UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho de Conclusão de Curso

Microbiologia básica de *Leptospira* spp.: ferramenta para otimização dos estudos em Leptospirose

Liana Nunes Barbosa

Pelotas, 2015

Liana Nunes Barbosa

Microbiologia básica de *Leptospira* spp.: ferramenta para otimização dos estudos em Leptospirose

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Alan John Alexander McBride, PhD

Coorientador: Dr. André Alex Grassmann

Pelotas, 2015

!

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B238m Barbosa, Liana Nunes
Microbiologia básica de *Leptospira* spp. : ferramenta para otimização dos estudos em leptospirose / Liana Nunes Barbosa. – 39f. : il. - Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientador Alan John Alexander McBride ; coorientador André Alex Grassmann.

1.Biologia. 2.Cultivo *in vitro*. 3.*Leptospira*. 4.Temperatura. 5.Curva de crescimento. 6.Meio EMJH. I.McBride, Alan John Alexander. II.Grassmann, André Alex. III.Título.

CDD:

Liana Nunes Barbosa

Microbiologia básica de *Leptospira* spp.: ferramenta para otimização dos estudos em Leptospirose

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 17 de Novembro de 2015

Banca examinadora:

Prof. PhD. Alan John Alexander McBride (Orientador)
PhD em Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada pela University of Manchester Institute of Science and Technology

Prof. Drª. Flávia Weykamp da Cruz McBride
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Samuel Rodrigues Félix
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Aos meus pais Antônio e Eliane, por tudo que fizeram e fazem até hoje pra me ver bem e feliz, me incentivando diariamente a nunca desistir e acreditando no meu potencial.

Aos meus irmãos Thiago e Bárbara, “pedaços meus” fora do corpo, que são o elo mais forte que eu tenho na vida.

Aos meus avós Clovani e Rosa, por serem meus pais por diversas vezes, por se preocuparem comigo e pelo afeto de sempre.

Aos meus avós Jozino e Maria (*in memoriam*), pelo carinho, amor e alegria. A tua ausência será sentida pra sempre Vó Maria.

Aos queridos Dario, Dina, André, Magda e Patrício, por participarem deste último ano ao meu lado, dando apoio e torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu amor Magvan, melhor presente que eu poderia ter ganhado em 2015, por dividir comigo esse momento e por todo apoio nas horas difíceis.

Aos Tios (as) e Primos (as) queridos, pelo incentivo e carinho de sempre.

Aos amigos verdadeiros que sempre estiveram ao meu lado, vocês foram essenciais nessa trajetória. Sou muito abençoada por tê-los ao meu redor.

Aos colegas Júlia, Maurício, Gregori, Gabriana e Matheus do Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, pela ajuda e pelas risadas durante a rotina laboratorial.

As pós-graduandas Carol, Jéssica, Neida, Marcelle e a pós-doutoranda Karla, por toda ajuda durante o meu aprendizado no laboratório.

Aos queridos orientadores e amigos, Alan e André, sem vocês nada disso seria realizado. Obrigado pelo incentivo, paciência e conhecimento a mim passados.

Aos colegas de graduação, por terem tornado esses 5 anos de faculdade os melhores da minha vida e pelo suporte para enfrentar as dificuldades dessa jornada.

Muito obrigado a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa etapa, esse diploma eu divido com vocês!

“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo de que se gosta, mas gostar daquilo que se faz.”

Leonardo da Vinci

Resumo

BARBOSA, Liana Nunes. **Microbiologia básica de *Leptospira* spp.: ferramenta para otimização dos estudos em Leptospirose.** 2015. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A leptospirose é uma zoonose com elevada incidência mundial, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. A manutenção das cepas e o crescimento *in vitro* desse microrganismo ainda são processos difíceis de serem realizados e demorados, tornando-se evidente a necessidade da otimização das técnicas de cultivo em laboratório, essencial para aprimorar os estudos em leptospirose. O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de crescimento *in vitro* da espécie *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 em diferentes condições, utilizando os meios de cultura EMJH caseiro e EMJH comercial (Difco). *L. interrogans* foi cultivada sob as temperaturas de 28 e 37°C em três condições diferentes: i) tubos de fundo cônico de 15ml estáticos ou ii) nestes tubos sob agitação e iii) frascos de cultivo celular estáticos. Uma curva de crescimento bacteriano foi determinada para cada condição de cultivo. Foram testados inóculos iniciais variáveis de 10^0 a 10^5 leptospiras/ml, que foram inoculados em 5ml totais de meio de cultura. Todos os cultivos foram realizados em triplicata e os valores das contagens foram utilizados para obtenção de curvas de crescimento, seguido pelo cálculo de tempo de duplicação dos microrganismos nas culturas. O meio EMJH caseiro apresentou densidades bacterianas superiores na fase exponencial de crescimento de até $6{,}8\times10^8$ leptospiras/ml comparado ao meio comercial que apresentou até $2{,}3\times10^8$ leptospiras/ml. Além disso, foi possível constatar o crescimento de leptospiras com inóculos iniciais de 10^0 leptospiras/ml de cultura nesse meio, o que não foi possível no meio comercial, onde somente inóculos a partir de 10^4 leptospiras/ml cresceram a 28°C e acima de 10^6 leptospiras/ml a 37°C. As menores taxas de tempo duplicação (em horas) foram de 19,9 a 28ºC e 21,6 a 37ºC no meio EMJH caseiro, especialmente quando associado ao aumento de aeração durante o cultivo. O meio de cultura EMJH caseiro permite a utilização de inóculos iniciais reduzidos, especialmente a 37ºC. Essas características de crescimento no meio caseiro são vantajosas para o isolamento inicial de leptospiras a partir de animais infectados, bem como para avaliação da virulência de espécies patogênicas e obtenção de maiores densidades de leptospiras nas culturas. O conhecimento da dinâmica *in vitro* do microrganismo possibilita modificar o padrão de cultivo *in vitro* de leptospiras, aprimorando as técnicas de cultivo em laboratório e tornando-as ideal para o avanço de pesquisas em leptospirose.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*; *Leptospira*; temperatura; curva de crescimento, meio EMJH.

Abstract

BARBOSA, Liana Nunes. **Basic microbiology of *Leptospira* spp.: a tool for improving studies on leptospirosis.** 2015. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Leptospirosis is a zoonosis with a high incidence worldwide that is caused by spirochetes of the *Leptospira* genus. The laboratory maintenance and *in vitro* growth of leptospiral strains remain time-consuming and difficult processes, highlighting the need for an improvement in laboratory techniques, an urgent need in leptospirosis. The aim of this work was to establish the *in vitro* growth profile of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 under different conditions, using homemade and commercial EMJH (Difco) media. *L. interrogans* was cultivated at 28 and 37°C under 3 different conditions: i) stationary 15 ml conical tubes; ii) 15 ml conical tubes with shaking; iii) stationary cell culture flasks. A bacterial growth curve was determined for each culture condition. Different starting inocula, varying from 10^0 to 10^5 leptospires/ml, were evaluated following inoculation into 5 ml (final volume) of culture media. All culture conditions were carried out in triplicate and the cell counts for each tube were used to plot the growth curve and calculate the doubling time for each condition tested. Homemade EMJH yielded higher bacterial densities during the exponential growth phase, up to 6.8×10^8 leptospires/ml, compared to commercial EMJH that supported up to 2.3×10^8 leptospires/ml. In addition, growth was observed with a starting inoculum as low as 10^0 leptospires/ml in homemade EMJH, whereas the minimum starting inocula for commercial media was 10^4 leptospires/ml at 28°C and $>10^6$ leptospires/ml at 37°C. The lowest doubling times, 19.9 h at 28ºC and 21.6 h at 37ºC, were observed with homemade EMJH plus shaking. Homemade EMJH permitted the use of a lower inoculum, especially at 37°C. These characteristics of the homemade media will be advantageous for the isolation of leptospires from infected animals, for virulence testing of pathogenic species and for achieving high-density leptospiral cultures. Understanding the *in vitro* dynamics of the microorganism will allow the optimization of *in vitro* culturing, improving laboratory culture techniques that will be applicable to advancing leptospirosis research.

Keywords: *in vitro* culture; *Leptospira*; temperature; growth curve, EMJH medium.

Lista de Figuras

Figura 1 Ciclo de transmissão da leptospirose..... 14

Figura 2 Gráfico representando a curva de crescimento bacteriano para a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 nos meios de cultura EMJH caseiro e EMJH comercial (Difco), com inóculo de 10^4 leptospiras/ml, sob as temperaturas de 28ºC e 37ºC, em tubos de fundo cônico estáticos..... 22

Figura 3 Gráficos representando a curva de crescimento bacteriano para a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 em meio de cultura EMJH comercial (Difco) sob as temperaturas de 28ºC e 37ºC, em tubos de fundo cônico estáticos..... 23

Figura 4 Gráficos representando a curva de crescimento bacteriano para a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 nos meios de cultura EMJH caseiro e EMJH comercial (Difco) sob as temperaturas de 28ºC e 37ºC em frascos de cultivo celular..... 24

Figura 5 Gráficos representando a curva de crescimento bacteriano para a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 nos meios de cultura EMJH caseiro e EMJH comercial (Difco) sob as temperaturas de 28ºC e 37ºC em tubos de fundo cônico com agitação..... 26

Lista de Tabelas

Tabela 1 Ingredientes que compõem os meios de cultura EMJH comercial (Difco) e EMJH caseiro..... 19

Tabela 2 Taxas de tempo de duplicação (em horas) de leptospiras nas culturas..... 26

Sumário

1 Introdução..... 11

1.1 Objetivos..... 12

2 Revisão de literatura..... 13

2.1 Leptospirose..... 13

2.2 Histórico da doença..... 15

2.3 Agente etiológico (*Leptospira* sp.)..... 16

2.4 Cultivo *in vitro* de leptospiras..... 17

3 Materiais e métodos..... 19

3.1 Meios de cultura..... 19

3.2 Curvas de crescimento bacteriano..... 20

3.3 Testes de diferentes densidades iniciais para o cultivo..... 20

3.4 Análise dos dados..... 21

4 Resultados 22

5 Discussão..... 27

6 Conclusões..... 30

Referências..... 31

Anexos..... 34

1. Introdução

A leptospirose é uma importante zoonose de ampla distribuição mundial (PICARDEAU et al., 2014) presente em todos os continentes, com exceção da Antártida (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Está associada a uma ampla gama de hospedeiros mamíferos, os responsáveis pela disseminação da doença, inclusive a humanos (AHMED et al., 2006). Nos países desenvolvidos, a leptospirose assume um caráter ocupacional, estando associada a praticantes de esportes aquáticos, agricultores, veterinários e trabalhadores de frigoríficos, por exemplo (PAPPAS et al., 2007). Além disso, a leptospirose também está relacionada às altas infestações de roedores infectados, bem como, condições sanitárias precárias em países subdesenvolvidos, facilitando o ciclo de transmissão e potencializando a incidência da doença nessas regiões (ADLER, 2015).

As espécies patogênicas do gênero *Leptospira* são os agentes etiológicos da leptospirose (AHMED et al., 2006). A transmissão da doença ocorre pela penetração da bactéria através da pele ou mucosas dos hospedeiros mamíferos, após estes entrarem em contato direto com urina ou tecidos contaminados ou, pelo contato indireto com água, solo e fômites contaminados com a urina de animais infectados (ADLER, 2015). Nos seres humanos, a leptospirose pode se apresentar de forma leve, com sintomas semelhantes a outras doenças infecciosas como a gripe, ou evoluir para formas graves, como a Síndrome de Weil (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003), com hemorragias, icterícia e insuficiência renal aguda (YANG et al., 2001; KO et al., 2009) ou também a Síndrome hemorrágica pulmonar grave (CRODA, 2008; KO et al., 2009; ADLER, 2015).

O cultivo *in vitro* de leptospiras foi realizado pela primeira vez com o uso de um meio de cultura composto por rim de cobaio (*Cavia porcellus*) em líquido ascítico, selado com parafina líquida (INADA et al., 1916). Nos anos seguintes, diversos meios de cultura foram descritos, até o surgimento do meio de cultura EMJH -

Ellinghausen Mccullough Johnson Harris (ELLINGHAUSEN e MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON e HARRIS, 1967). Este meio possibilitou o cultivo *in vitro* de diferentes cepas, sorovares e espécies de leptospiras (ADLER, 2015).

Apesar de um século passado desde os primeiros estudos com leptospiras isoladas e mantidas *in vitro*, ainda não há um trabalho comparando os diferentes tipos de meios de cultivo disponíveis e as condições para a manutenção destes. A falta desses conhecimentos levanta diferentes questionamentos sobre a manutenção das culturas *in vitro*, como por exemplo, qual temperatura, aeração, tamanho de inóculo inicial, proporcionam a otimização do cultivo *in vitro*. Da mesma forma, ainda não há consenso sobre a melhor opção para se realizar o isolamento primário de leptospiras a partir de amostras de animais infectados e, principalmente, se o tipo de cultivo que essas cepas são submetidas afeta a virulência das espécies patogênicas.

A partir dessas questões, torna-se evidente a necessidade do aperfeiçoamento das técnicas de cultivo e da elucidação da dinâmica *in* vitro do microrganismo, com a intenção de promover a otimização dos estudos em leptospirose. A busca desses conhecimentos é fundamental, por exemplo, para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose, onde o entendimento da virulência das espécies é um fator essencial.

1.1 Objetivos

- Determinar o perfil de crescimento *in vitro* da espécie *Leptospira interrogans* nos meios de cultura EMJH caseiro e EMJH comercial (Difco) sob diferentes temperaturas, com variação de recipientes para o cultivo e o uso de agitação durante o cultivo.

- Testar diferentes inóculos iniciais para elucidar quais inóculos são possíveis para iniciar uma cultura viável de leptospiras.

2. Revisão de literatura

2.1. Leptospirose

A leptospirose é considerada a zoonose mais difundida mundialmente (ADLER, 2015), sendo emergente e negligenciada, com estimativa superior a 1 milhão de novos casos graves em humanos ao ano, com aproximadamente 59.000 mortes (COSTA et al., 2015). No Brasil, nos últimos 14 anos foram confirmados mais de 56.000 casos de leptospirose e aproximadamente 5.500 óbitos (SAÚDE, 2015).

A incidência de leptospirose é maior em regiões tropicais, onde está associada ao aumento das estações chuvosas e ocorrência de enchentes. Isso se deve também, pela sobrevivência dessa bactéria em ambiente úmido, potencializando o risco de exposição e, nesse contexto, infecção de animais suscetíveis (HAAKE et al., 2002; BHARTI et al., 2003). A globalização e desigualdade social produziram padrões epidemiológicos divergentes com relação à leptospirose. Nas últimas décadas, a migração da população rural pobre para comunidades desfavorecidas em potencial crescimento, como as favelas em zonas urbanas de países subdesenvolvidos, associada à falta de saneamento básico e às grandes populações de roedores nessas localidades, produzindo condições ecológicas ideais para a transmissão da doença, tornou a leptospirose um problema de saúde pública em potencial crescimento (MCBRIDE et al., 2005). Nos países desenvolvidos, a doença está ligada a pratica de esportes, atividades recreativas e viagens turísticas (MCBRIDE et al., 2005; ADLER, 2015). Bem como, nas populações rurais existe a associação com a agricultura e produção animal, tornando-se um fator de risco principalmente para os grupos de trabalhadores expostos a ambientes contaminados com a urina dos animais reservatórios (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A transmissão da doença está associada ao contato direto de animais domésticos ou selvagens com a urina ou tecidos de animais reservatórios, ou por contato indireto com água, solo, lama e alimentos contaminados com a urina de animais infectados. Os seres humanos são hospedeiros acidentais (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; ORGANIZATION, 2011; ADLER, 2015). Através da penetração na pele ou membranas mucosas, as leptospiras entram na corrente sanguínea e disseminam-se pelos tecidos dos hospedeiros (Figura 1). Nos humanos a infecção apresenta-se durante a fase inicial tipicamente como uma doença febril inespecífica, causando febre aguda, mialgia e dores de cabeça (ADLER, 2015). No entanto, em 5 a 15% dos casos há a progressão para manifestações clínicas graves na fase tardia da doença, levando a disfunção hepática e icterícia, insuficiência renal aguda, hemorragia pulmonar, miocardite e meningoencefalite (KO et al., 2009).

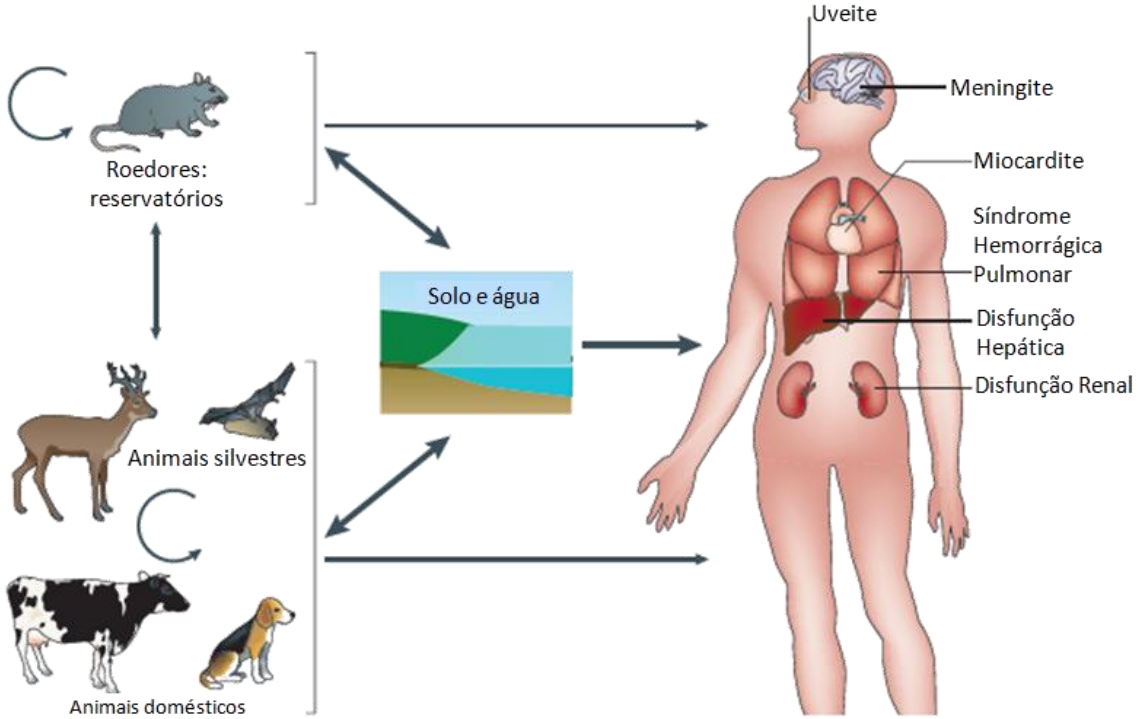

Figura 1 - Ciclo de transmissão da leptospirose. Espécies de mamíferos excretam leptospiras patogênicas na urina e servem como reservatórios para a sua transmissão. As leptospiras são mantidas em ambientes silvestres e domésticos pela transmissão entre espécies de roedores. A leptospirose é transmitida aos seres humanos por contato com animais reservatórios ou por exposição a águas de superfície ou ao solo, contaminados com a urina de animais infectados. Através da pele ou mucosas, as leptospiras entram na corrente sanguínea e disseminam-se por todo o organismo, causando uma doença febril aguda durante a fase inicial, podendo progredir para manifestações multissistêmicas graves. Os seres humanos são hospedeiros acidentais e não excretam um número suficiente de leptospiras para servir como reservatórios para a transmissão da doença.
Fonte: Adaptado de KO et al, 2009.

2.2. Histórico da doença

A história moderna da leptospirose começou em 1886 quando Adolph Weil descreveu um tipo de icterícia em particular, acompanhada de conjuntivite, disfunção renal, erupções cutâneas e esplenomegalia (ADLER, 2015), hoje conhecida como a forma severa da leptospirose. Weil foi o primeiro a descrever a doença em uma época onde existiam grandes epidemias na Europa Ocidental, despertando o interesse dos médicos da época pelo seu trabalho e, em sua homenagem, a doença passou a chamar-se Síndrome de Weil. Porém, desde os primórdios da medicina humana, já existiam relatos de enfermidades que hoje facilmente reconhecemos como sendo a leptospirose, em diferentes regiões do mundo (ADLER, 2015). Em países como China, Japão, Austrália, bem como na Europa, a doença era descrita e reconhecida como diferentes tipos de febres, muitas vezes associadas à ocupação, estação do ano e duração da doença, antes mesmo de identificar o agente etiológico (ADLER, 2015).

Em 1907, Stimson visualizou pela primeira vez leptospiras a partir de amostras renais de um paciente que ele descreveu ter morrido de febre amarela, chamando-as *"Spirocheta interrogans"*. Em seu trabalho, ele descreveu a forma das bactérias e a disposição delas no órgão, presentes no lúmen dos túbulos renais e não sendo visualizadas em outras regiões, como os glomérulos. Além disso, ele também analisou outros órgãos desse paciente como coração, fígado, cérebro e vasos sanguíneos sem encontrar leptospiras (STIMSON, 1907). Apesar da importância da sua descrição, seu trabalho permaneceu esquecido até meados dos anos 60, onde só então foi reconhecido como a primeira demonstração de leptospiras (ADLER, 2015).

Em 1915 no Japão, onde a doença de Weil era endêmica, Inada e colaboradores infectaram cobaios a partir do sangue de pacientes com a Doença de Weil, identificando o agente etiológico como *"Spirochaeta Icterohaemorrhagiae"* (INADA et al., 1916). Através dos estudos desse grupo em especial, foi possível o entendimento do modo de infecção, distribuição pelos tecidos, divisão de leptospiras, excreção e características morfológicas, incluindo a degeneração das células nas culturas (ADLER, 2015). Além disso, eles também demonstraram o papel dos ratos como reservatórios do agente causador da leptospirose,

possibilitando o entendimento dos princípios epidemiológicos da doença (IDO et al., 1917).

O entendimento da associação da doença com condições ambientais passou a ser reconhecido somente entre 1920-1960, quando foram então esclarecidos os agentes etiológicos bem como os reservatórios animais, o que levou a compreensão que a leptospirose não é uma doença ocupacional somente e, sim, associada a ambientes propícios a infecção. A partir dos anos 50 e até a década de 70, houve o aumento na conscientização ecológica da leptospirose em países tropicais (ADLER, 2015).

2.3. Agente etiológico (*Leptospira* sp)

O gênero *Leptospira* pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e atualmente compreende 22 espécies, sendo 10 espécies patogênicas (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. kmetyi*, *L. alstonii e L. mayottensis*) 5 espécies intermediárias (*L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* e *L. licerasiae*) e 7 espécies saprófitas (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. idonii* e *L. yanagawae*) (BOURHY et al., 2014). As leptospiras patogênicas possuem a capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros mamíferos e, algumas espécies sobrevivem no meio ambiente por longos períodos (ADLER, 2015). Existem mais de 260 sorovares relacionados para as espécies patogênicas, bem como mais de 60 sorovares associados às espécies saprófitas (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

As leptospiras são bactérias móveis, espiraladas e flexíveis, impulsionadas por um mecanismo flagelar, onde cada um dos dois flagelos periplasmáticos estão localizados nas extremidades do microrganismo. Possuem de 10 a 20µm de comprimento e 0,1µm de diâmetro e curvatura em forma de gancho em uma ou nas duas extremidades. As bactérias que são isoladas diretamente dos hospedeiros mamíferos, tendem a ser mais curtas e mais espiraladas do que as cepas mantidas com diversas passagens *in vitro* no laboratório (ADLER, 2015).

A partir do sequenciamento dos genomas das espécies *L. biflexa* e *L. interrogans*, demonstrou-se que leptospiras possuem o maquinário completo para

utilização de glicose como fonte de energia primária. Porém, elas não são capazes de utilizar a glicose devido a limitações do sistema de absorção de glicose (NASCIMENTO et al., 2004). Ao invés das vias comuns de oxidação de açucares, elas realizam a beta-oxidação de ácidos graxos de cadeia longa provenientes de meios de cultura enriquecidos ou dos ambientes naturais onde elas estão presentes, adquirindo as fontes de carbono e energia essenciais para o seu metabolismo (ADLER, 2015). O genoma também possui um conjunto completo de genes relacionados ao transporte de elétrons da cadeia respiratória e do ciclo do ácido tricarboxílico, uma vez que são microrganismos aeróbicos (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004). Além disso, necessitam também de uma fonte de nitrogênio, frequentemente fornecido pela adição de amônia aos meios de cultura (ADLER, 2015).

2.4. Cultivo *in vitro* de leptospiras

O meio EMJH descrito por Ellinghausen e McCullough e, posteriormente aprimorado por Johnson e Harris, é um meio de cultura basal sintético baseado em ácido oleico, albumina de soro bovino como desintoxicante de ácidos graxos, polissorbato (Tween) como fonte de carbono e energia, cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, tampão de fosfato e tiamina, suplementado com sais e diversas vitaminas (ELLINGHAUSEN e MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON e HARRIS, 1967). A partir da sua última formulação, o meio de cultura EMJH tornou-se amplamente utilizado no cultivo de leptospiras (ADLER, 2015). Porém, o cultivo *in vitro* de leptospiras é difícil de ser realizado, sensível e fastidioso, necessitando até 16 semanas de incubação quando utiliza meios de cultura enriquecidos e frequentemente ocorre contaminação por outras bactérias (BHARTI et al., 2003), o que pode acarretar problemas qualitativos e quantitativos nas culturas de leptospiras. Uma opção para reduzir o crescimento de contaminantes a partir de espécimes clínicos pode ser por meio da adição de antibióticos seletivos, como o 5-fluorouracil (ADLER, 2015). Para o isolamento inicial a partir de amostras animais, a adição de piruvato ou soro de coelho proporciona maior crescimento de algumas cepas (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010) e o ferro é componente essencial (ADLER, 2015).

As espécies saprófitas de *Leptospira* spp. são capazes de crescer em temperaturas de 11ºC a 13ºC, apesar do ótimo crescimento acontecer entre 28ºC e 30ºC. Entretanto, as cepas patogênicas não crescem em temperaturas mais baixas, e classicamente são mantidas a temperaturas entre 28ºC e 30ºC, com a possibilidade de cultivo à 37ºC, sempre utilizando inóculos iniciais de 1-10% do volume final de meio fresco (ADLER, 2015).

O crescimento *in vitro* de leptospiras é muitas vezes lento no isolamento primário a partir de espécimes clínicas, sendo necessária a conservação das culturas durante várias semanas antes de serem descartadas (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Em meios semissólidos, o crescimento atinge uma densidade máxima na zona abaixo da superfície do meio, que se torna cada vez mais turva durante o período de incubação. Isto está relacionado com a concentração ótima de oxigênio e, ocasiona a formação de um disco conhecido como anel ou disco de Dinger. As culturas são mantidas através de diversas passagens em meio líquido ou pelo armazenamento em meio semissólido. Em longo prazo, a estocagem ideal é em nitrogênio líquido, que proporciona bons resultados e é o método indicado para manter a virulência (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

3. Materiais e Métodos

3.1. Meios de Cultura

Dois meios de cultura foram utilizados para estudar o perfil de crescimento *in vitro* da espécie patogênica *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130: EMJH caseiro e EMJH comercial (Difco). Os ingredientes para os meios de cultura EMJH caseiro e comercial estão descritos na tabela 1.

O meio líquido EMJH comercial foi preparado com 2,3g de meio EMJH base (Difco) diluídos em 900ml de água ultrapura, o pH foi ajustado para 7.4 e, o meio de cultura esterilizado através de autoclavagem por 20 minutos à 121ºC. Após a esterilização, foi adicionado 10% de suplemento comercial (Difco). O meio EMJH caseiro foi preparado com 1g de fosfato de sódio, 0,3g de fosfato de potássio monobásico e 1g de cloreto de sódio em 1L de água ultrapura. Foram adicionados 1ml de glicerol 10% e 1ml de cloreto de amônio, o pH ajustado para 7.4 e o meio foi filtrado. Após a filtração, foram adicionados 10% de suplemento caseiro e 1% de soro de coelho estéril e, novamente, foi realizada a esterilização do meio de cultura por filtração com filtros 0,22µm.

Tabela 1 – Ingredientes que compõem os meios de cultura EMJH comercial (Difco) e EMJH caseiro

EMJH comercial (Difco)*	**EMJH caseiro****
Fosfato monopotássico Cloreto de sódio Cloreto de amônio Fosfato dipotássico Tiamina	Fosfato monopotássico Cloreto de sódio Cloreto de amônio Fosfato de sódio Glicerol 10% Hidrolase lactoalbumina Piruvato de sódio Superóxido dismutase
Suplemento: Albumina bovina, Tween 80 e fatores de crescimento para leptospiras.	
	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 e 1% de soro de coelho estéril.

* Informado pelo fabricante, Anexo A
** Conforme Anexo B; adaptado de Grassmann et al (2015)

3.2. Curvas de crescimento bacteriano

As alíquotas congeladas em nitrogênio líquido do estoque de cepas do Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas (UFPel), foram descongeladas em temperatura ambiente e adicionadas a 5ml de EMJH comercial e, posteriormente, incubadas por 16h a 28ºC. No dia seguinte, foi realizada a passagem desta cultura para os meios de cultura EMJH caseiro e comercial, nos diferentes recipientes utilizados para o cultivo (tubos de fundo cônico de 15ml e frascos de cultivo celular) e em diferentes quantidades de inóculos iniciais. Os tubos ficaram estáticos ou agitados na incubadora e, os frascos de cultivo celular ficaram estáticos durante a incubação. As curvas de crescimento foram realizadas com inóculos iniciais de 10^4, 10^5 e 10^6 leptospiras/ml. O inóculo foi feito no dia 0 e a primeira contagem entre os dias 01 e 04 da curva de crescimento. O crescimento bacteriano foi acompanhado através de contagens diárias em microscópio de campo escuro utilizando câmara de Petroff-Hausser, até a fase de declínio da curva de crescimento. As contagens foram realizadas através de diluição seriada de 1:10, 1:100 e 1:1000 conforme a densidade celular, de forma a contar entre 10 e 100 leptospiras na área delimitada pela câmara de Petroff-Hausser. O cálculo de densidade bacteriana na cultura foi realizado considerando: n° de leptospiras no quadrante delimitado pela câmara × fator de diluição × 5×10^4 = n° de leptospiras/ml de cultura. Para cada condição, as análises foram realizadas em triplicata, ou seja, 3 culturas diferentes foram mantidas em crescimento. As curvas de crescimento foram realizadas sob as temperaturas de 28ºC e 37ºC.

3.3. Testes de diferentes densidades iniciais para o cultivo

Para determinar o crescimento de leptospiras a partir de diferentes inóculos iniciais, 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 e 10^5 bactérias/ml de cultura foram inoculadas em 5ml totais de meio de cultura EMJH caseiro e comercial. Posteriormente, essas culturas foram incubadas a 28ºC ou 37ºC e, avaliadas diariamente, coletando 5µl de cultura para análise em microscopia de campo escuro, buscando observar leptospiras (análise qualitativa). As culturas foram avaliadas buscando a presença de leptospiras até 10 semanas após o início do cultivo.

3.4. Análises dos dados

Os dados obtidos nas curvas de crescimento foram avaliados utilizando o software GraphPad Prism 5, para a análise dos dados, montagem das curvas de crescimento bacteriano e o cálculo de taxa de duplicação das bactérias.

4. Resultados

A curva de crescimento realizada com inóculo inicial de 10^4 leptospiras/ml apresentou um crescimento bacteriano com concentrações máximas na fase exponencial de 6×10^8 leptospiras/ml, no oitavo dia da curva de crescimento em meio de cultura EMJH caseiro a 37ºC. Porém, após alcançarem a concentração máxima de leptospiras nas culturas, estas entraram em fase de declínio rapidamente a partir do décimo dia. Diferente disso, as culturas submetidas ao meio EMJH comercial a 37ºC não apresentaram crescimento visível, até mesmo 20 dias após o início da cultura. Para as outras condições de cultivo, neste mesmo dia, foram obtidas concentrações de $1{,}5\times10^8$ leptospiras/ml em meio caseiro e $1{,}4\times10^7$ leptospiras/ml em meio EMJH comercial, ambos a 28ºC (Figura 2).

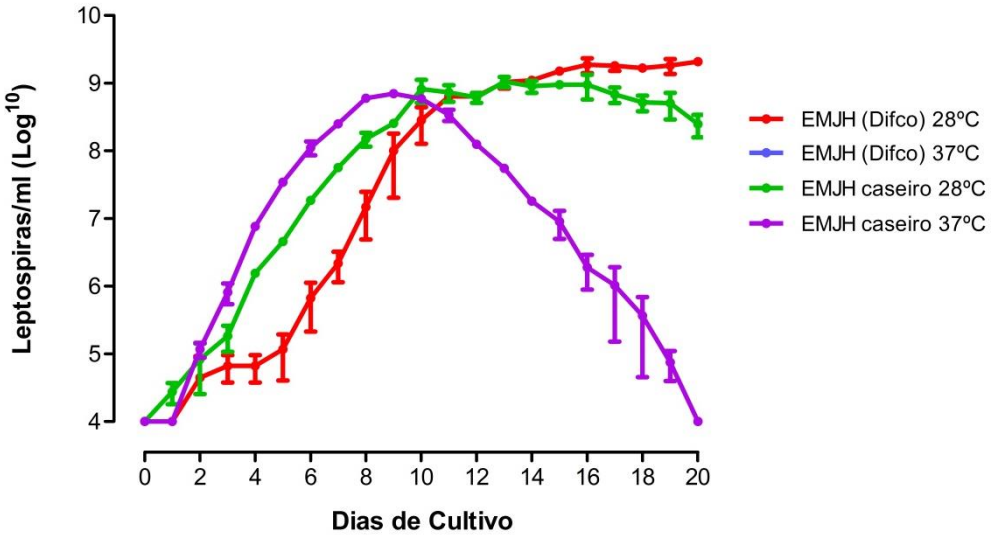

Figura 2 – Gráfico representando a curva de crescimento bacteriano para a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 nos meios de cultura EMJH caseiro e EMJH comercial (Difco), com inóculo de 10^4 leptospiras/ml, sob as temperaturas de 28ºC e 37ºC, em tubos de fundo cônico estáticos. As linhas representam a média de 3 culturas em cada condição e as barras o desvio padrão.

Como não foi possível visualizar o crescimento bacteriano no meio de cultura EMJH comercial a 37ºC com inóculo inicial de 10^4 leptospiras/ml, foram realizadas

duas curvas de crescimento com inóculos iniciais de 10^5 e 10^6 leptospiras/ml, respectivamente, somente para este meio e em tubos de fundo cônico estáticos, sob temperaturas de 28ºC e 37ºC. Com inóculo de 10^5 leptospiras/ml ainda não foi possível constatar a presença de leptospiras nas culturas (Figura 3A). Para as culturas inoculadas inicialmente com 10^6 leptospiras/ml, o crescimento foi visível, porém em todo o período de acompanhamento dessas culturas, elas apresentaram concentrações de leptospiras/ml inferiores, sendo a concentração máxima de 6×10^8 leptospiras/ml no dia 8 da fase exponencial, enquanto que sob a temperatura de 28ºC, a concentração de bactérias foi de 1×10^9 leptospiras/ml nesse mesmo dia, porém as culturas já estavam em fase estacionária de crescimento, como pode ser observado na Figura 3B.

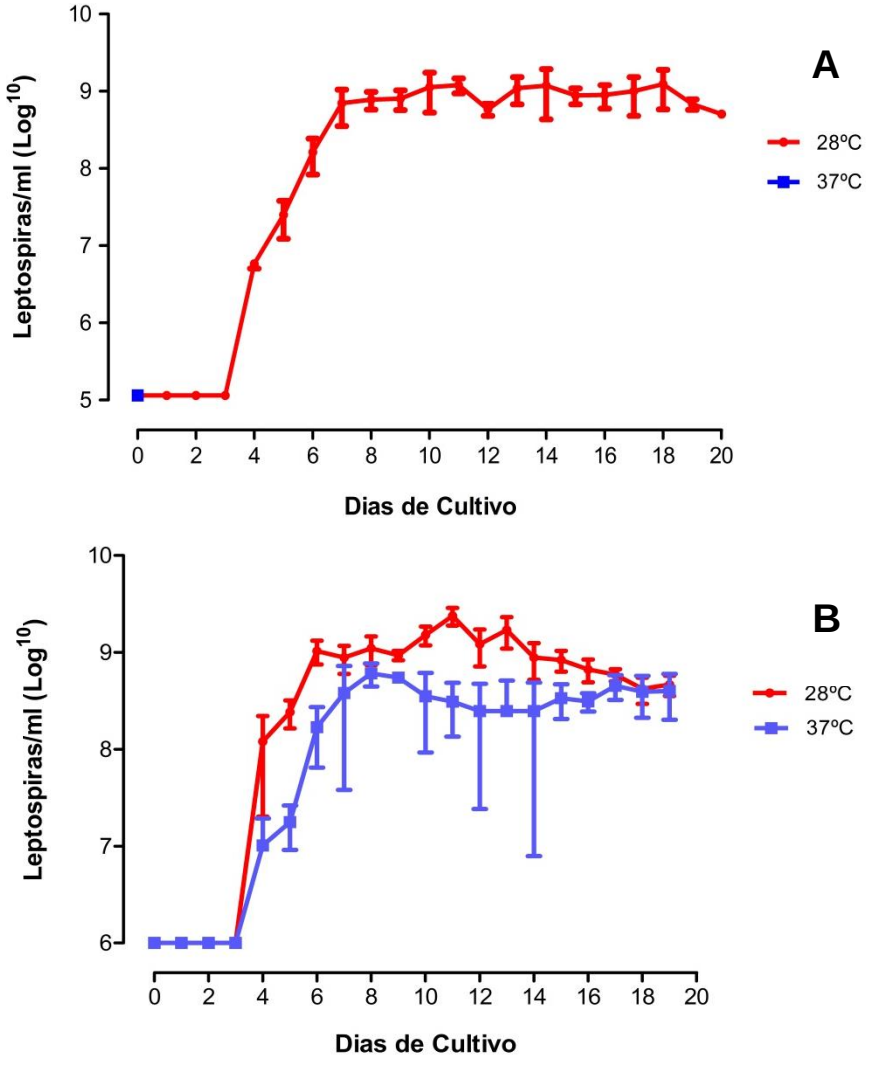

Figura 3 – Gráficos representando a curva de crescimento bacteriano para a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 em meio de cultura EMJH comercial (Difco) sob as temperaturas de 28ºC e 37ºC, em tubos de fundo cônico estáticos. A) Inóculo inicial de 10^5 leptospiras/ml; B) Inóculo inicial de 10^6 leptospiras/ml. As linhas representam a média de 3 culturas em cada condição e as barras o desvio padrão.

Nas curvas de crescimento bacteriano realizadas nos frascos de cultivo estáticos, tanto as culturas com o inóculo inicial de 10^4 leptospiras/ml (Figura 4A), quanto aquelas inoculadas com 10^5 leptospiras/ml (Figura 4B) em meio de cultura EMJH comercial, não apresentaram crescimento visível em ambas temperaturas. Para o meio EMJH caseiro, as culturas mantidas sob a temperatura de 37ºC apresentaram concentrações de $2{,}3\times10^8$ e $6{,}8\times10^8$ leptospiras/ml para os inóculos de 10^4 e 10^5 leptospiras/ml respectivamente, no oitavo dia da fase exponencial de crescimento. Enquanto que nas culturas mantidas a 28ºC nesse mesmo dia, foram obtidas concentrações de $2{,}5\times10^7$ e $2{,}4\times10^8$ leptospiras/ml com os inóculos iniciais de 10^4 e 10^5 leptospiras/ml. As culturas a 37ºC entraram em fase de declínio a partir do décimo dia de cultivo (Figura 4A e 4B).

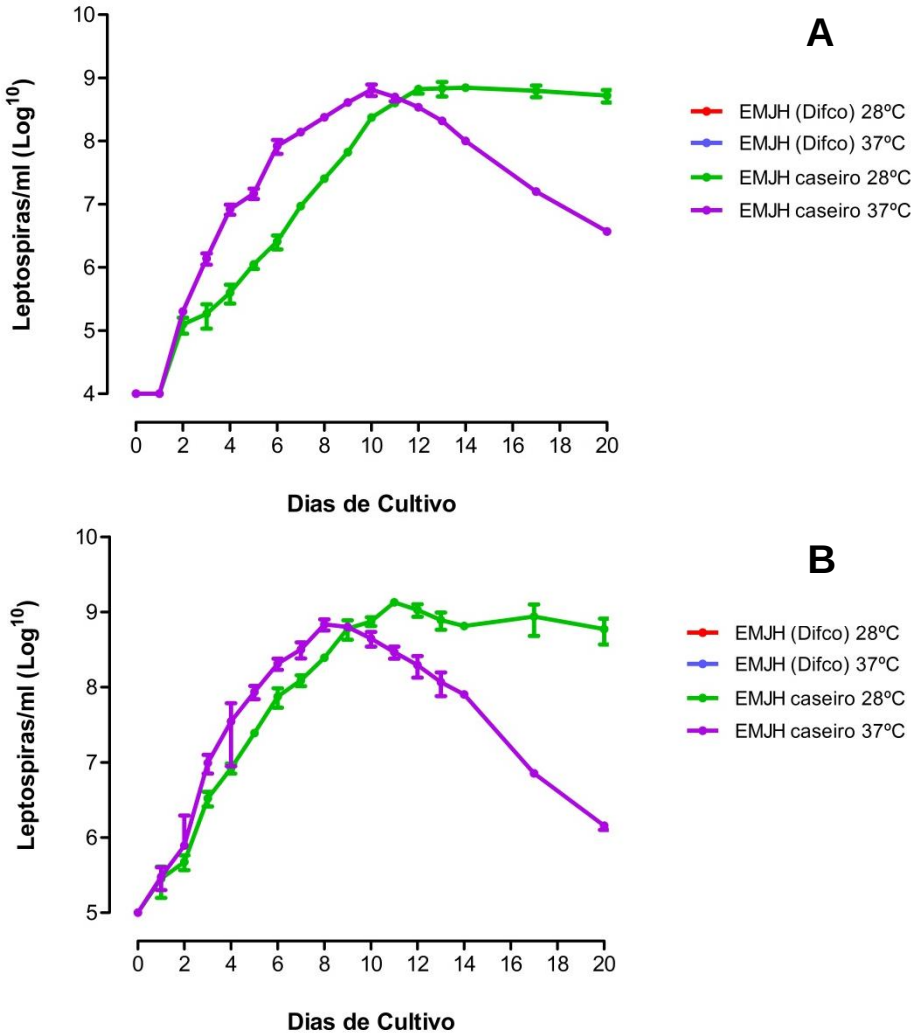

Figura 4 – Gráficos representando a curva de crescimento bacteriano para a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 nos meios de cultura EMJH caseiro e EMJH comercial (Difco) sob as temperaturas de 28ºC e 37ºC em frascos de cultivo celular. A) Inóculo inicial de 10^4 leptospiras/ml; B) Inóculo inicial de 10^5 leptospiras/ml. As linhas representam a média de 3 culturas em cada condição e as barras o desvio padrão.

As curvas realizadas em tubos de fundo cônico que permaneceram incubados sob agitação em ambas as temperaturas, estão representadas na Figura 5. Com inóculo inicial de 10^4 leptospiras/ml, as culturas do meio EMJH comercial mantidas a 28ºC cresceram a partir do quinto dia de incubação, porém, esse crescimento se deu somente em dois tubos da triplicata e não sendo semelhante entre eles, chegando à máxima concentração de $2,3\times10^8$ leptospiras/ml no dia 12 da fase exponencial da curva. Para as culturas do meio EMJH comercial a 37ºC, não houve o crescimento de leptospiras (Figura 5A). Com relação ao inóculo de 10^5 leptospiras/ml, somente as culturas do meio comercial a 37ºC não apresentaram crescimento (Figura 5B). O meio de cultura caseiro incubado a 37ºC apresentou concentrações de leptospiras/ml de $6,5\times10^8$ com inóculo inicial de 10^4 leptospiras/ml e $5,7\times10^8$ leptospiras/ml com inóculo inicial de 10^5 leptospiras/ml, no nono dia da curva de crescimento bacteriano, ainda em fase exponencial. Porém, da mesma forma que observado anteriormente, as culturas entraram em fase de declínio rapidamente. O meio caseiro incubado a 28ºC apresentou densidade máxima de $6,3\times10^8$ leptospiras/ml com inóculo inicial de 10^4 leptospiras/ml e $8,3\times10^8$ leptospiras/ml com inóculo de 10^5 leptospiras/ml, no dia 12 da curva, já em fase estacionária de crescimento.

Para os testes de crescimento após inóculos iniciais variáveis, todos os inóculos testados em meio de cultura EMJH caseiro, incubados em ambas temperaturas, apresentaram crescimento visível sob microscopia de campo escuro até 8 dias após o inóculo ter sido realizado, especialmente sob temperatura de 37ºC. Diferente disso, somente os inóculos de 10^4 e 10^5 leptospiras/ml apresentaram crescimento no meio de cultura EMJH comercial sob temperatura de 28ºC e com inóculo de 10^4 leptospiras/ml, esse crescimento somente foi visível 14 dias após o inóculo ter sido realizado. As culturas mantidas a 37ºC em meio comercial, não apresentaram crescimento, mesmo após 10 semanas de observação.

As menores taxas de tempo de duplicação dos microrganismos nas culturas foram observadas em meio EMJH caseiro, sob todas as condições submetidas, especialmente nas culturas incubadas a temperatura de 28ºC em tubos com agitação ou frascos de cultivo, como pode ser observado na Tabela 2.

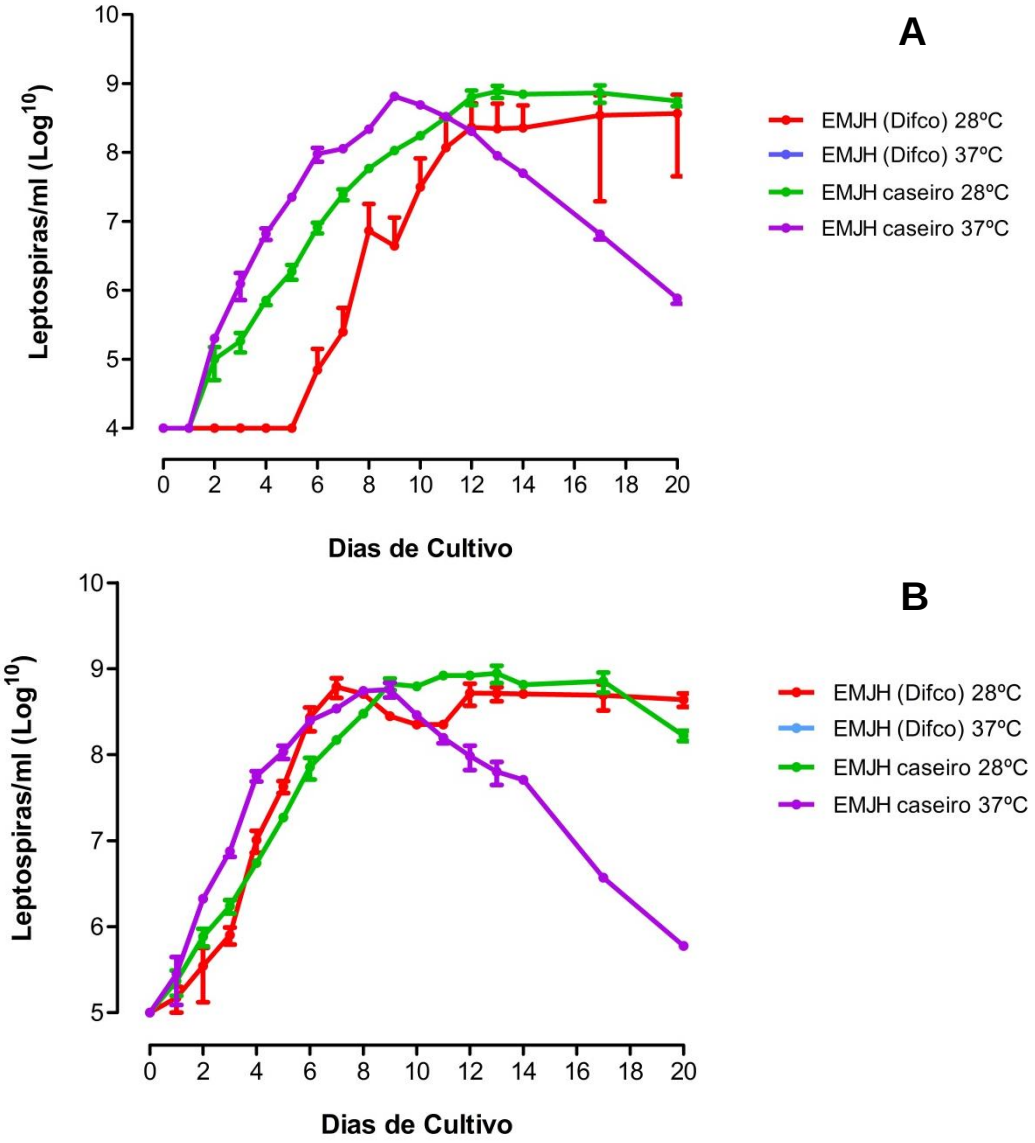

Figura 5 – Gráficos representando a curva de crescimento bacteriano para a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 nos meios de cultura EMJH caseiro e EMJH comercial (Difco) sob as temperaturas de 28ºC e 37ºC em tubos de fundo cônico com agitação. A) Inóculo inicial de 10^4 leptospiras/ml; B) Inóculo inicial de 10^5 leptospiras/ml. As linhas representam a média de 3 culturas em cada condição e as barras o desvio padrão.

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

EMJH	**Tubos sem agitação**				**Frascos de cultivo**				**Tubos com agitação**			
	28ºC		**37ºC**		**28ºC**		**37ºC**		**28ºC**		**37ºC**	
	10^4	**10^5**	**10^4**	**10^5**	**10^4**	**10^5**	**10^4**	**10^5**	**10^4**	**10^5**	**10^4**	**105**
Comercial	33,4	50,6	-	-	-	-	-	-	22,6	26,2	-	-
Caseiro	40,6	-	58,3	-	19,9	24	21,6	28,6	19,9	24,2	22,8	30,5

5. Discussão

Apenas os organismos capazes de existir ou adaptar-se às condições *in vitro* serão selecionados a crescer em culturas laboratoriais, bem como, aqueles capazes de infectarem seus hospedeiros, exercerão um papel patogênico. Portanto, os meios e condições de cultivo influenciam o conhecimento a respeito dos microrganismos, criando ambientes artificiais na intenção de imitar as condições naturais.

O meio de cultura EMJH comercial utilizado em nosso estudo, não apresenta a composição completa do suplemento nos manuais fornecidos pelo fabricante. O meio de cultura caseiro descrito por Grassmann et al (2005) e utilizado neste trabalho é um meio mais barato que o EMJH disponível comercialmente, apresentando ainda uma composição química diferencial (GRASSMANN et al., 2015). A suplementação do meio com soro de coelho, associado aos diferentes reagentes que beneficiam o rendimento celular nas culturas, pode ter levado ao crescimento diferencial que este meio proporcionou. Isso reflete principalmente nos inóculos iniciais reduzidos, de até 10^0 leptospiras/ml, que esse meio proporcionou como demonstrado em nosso trabalho. Essa característica do meio de cultura EMJH caseiro de possibilitar o crescimento de inóculos reduzidos, que não foi vista no meio comercial, o torna mais eficiente para a realização de isolamento de leptospiras diretamente de animais ou tecidos infectados, onde não é possível determinar quantas leptospiras estão presentes na amostra.

O cultivo padrão de leptospiras em meio EMJH comercial é realizado com mais de 5 dias de cultivo e utilizando 10% de volume para o repique das culturas (ZUERNER, 2005). Nesse período, conforme evidenciado neste trabalho, as culturas já estão com concentrações de quase 10^8 leptospiras/ml, próximo de entrar em fase estacionária. Na fase estacionária, já existe grande quantidade de células mortas, sendo uma característica progressiva desta fase. Os dados apresentados neste trabalho representam um importante guia para delineamento de experimentos, onde,

conforme o objetivo pode ser buscado um inóculo inicial específico e uma condição específica de cultivo para obter uma quantidade de células suficientes, na fase de crescimento desejado. Uma hipótese pertinente é a possível existência de diferenças na virulência das espécies patogênicas nas diferentes fases da curva de crescimento. Nós acreditamos que as leptospiras em fase exponencial de crescimento sejam mais virulentas do que aquelas em fase estacionária, ou principalmente, em fase de declínio. Para testar essa hipótese é essencial que sejam realizados testes de virulência utilizando leptospiras oriundas das diferentes fases da curva de crescimento. A elucidação da relação inóculo inicial/fase de crescimento/virulência das leptospiras têm potencial para contribuir na repetibilidade dos resultados de experimentos de infecção em modelos animais, como os testes de desafio na avaliação de vacinas experimentais contra a leptospirose.

As taxas de tempo de duplicação foram menores em meio de cultura EMJH caseiro quando associado a algum fator (frascos de cultivo ou tubos sob agitação) que proporcionou o aumento da aeração nas culturas. Como microrganismos aeróbicos, a concentração de oxigênio é um fator limitante para o crescimento de leptospiras e, a agitação orbital leve proporciona o aumento das taxas de crescimento (ADLER, 2015).

As variações de crescimento das culturas sob as diferentes temperaturas testadas levam a crer que a temperatura é um fator importante para o crescimento de leptospiras, quando associada ao meio de cultura EMJH comercial (Difco). Este meio só apresentou crescimento a partir de inóculos de 10^6 leptospiras/ml quando incubado sob temperatura de 37ºC e, ainda, as concentrações de leptospiras foram inferiores aquelas obtidas a 28ºC. Com inóculos iniciais reduzidos, não houve o crescimento de leptospiras, levando a especulação de que nesse meio possa existir a ausência de algum nutriente ou fator ambiental que proporcione o crescimento de leptospiras a 37ºC a partir de inóculos iniciais reduzidos.

Ao contrário do que foi visto no meio comercial, em meio EMJH caseiro as maiores densidades de leptospiras foram vistas sob a temperatura de 37ºC, apesar das culturas crescerem bem a 28ºC. As vantagens de cultivar leptospiras sob temperatura de 37ºC foram evidenciadas em ensaios de microarranjos *in vitro*, onde foi comparado a expressão genica diferencial de leptospiras crescidas a 28ºC e 37ºC (LO et al., 2006; QIN et al., 2006). Leptospiras crescidas a 37ºC aumentaram a expressão de genes relacionados à patogenicidade e virulência (LO et al., 2006; QIN

et al., 2006), da mesma forma que leptospiras adaptadas ao hospedeiro mamífero, onde a troca de temperatura de 28 para 37°C é um dos fatores que influenciam no processo (CAIMANO et al., 2014). Na transição do ambiente natural para um estado infeccioso dentro do hospedeiro, o metabolismo de leptospiras deve se ajustar para o uso dos nutrientes disponíveis dentro do hospedeiro mamífero. Caimano et al (2014) mostraram que a maioria dos genes implicados no metabolismo de leptospiras, foram expressos semelhantemente *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que o meio EMJH caseiro, utilizado nesse trabalho, refletiu uma composição de nutrientes semelhantes a encontrada no hospedeiro mamífero. Analisando essas informações conjuntamente, é possível que as leptospiras cultivadas a 37ºC em meio de cultura EMJH caseiro, sejam mais virulentas do que aquelas mantidas sob cultivo padrão designado até então em laboratório, EMJH (Difco) associado a temperatura de 28ºC-30ºC.

6. Conclusões

O meio de cultura EMJH caseiro proporcionou o crescimento de leptospiras, apresentando concentrações superiores de leptospiras na fase exponencial da curva de crescimento, quando comparado ao meio EMJH comercial.

Inóculos reduzidos de leptospiras cresceram em EMJH caseiro, especialmente a 37ºC. O mesmo crescimento não foi possível em meio EMJH comercial, em ambas as temperaturas.

As taxas de tempo duplicação das bactérias foram mais baixas em meio EMJH caseiro, especialmente quando este foi associado a algum fator que proporcione maior aeração das culturas.

Referências

ADLER, B. ***Leptospira* and Leptospirosis**. 2015 (Current Topics in Microbiology and Immunology)

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

AHMED, N., et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.5, p. 28. 2006.

BHARTI, A. R., et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v.3, n.12, p. 757-71. 2003.

BOURHY, P., et al. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.64, n.Pt 12, p. 4061-7. 2014.

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**, v.10, n.3, p. e1004004. 2014.

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

CRODA, J. Patôgenese da síndrome pulmonar hemorrágica na leptospirose humana Faculdade de Medicina Universidade Federal de São Paulo, 2008.

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. **Am J Vet Res**, 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.in press, p. 2015.

HAAKE, D. A., et al. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. **Clin Infect Dis**, v.34, n.9, p. e40-3. 2002.

IDO, Y., et al. The Rat as a Carrier of *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*, the Causative Agent of Weil's Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica). **J Exp Med**, v.26, n.3, p. 341-53. 1917.

INADA, R., et al. The Etiology, Mode of Infection, and Specific Therapy of Weil's Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica). **J Exp Med**, v.23, n.3, p. 377-402. 1916.

JOHNSON, R. C. e HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic letospires. I. Growth at low temperatures. **J Bacteriol**, v.94, n.1, p. 27-31. 1967.

KO, A. I., et al. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v.7, n.10, p. 736-47. 2009.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p. 296-326. 2001.

LO, M., et al. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. **Infect Immun**, v.74, n.10, p. 5848-59. 2006.

MCBRIDE, A. J., et al. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, p. 376-86. 2005.

NASCIMENTO, A. L., et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J Bacteriol**, v.186, n.7, p. 2164-72. 2004.

ORGANIZATION, W. H. *Report of the second meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group*. p.37. 2011

PAPPAS, G., et al. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **Int J Infect Dis**, p. 2007.

PICARDEAU, M., et al. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.78, n.1, p. 1-8. 2014.

QIN, J. H., et al. Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar lai strain 56601. **BMC Microbiol**, v.6, p. 51. 2006.

REN, S. X., et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v.422, n.6934, p. 888-93. 2003.

SAÚDE, M. D. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 30 Ago. 2015.

STIMSON, A. M. Note on an organism found in Yellow-fever tissue. **Public Health Reports** v.22, p. 1907.

YANG, C.-W., et al. Leptospirosis renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.16, n.Supplement 5, p. 73-77. 2001.

ZUERNER, R. L. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. **Curr Protoc Microbiol**, v.Chapter 12, p. Unit 12E.1. 2005.

Anexos

Anexo A – Protocolo de preparação do meio de cultura EMJH comercial

Protocolo para o preparo de meio de cultura EMJH comercial (Difco)

A – Preparação do meio base EMJH Difco

1. Adicionar 2,3g de meio base em 900ml de água ultrapura, agitando lentamente para não formar espuma.

2. Ajustar o pH para 7,4.

3. Autoclavar o meio base por 20min à 121ºC.

4. Aguardar o meio base esfriar a temperatura ambiente e, adicionar assepticamente 100ml do suplemento EMJH Difco.

5. Estocar à 4ºC.

Anexo B – Protocolo de preparação do meio de cultura caseiro

Protocolo para o preparo de meio de cultura EMJH caseiro (GRASSMANN, 2015)

A. Soluções estoque para o meio EMJH:

Sulfato de Zinco ($ZnSO_4.7H_2O$) – Sigma cat#Z0251

0.4g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Cloreto de Cálcio ($CaCl_2.2H_2O$) – Fisher cat#C-79

1,0g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Cloreto de Magnésio ($MgCl_2.6H_2O$) – Fisher cat#BP214

1.0g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Cloreto de Tiamina – Sigma cat#T1270

0.5g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Vitamina B12 – Sigma cat#V-6629

0.02g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Sulfato de Manganês ($MnSO_4.H_2O$) – Sigma cat#8179

0.36g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Sulfato de Ferro ($FeSO_4.7H_2O$) – Sigma cat#F-7002

0.5g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Preparar essa solução no dia que o suplemento for preparado. Filtrar com filtro de 0.22µm.

Solução de Glicerol 10% – Fisher cat#BP229

10ml em 100ml totais de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Solução de Cloreto de Amônio (NH_3Cl) 25% – Sigma cat#A-5666

25g in 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Tween 80 – Sigma cat#P-4780

20ml em 180ml de água ultrapura. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Solução estoque de 5-Fluorouracil (5-FU) – Sigma cat#F6627

Dissolver 1g de 5-FU em 80ml de meio basal filtrado (ver abaixo) a 37°C durante pelo menos 1 hora. Ajustar o pH para 7.4 usando HCl 1N (filtrado) e adicionar ao meio basal para um volume final de 100ml. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C. A concentração final deverá ser 10µg/ml.

Superóxido dismutase – Sigma cat#S5395-75KU

Dissolver 10mg/ml em PBS. Filtrar com filtro de 0.22µm. Adicionar 100µl (0.001g) para 100ml de suplemento.

B. Preparação do EMJH Suplemento

1. Adicionar 100g Albumina bovina fração V (Millipore Probumin® Universal Grade cat# 810037) lentamente para 500ml de água destilada. Agitar lentamente para evitar a formação de espuma. Alternativamente, adicionar o BSA a água e manter overnight a 4°C. Agitar lentamente enquanto a solução aquece sob temperatura ambiente.

   Nota: A qualidade da albumina utilizada para o cultivo de leptospira é crítica. Por favor verifique se a albumina utilizada para implantação de DMC suporta o crescimento de leptospiras virulentas sob o padrão de crescimento em condições in vitro. Outras fontes de BSA foram testadas (por exemplo, Millipore Probumin® Vacina Grau Cat # 840644 e Sigma-Aldrich cat # A-9647) com resultados semelhantes.

2. Quanto a BSA estiver totalmente dissolvida, adicionar lentamente as seguintes soluções estoque, em ordem, enquanto mantem a agitação. Aguardar no mínimo 10min antes de adicionar cada reagente. Continue agitando por uma hora.

Cloreto de Tiamina	10ml
Cloreto de Cálcio	10ml
Cloreto de Magnésio	10ml

Sulfato de Zinco	10ml
Sulfato de Manganês	1ml
Sulfato de Ferro	100ml
Vitamina B12	10ml
Tween 80 (para EMJH)	125ml

3. Ajustar o pH para 7.4 com NaOH 10% (filtrado).

4. Ajustar o volume para 1L.

5. Filtrar através de unidade de filtração com filtro 0.22µm (Millipore Stericup®) e aliquotar assepticamente em tubes cônicos de 50ml. Estocar a -20°C.

C. Preparação do meio base EMJH

1. Antes de iniciar, autoclavar 1L de água ultrapura em um becker de 2L, com uma barra magnética dentro. Deixar esfriar a temperatura ambiente (pode deixar overnight em cabine de biossegurança).

2. Pesar e adicionar para 1L de água autoclavada:

Fosfato dissódico (Na_2HPO_4) – Sigma cat#RES20908-A702X	1.0g
Fosfato Monopotássico (KH_2PO_4) – Sigma cat#P5655	0.3g
Cloreto de Sódio (NaCl) - Sigma cat#746398	1.0g

3. Adicionar as seguintes soluções de estoque filtradas:

Glicerol 10%	1.0ml
Cloreto de Amônio 25%	1.0ml

4. Mexer até os ingredientes dissolverem totalmente.

5. Ajustar o pH para 7.4 usando NaOH 10% (filtrado).

6. Se não usar imediatamente, filtrar através de unidade de filtração com filtro 0.22µm (Millipore Stericup®) e estocar a 4°C. Pode ser usado imediatamente para a preparação do meio completo.

D. Preparação do meio EMJH Completo

1. Autoclavar 1 becker vazio de 200ml com uma barra magnética dentro.

2. Descongelar 100ml de suplemento e 10ml de soro de coelho normal (NRS) para cada 1L final de meio EMJH completo. Transferir o suplemento para o becker autoclavado.

3. Adicionar a seguir:

Lactalbumina hidrolase	(BD cat#259962)	1g
Piruvato de Sódio (Sigma cat# P2256)		0.04g
Superóxido dismutase		0.001g (ou adicionar 100ul da solução de estoque)

4. Adicionar 10ml de NRS e 10ml de 5-FU solução de estoque para 100ml de suplemento.

5. Combinar 880ml de meio base EMJH e 120ml totais de suplemento + NRS + 5-FU.

6. Filtrar através de unidade de filtração com filtro 0.22µm (Millipore Stericup®).

7. Estocar a 4°C.