010.

WHO. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2003.