

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**ANÁLISE DE DOIS SOROVARES DE LEPTOSPIRAS APÓS
DIFERENTES PROTOCOLOS DE CONGELAMENTO.**

CARLA JANEIRO COIRO

Botucatu

2011

CARLA JANEIRO COIRO

**ANÁLISE DE DOIS SOROVARES DE LEPTOSPIRAS APÓS
DIFERENTES PROTOCOLOS DE CONGELAMENTO.**

Trabalho de conclusão da Residência em Medicina Veterinária apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para a obtenção do título de residente em Medicina Veterinária.

Área de Zoonoses e Saúde Pública

Preceptor: Prof. Titular Helio Langoni

Botucatu

2011

COIRO, CARLA JANEIRO. Análise de dois sorovares de leptospiras após exposição a diferentes protocolos de congelamento, 2011. 28 p. Trabalho de conclusão do segundo ano da Residência em Medicina Veterinária (área de Zoonoses e Saúde Pública) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade "Julio de Mesquita Filho".

RESUMO

A adequada preservação de qualquer micro-organismo implica em sua manutenção correta, mantendo as cepas vivas e geneticamente estáveis. As bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira* são mantidas em laboratório através de métodos tradicionais, por repiques em meio de cultivo específicos, no entanto, estas são técnicas trabalhosas, caras, e que podem acarretar em perdas nas características genéticas. O presente estudo tem como objetivo comparar duas técnicas de congelamento de dois sorovares (Hardjo e Copenhageni), congelados em nitrogênio líquido e freezer a – 70°C, utilizando como agentes crioprotetores o DMSO 5% e o glicerol 10%. A viabilidade bacteriana das cepas foi avaliada antes e depois do congelamento (1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias). As associações das variáveis (concentração e motilidade) com o reagente criopreservador, tempo de descongelamento e método de congelamento foram realizadas pelo método de Qui-quadrado (χ^2) para todas as amostras. A técnica de preservação com o DMSO a 5% assegurou uma alta taxa de recuperação da viabilidade dos dois sorovares testados, enquanto que o glicerol a 10% gerou uma diminuição na viabilidade final das cepas. Não houve alterações significativas nos resultados quando comparados os métodos de congelamento. O método de criopreservação mostrou-se, portanto, ser a melhor técnica de conservação a longo prazo quando comparada com na manutenção tradicional realizada por cultivos periódicos.

Palavras-chave: *Leptospira* spp., nitrogênio líquido, glicerol, congelamento.

COIRO, CARLA JANEIRO. Análise de dois sorovares de leptospiras após exposição a diferentes protocolos de congelamento, 2011. 28 p. Trabalho de conclusão do segundo ano da Residência em Medicina Veterinária (área de Zoonoses e Saúde Pública) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade "Julio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

The proper preservation of any microorganism implies in its correct maintenance, keeping the strains alive and genetically stable. The bacterias belonging to the genus *Leptospira* are kept in laboratory by traditional methods, raises in specific culture medium, however these techniques are laborious, expensive and often can cause lost of the genetic traits. The present study aims to compare two freezing techniques of two serovars (Copenhageni e Hardjo), freezed in liquid nitrogen and freezer 70°C, by using as crioprotectants, DMSO 5% and Glicerol 10%. The viability of bacterial strains was checked after and before freezing (1, 3, 7, 15, 30 and 60 days). The associations of the variables (concentration and motility), with the cryopreserved reagent, time of thawing and freezing method were perfomed by using Chi-square for all samples. The preservation technique with DMSO 5% ensured a higher recovery viability rate of the two serovars tested, while glycerol 10% created a decrease in final results of viability of the strains. There were no significant changes in results when comparing the freezing methods. The cryopreservation has been, therefore, the best technique for long-term conservation when compared with to the tradicional maintenance performed by regular cultivation.

Key words: *Leptospira* spp., liquid nitrogen, glicerol, freezing.

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	6
1.INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivos Gerais.....	9
2.2 Objetivos Específico.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Sorovares.....	10
3.2 Cultivos bacterianos para criopreservação.....	10
3.3 Processo de Criopreservação.....	11
3.4 Avaliação da estabilidade e viabilidade das leptospiros.....	11
3.4.1Descongelamento dos sorotipos.....	11
3.4.2 Re- Isolamento.....	12
3.4.3 Contagem de leptospiros pós-congelamento.....	12
3.5 Análise Estatística.....	12
4.RESULTADOS.....	13
5. DISCUSSÃO.....	21
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1.	Associação entre os resultados da avaliação da concentração e o reagente criopreservador utilizado, independente do sorovar estudado.....	pág.14
Tabela 2.	Associação entre os resultados da avaliação da motilidade e o reagente criopreservador utilizado, independente do sorovar estudado.....	pág.14
Tabela 3.	Associação entre os resultados da avaliação da concentração do sorovar Hardjo e o reagente criopreservador utilizado.....	pág. 15
Tabela 4.	Associação entre os resultados da avaliação da motilidade do sorovar Hardjo e o reagente criopreservador utilizado.....	pág.15
Tabela 5.	Associação entre os resultados da avaliação da concentração e o método de congelamento utilizado, independente do sorovar estudado.....	pág.16
Tabela 6.	Associação entre os resultados da avaliação da motilidade e o método de congelamento utilizado, independente do sorovar estudado.....	pág.16
Tabela 7.	Associação entre os resultados da avaliação da concentração e o tempo de congelamento, independente do sorovar estudado.....	pág.17
Tabela 8.	Associação entre os resultados da avaliação da motilidade e o tempo de congelamento, independente do sorovar estudado.....	pág.17
Tabela 9.	Associação entre os resultados da avaliação da concentração do sorovar Copenhageni e o tempo de congelamento.....	pág.18
Tabela 10.	Associação entre os resultados da avaliação da motilidade do sorovar Copenhageni e o tempo de congelamento.....	pág.18
Figura1.	Distribuição da concentração e motilidade pós-congelamento, 7 dias e 15 dias re-inoculação para o sorovar Copenhageni.....	pág.19
Figura 2.	Distribuição da concentração e motilidade pós-congelamento, 7 dia se 15 dias re-inoculação para o sorovar Hardjo.....	pág.20

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de caráter mundial, que possui como agente etiológico as espécies patogênicas da bactéria do gênero *Leptospira spp* (PESCADOR et al., 2004). Esta enfermidade pode acometer o homem e diversas espécies animais, levando a icterícia, hemorragias, falência renal e a alterações na esfera reprodutiva, principalmente em rebanhos, com alto índice de mortalidade (FAINE et. al., 1999). A prova sorológica é o método diagnóstico mais comumente utilizado, porém outras provas podem ser realizadas, como o isolamento de leptospiros a partir de tecidos e amostras clínicas, de vital importância para o diagnóstico definitivo da infecção, apesar de apresentar limitações na prática. (WHO, 2003). O tipo de método utilizado vai depender principalmente da disponibilidade de material fornecido e da experiência profissional de cada laboratório. (VICTORIA et al., 2002)

Uma das grandes dificuldades, porém de se manter o diagnóstico de leptospirose em humanos e animais está diretamente ligada à manutenção das culturas, com os diferentes tipos de sorovares usados como antígeno (HIGUERA et al., 2008). Essa conservação requer passos seriados em meios de cultivo específicos, em curtos períodos de tempo, o que dispende altos investimentos e cautela durante a manipulação (LEVETT, 2003). Os principais meios usados são: o EMJH (líquido) e o FLETCHER (semi-sólido), necessitando de novas passagens em intervalos regulares de 1 a 3 semanas e de 3 meses, respectivamente para cada meio (ALEXANDER, 1991).

Além disso, outros inconvenientes podem ser citados tais como, o tempo consumido para a sua realização (especialmente em laboratórios com coleções contendo grande número de sorovares), o risco de infecção do profissional que manipula as cepas, o risco de contaminação cruzada entre os sorovares, à possibilidade de perda da cepa por contaminação ou por alteração de suas características genéticas, e ainda a perda gradual da

patogenicidade da leptospira pelas várias passagens realizadas nos diferentes meios de cultura (FAINE et. al., 1999, OIE, 2008). É necessário, portanto, muita cautela e experiência para se obter uma adequada preservação destes micro-organismos, o que implica em manter a cepa viva, em estado puro e geneticamente estável (BAJAJ, 1995).

Devido às limitações apresentadas na manutenção destes sorotipos, diversos pesquisadores ao longo dos anos vêm testando formas de manter as leptospiros viáveis por longos períodos através do congelamento. Este processo é comumente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica permitindo a preservação de micro-organismos sem perda de suas características ou indução de mutações (ALBRECHT et al., 1973). Entretanto, apesar de diversos estudos o mecanismo exato do congelamento ainda é desconhecido (DUMONT et al., 2006).

Metodologias convencionais usadas para preservação por congelamento de outros micro-organismos, como o congelamento a -20°C ou -70°C em freezer, mostraram-se inconsistentes quando utilizadas para as leptospiros (BRIHUEGA et al., 1996), enquanto estudos realizados utilizando o nitrogênio líquido (-196°C) apresentaram resultados promissores (REED et al., 2000). Esta técnica tem sido recomendada fortemente como forma de congelamento para a preservação deste agente, não havendo ainda um protocolo único para a sua realização.

As diferenças existentes entre os protocolos estão ligadas ao tipo e concentração do criopreservador, a concentração inicial do inóculo e ao método de congelamento utilizado (rápido ou lento) (PALIT et al., 1986; REED et al., 2000).

O propósito de utilizar os criopreservadores é baixar o ponto de congelamento do citoplasma celular pelo aumento da concentração dos solutos intracelulares, ao mesmo tempo em que sua adição diminui o volume celular antes do congelamento (DUMONT et al., 2004), reduzindo dessa

maneira os efeitos da formação de cristais de gelo (ABLETT et al., 1992). Entretanto, sua utilização deve ser cuidadosa, pois em excesso pode desencadear processos tóxicos devido à concentração excessiva de eletrólitos intracelulares (MAZUR, 1970).

A criopreservação com glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO) tem oferecido excelentes resultados na preservação da viabilidade e da virulência, sendo estes os criopreservadores tradicionalmente empregados na atualidade para a conservação leptospiras a nível internacional (RODRÍGUEZ et al., 2006).

Investigações realizadas por Linscott e Boack (1960) e Coghlan (1967) demonstraram que a criopreservação de leptospiras a -70°C utilizando o glicerol como criopreservador, acabou por afetar a viabilidade destes micro-organismos, enquanto Palit *et al.* (1986) e Reed *et al.* (2000) obtiveram resultados promissores ao congelar leptospiras em nitrogênio líquido por longos períodos, mantendo a sua viabilidade e características genéticas.

Devido à necessidade de gerar métodos mais práticos e menos dispendiosos para a manutenção de cepas de *Leptospira* spp. em laboratório, o presente estudo tem como objetivo avaliar a eficácia do congelamento pela da comparação de quatro técnicas diferentes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a eficácia do processo de criopreservação de sorotipos de leptospiras utilizadas na rotina diagnóstica humana e animal, comparando dois tipos de criopreservadores diferentes congelados por intervalos de tempo pré-definidos em nitrogênio líquido e freezer a -70°C, de forma a obter um método alternativo, seguro e que mantenha os sorovares viáveis e com

suas características estruturais preservadas, por períodos prolongados, sem necessidade de manuseios regulares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade e virulência de dois sorovares de leptospiras (Hardjo e Copenhageni) pós- congelamento em nitrogênio líquido (-196° C) e em freezer (-70°C), utilizando dois criopreservadores diferentes adicionados em meio de EMJH.
- Avaliar a efetividade do glicerol na concentração de 10% e do DMSO na concentração de 5%.
- Avaliar a viabilidade dos sorovares citados após 1, 3, 7, 15, 30, 60 dias pós-congelamento pelo exame em microscopia de campo escuro, estabelecendo a concentração de leptospiras antes e depois do congelamento, bem como pelo re-isolamento em meio de EMJH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SOROVARES

Para o estudo da avaliação quantitativa e qualitativa da viabilidade das espiroquetas após o processo de criopreservação por diferentes intervalos de tempo em freezer (-70°C) e nitrogênio líquido (-196°C) foram usados os sorovares: Hardjo e Icterohaemorrhagiae, mantidos na bateria de antígenos utilizados na rotina de diagnóstico do Laboratório de Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO) da UNESP – Campus de Botucatu.

3.2 CULTIVOS BACTERIANOS PARA CRIOPRESERVAÇÃO

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio líquido de EMJH e mantidas em estufa a temperatura de 28°C a 30°C por 7 a 10 dias. Após este

período foram avaliadas características ligadas a motilidade e viabilidade das espiroquetas por observação direta em microscopia de campo escuro a fim de obter uma concentração viável para a realização do congelamento. A concentração utilizada no estudo foi de 10^8 cel/ml (FAINE et al., 1999), garantindo dessa maneira uma maior porcentagem de recuperação das cepas, pelo grande número de bactérias inoculadas no pré-congelamento (HECKLY, 1978). A pureza dos cultivos foi monitorada através de placas controles com infusão de cérebro e coração (BHI).

3.3 PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO

Avaliou-se a capacidade crioprotetora do glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 10% e 5%, respectivamente, quando acrescentados aos cultivos das duas cepas com a concentração de pelo menos 10^8 espiroquetas/ml. Alíquotas de 1ml foram dispensadas em criotubos estéreis de 2ml. Para cada sorovar foi congelado quatro criotubos diferentes, sendo um deles destinado ao armazenamento em freezer (-70°C) e outro em tanques de nitrogênio líquido quando acrescentados de DMSO e glicerol para cada intervalo de tempo estabelecido no estudo (totalizando 24 criotubos por sorotipo).

O método de congelamento estabelecido foi o gradual, no qual os criotubos permaneceram por período de trinta minutos em temperatura ambiente (Simione, 1998), e em seguida foram transferidos ao freezer (-70°C) por quatro horas. Os cultivos destinados ao congelamento em nitrogênio líquido foram armazenados após este período nos tanques a -196°C.

3.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E VIABILIDADE DAS LEPTOSPIRAS

3.4.1 DESCONGELAMENTO DOS SOROTIPOS

Cada cepa retirada do freezer e do tanque de nitrogênio foi submetida ao descongelamento rápido em banho-maria com agitação a 37°C.

3.4.2 RE-ISOLAMENTO

Após o descongelamento foram transferidos rapidamente 0,5 ml de cada sorotipo para 4,5 ml de meio EMJH a fim de minimizar a exposição das leptospiplas ao agente crioprotetor. Os novos cultivos foram armazenados em estufa com temperatura de 28°C a 30°C, sendo verificados diariamente durante 15 dias para observação macro e microscópica do agente.

3.4.3 CONTAGEM DE LEPTOSPIRAS PÓS-CONGELAMENTO

Os sorotipos criopreservados com DMSO e glicerol foram avaliados em oitos intervalos: 1, 3, 7, 15, 30, 60 dias pós-congelamento, sendo determinada a concentração pós-congelamento das leptospiplas por contagem em microscópio de campo escuro.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados em planilha Excel e agrupados de acordo com o sorovar estudado, método de congelamento, reagente criopreservador utilizado e tempo de descongelamento das amostras. Para fins de análise, consideraram-se somente as amostras sem contaminação. Das duas amostras ensaiadas, obteve-se a média das avaliações (em cruces), e quando número fracionado tendenciou-se para a classe imediatamente superior. As associações das variáveis (concentração e motilidade de leptospiplas) com o reagente criopreservador, tempo de descongelamento e método de congelamento foram realizadas pelo método de Qui-quadrado (χ^2) para todas as amostras, independente do sorovar estudado, e depois especificamente cada um dos sorovares estudados. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism v.5.01, considerando-se um nível de significância (α) de 5% (TRIOLA, 2005).

4. RESULTADOS

As amostras congeladas foram estudadas quanto a sua concentração, motilidade e intervalo de tempo de congelamento quando submetidas a dois reagentes criopreservadores diferentes (DMSO e Glicerol), em dois tipos de métodos de congelamento (Freezer e Nitrogênio líquido), sendo re-inoculadas em EMJH pós-congelamento e avaliadas num intervalo de 7 e 15 dias para observar a presença ou não de crescimento das leptospiras no meio específico. Foram estabelecidos valores numa escala de cruces para cada variável a fim de poder gerar parâmetros para a realização das posteriores análises. No caso da variável concentração todas as amostras foram congeladas apresentando uma concentração considerada como ótima, com valor de 10^8 leptospiras/ml (FAINE et al., 1999). Na escala de cruces, portanto, a concentração de 10^0 - 10^2 leptospiras/ml é simbolizada por uma cruz (1+), 10^2 - 10^4 por duas cruces (2+), 10^4 - 10^6 por três cruces (3+) e 10^6 - 10^8 por quatro cruces (4+). Com relação à motilidade, estabeleceu-se que uma cruz seria correspondente a uma motilidade baixa, 2 cruces moderada e 3 cruces ótima.

Das 42 amostras aleatórias congeladas, independentemente do sorovar, aquelas que apresentaram contaminação após o descongelamento e/ou re-inoculação em EMJH, foram desconsideradas, no momento da realização da análise estatística.

A concentração e a motilidade apresentaram diferença estatística significativa quando analisada a associação entre o tipo de reagente criopreservador utilizado independentemente do sorovar em questão, com valores de $p=0,02$ e $p=0,0038$, respectivamente, para o Teste de Qui-Quadrado (χ^2). (Tabela 1 e 2). Ao se analisar individualmente cada sorovar e sua relação com o tipo de reagente criopreservador utilizado, somente o sorovar Hardjo apresentou diferença significativa relacionada à concentração

e a motilidade, com valores de $P=0,0169$ e $P= 0,0036$, respectivamente, sendo o criopreservador DMSO, o mais eficiente (Tabela 3 e 4).

Do total geral de amostras congeladas, portanto, 20 apresentaram concentração entre 10^6 e 10^8 leptospiros/ml (4 cruces) e 4 concentração entre 10^4 - 10^6 (3 cruces) quando utilizado o criopreservador DMSO. Enquanto que, ao utilizar o glicerol, 12 amostras mostraram no pós-descongelamento uma concentração de $10^6 - 10^8$ leptospiros/ml, 8 entre $10^4 - 10^6$ (3 cruces), 3 entre $10^2 - 10^4$ (2 cruces) e somente uma amostra apresentou concentração de $10^0 - 10^2$ (1 cruz). Para a motilidade, ao analisar os dados independentemente do sorovar estudado, as 24 amostras congeladas com DMSO apresentaram no período pós-descongelamento uma motilidade considerada ótima (3 cruces), enquanto que para o criopreservador glicerol, 13 amostras apresentaram motilidade ótima (3 cruces), 10 motilidade moderada (2 cruces) e uma motilidade baixa (1 cruz).

Tabela 1. Associação entre os resultados da avaliação da concentração e o reagente criopreservador utilizado, independente do sorovar estudado.

Criopreservador	Avaliação da concentração (em cruces)			
	1 (10^0 - 10^2)	2 ($10^2 - 10^4$)	3 ($10^4 - 10^6$)	4 ($10^6 - 10^8$)
DMSO	0	0	4	20
Glicerol	1	3	8	12

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 13,3926; $P = 0,0200$

Tabela 2. Associação entre os resultados da avaliação da motilidade e o reagente criopreservador utilizado, independente do sorovar estudado.

Criopreservador	Avaliação da motilidade (em cruces)		
	1 (Frac)	2 (Moderada)	3 (Alta)
DMSO	0	0	24
Glicerol	1	10	13

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 15,4815; $P = 0,0038$

Tabela 3. Associação entre os resultados da avaliação da concentração do sorovar Hardjo e o reagente criopreservador utilizado.

Criopreservador	Avaliação da concentração (em cruces)			
	1 ($10^0 - 10^2$)	2 ($10^2 - 10^4$)	3 ($10^4 - 10^6$)	4 ($10^6 - 10^8$)
DMSO	0	0	2	10
Glicerol	0	1	7	4

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 12,0667; P = 0,0169

Tabela 4. Associação entre os resultados da avaliação da motilidade do sorovar Hardjo e o reagente criopreservador utilizado.

Criopreservador	Avaliação da motilidade (em cruces)		
	1 (Frac)	2 (Moderada)	3 (Alta)
DMSO	0	0	12
Glicerol	0	7	5

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 13,5429; P = 0,0036

Com relação à associação entre o método de congelamento e o sorovar utilizado, os resultados mostraram não haver diferença estatística significativa, indicando que independentemente do método, freezer ou nitrogênio líquido, a taxa de recuperação e resposta do crescimento das leptospiros re-inoculadas pós-congelamento foi a mesma nas duas técnicas (Tabela 5 e 6). Das 24 amostras testadas no congelamento tanto no freezer quanto no nitrogênio líquido, levando em consideração a concentração e a motilidade das cepas, notou-se que a distribuição dos valores obtidos nas quatro categorias de cruces estabelecidas foram similares.

Tabela 5. Associação entre os resultados da avaliação da concentração e o método de congelamento utilizado, independente do sorovar estudado.

Método de congelamento	Avaliação da concentração (em cruces)			
	1 ($10^0 - 10^2$)	2 ($10^2 - 10^4$)	3 ($10^4 - 10^6$)	4 ($10^6 - 10^8$)
Freezer	1	2	6	15
Nitrogênio líquido	0	1	6	17

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 5,8667; P = 0,3194

Tabela 6. Associação entre os resultados da avaliação da motilidade e o método de congelamento utilizado, independente do sorovar estudado.

Método de congelamento	Avaliação da motilidade (em cruces)		
	1 (Frac)	2 (Moderada)	3 (Alta)
Freezer	1	5	18
Nitrogênio líquido	0	5	19

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 1,7333; P = 0,7847

Ao avaliar o tempo de congelamento das leptospiros observou-se que na associação da concentração ou da motilidade independente do sorovar utilizado não houve diferença significativa expressiva, com valores representados respectivamente por $P= 0, 5503$ e $P=0, 3626$ para o teste de Qui-quadrado(χ^2) (Tabela 7 e 8). Por outro lado ao analisar somente o sorovar Copenhageni notou-se que houve uma diferença expressiva quanto ao tempo em que as amostras ficaram armazenadas tanto no freezer quanto no nitrogênio líquido, ou seja, com o passar do tempo a concentração e motilidade diminui, possivelmente pela exposição maior ao criopreservador e condições adversas geradas pelo próprio processo de congelamento (Tabela 9 e 10).

Tabela 7. Associação entre os resultados da avaliação da concentração e o tempo de congelamento, independente do sorovar estudado.

Tempo de congelamento	Avaliação da concentração (em cruces)			
	1 (10^0 - 10^2)	2 (10^2 - 10^4)	3 (10^4 - 10^6)	4 (10^6 - 10^8)
1 dia	0	0	2	6
3 dias	0	1	2	5
7 dias	0	0	1	7
15 dias	0	0	4	4
30 dias	0	1	2	5
60 dias	1	1	1	5

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 23,4667; P = 0,5503

Tabela 8. Associação entre os resultados da avaliação da motilidade e o tempo de congelamento, independente do sorovar estudado.

Tempo de congelamento	Avaliação da motilidade (em cruces)		
	1 (Frac)	2 (Moderada)	3 (Alta)
1 dia	0	1	7
3 dias	0	1	7
7 dias	0	1	7
15 dias	0	2	6
30 dias	0	3	5
60 dias	1	2	5

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 21,6000; P = 0,3626

Tabela 9. Associação entre os resultados da avaliação da concentração do sorovar Copenhageni e o tempo de congelamento.

Tempo de congelamento	Avaliação da concentração (em cruces)			
	1 ($10^0 - 10^2$)	2 ($10^2 - 10^4$)	3 ($10^4 - 10^6$)	4 ($10^6 - 10^8$)
1 dia	0	0	0	4
3 dias	0	0	0	4
7 dias	0	0	0	4
15 dias	0	0	3	1
30 dias	0	1	0	3
60 dias	1	1	0	2

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 33,5294; P = 0,0295

Tabela 10. Associação entre os resultados da avaliação da motilidade do sorovar Copenhageni e o tempo de congelamento.

Tempo de congelamento	Avaliação da motilidade (em cruces)		
	1 (Frac)	2 (Moderada)	3 (Alta)
1 dia	0	0	4
3 dias	0	0	4
7 dias	0	0	4
15 dias	0	1	3
30 dias	0	1	3
60 dias	1	1	2

Estatística: Teste de Qui-quadrado (χ^2) = 33,5294; P = 0,0295

Figura1. Distribuição da concentração e motilidade pós-congelamento, 7 dias e 15 dias re-inoculação para o sorovar Copenhageni.

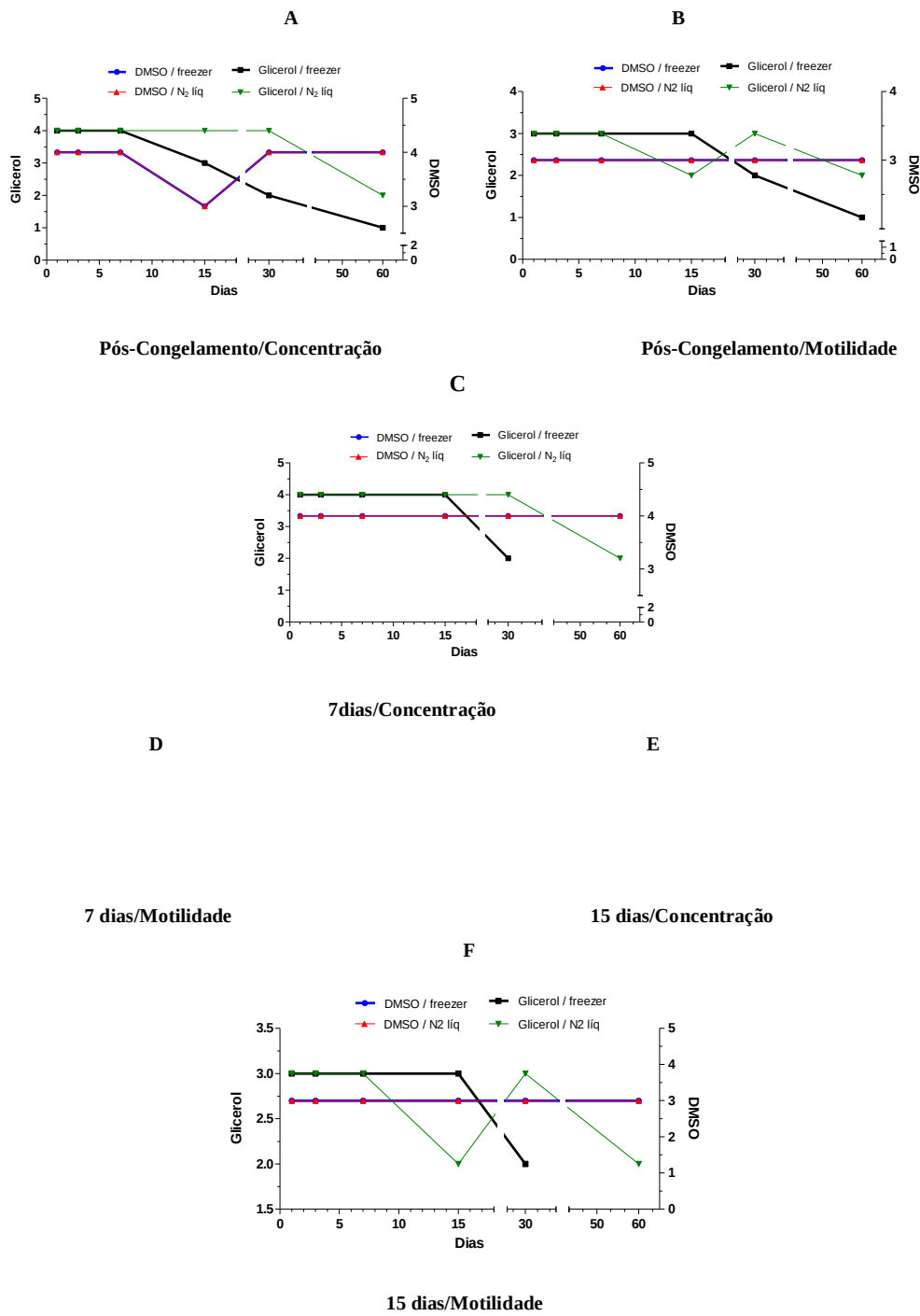
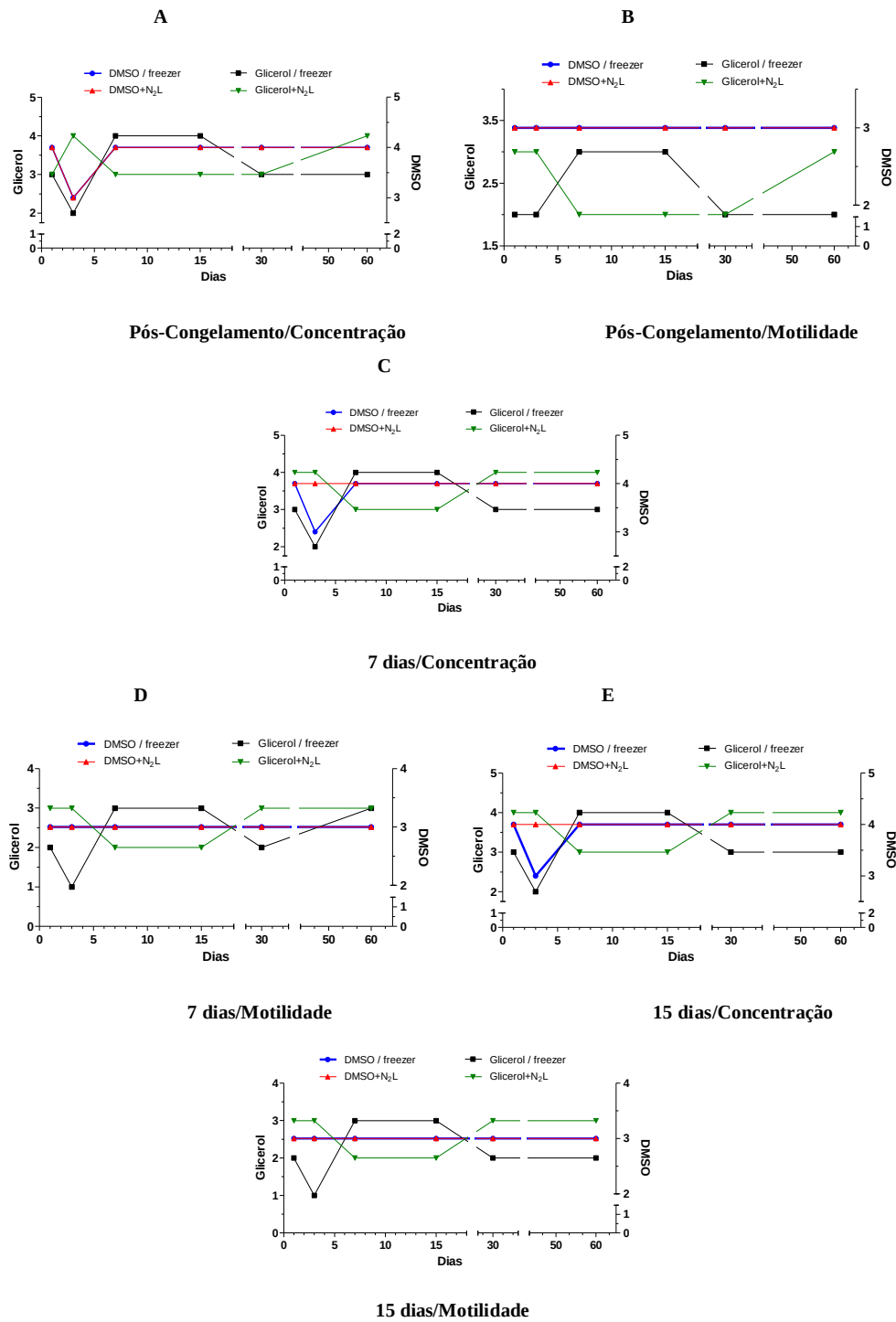


Figura 2. Distribuição da concentração e motilidade pós-congelamento, 7 dias s 15 dias re-inoculação para o sorovar Hardjo.



Nas figuras 1 e 2 pode-se observar a interação da concentração e motilidade dos sorovares Hardjo e Copenhageni, no momento pós-descongelamento, e de re-inoculação em 7 e 15 dias. Ao analisar todas as figuras confirmou-se que o método de congelamento que utilizou o DMSO como criopreservador foi mais eficiente, mantendo um padrão e uma uniformidade estatística, com valores constantes e lineares, levando, portanto, um melhor crescimento e manutenção mais elevada da taxa de viabilidade das leptospiros, mostrando a superioridade deste reagente em comparação ao glicerol. Relembrando que os valores foram obtidos por uma escala de cruces, ou seja, uma estimativa do possível valor real.

4. DISCUSSÃO

Devido à grande utilização das leptospiros na rotina laboratorial, para a realização de exames específicos e decisivos na obtenção de um diagnóstico seguro e fidedigno, sugere-se a necessidade de criação de novas técnicas para manter as cepas de maneira mais prática e menos custosa, frente aos métodos tradicionais. Além disso, a descoberta de novos sorovares e conseqüente crescimento do número de culturas a serem mantidas; os requerimentos necessários para manter a grande bateria de antígenos utilizados em testes sorológicos e os fatores ligados a manutenção ativa das cepas, culminaram na necessidade de desenvolver, ao longo dos anos, métodos satisfatórios para a preservação por longos períodos destes micro-organismos.

O principal objetivo do presente estudo foi comparar a utilização de dois criopreservadores (DMSO 5% e Glicerol 10%), em dois métodos de congelamento (Freezer e Nitrogênio Líquido) por diferentes períodos, a fim de obter um melhor método para se conservar as leptospiros, mantendo a estabilidade e viabilidade pós-congelamento, visto que o intuito de congelar cultivos microbianos é de sempre manter este microrganismo vivo, livre de contaminações e sem variações mutagênicas (BAJAJ, 1995).

Vários estudos citam a criopreservação como método eficaz na manutenção da viabilidade e virulência das leptospiros por tempos prolongados (HIGUERA et al., 2008). As baixas temperaturas da criopreservação permitem barrar os processos metabólicos e conseqüentemente a deteriorização biológica por longos períodos (MAURA et al., 2006). O emprego de crioprotetores para a realização do congelamento é de suma importância, sendo que de acordo com Hubaleck (2003), o maior êxito no congelamento de micro-organismos (bactérias, vírus, algas e protozoários) é obtido ao serem adicionados estes reagentes em concentrações adequadas. E devido ao fato de serem substâncias com alta afinidade pela água, acabam contribuindo na sobrevivência da célula, diminuindo o ponto de congelamento e reduzindo a quantidade de cristais de gelo durante o resfriamento.

Visto também, que o congelamento quando realizado de maneira lenta, como foi decorrido neste estudo, aumenta a desidratação celular, impedindo a formação de cristais de gelo intracelular e potencializando a concentração dos solutos neste espaço (SIMIONE, 1998). Enquanto estudos realizados por Reed et al. (2000) indicaram que o congelamento rápido foi insatisfatório para a conservação de cepas de *Leptospira*, Dumont et al. (2004) em estudos recentes constatou que o congelamento excessivamente rápido permite uma alta porcentagem de recuperação da viabilidade de vários sistemas biológicos, semelhante ao obtido com o congelamento lento e controlado, porém sugeriu-se em seu experimento que maiores estudos fossem realizados a fim de obter resultados mais consistentes.

Outros dois fatores importantes a serem considerados no momento do congelamento foram: a idade dos cultivos, sendo de extrema importância a utilização de cultivos novos, com 7 a 9 dias, devido ao fato de que nos cultivos mais velhos a lise celular ser aumentada pela atividade das lipases originadas no momento do crescimento das leptospiros, podendo originar

dessa maneira lipídios tóxicos (FAINE et al., 1999). A concentração celular é também um fator crítico, pois quanto maior o número de células presentes no momento do congelamento, maior é a porcentagem de recuperação, sendo que para a maioria das bactérias uma concentração de 10^8 cel/ml é suficiente para uma recuperação adequada (SIMIONE, 1998), concentração esta que foi utilizada também neste estudo, com recuperação satisfatória.

Os resultados encontrados no estudo ligados ao fator modo de congelamento demonstraram não haver influência desta variável na preservação da viabilidade das leptospiros pós-congelamento. O fato de congelar as amostras em nitrogênio líquido ou no freezer não gerou diferenças significativas neste estudo. Em contrapartida, estudos realizados por Alexander et al.(1972) mostraram que ao se utilizar temperaturas próximas a -70°C para o congelamento, a viabilidade das leptospiros não foi atingida de maneira consistente, mesmo com a adição dos criopreservadores.

Ao levar em consideração o reagente criopreservador, quando utilizado o DMSO, notou-se melhores taxas de recuperação. Este criopreservador apresentou maior uniformidade nos resultados obtidos pós-congelamento, com valores de viabilidade mantendo-se em sua maioria constantes ao longo dos diferentes períodos testados, ou apresentando quedas mínimas nas cepas expostas ao congelamento por um período maior (Figura 1 e 2), fato esperado devido ao possível processo de desidratação celular gerado pelo congelamento. Este resultado converge com aqueles obtidos por Higuera et al. (2008) ao realizar o congelamento em nitrogênio líquido de seis sorovares utilizando como crioprotetores o DMSO e o glicerol em concentrações menores que 2%, observando que o DMSO permitiu em termos gerais uma maior porcentagem de recuperação pós-congelamento. Estes resultados podem ser explicados possivelmente, pelo fato de o DMSO ser um poderoso solvente com maior capacidade de penetração pela da

membrana celular, exercendo seu efeito crioprotetor intra e extracelularmente e minimizando dessa maneira o efeito adverso da concentração dos solutos (SHUNG-CHANG JONG, 1989).

Por outro lado, Mauru *et al.* (2006) mostraram que amostras de cepas vacinais do sorovar Canicola quando congeladas utilizando o glicerol 5% como criopreservador permitiu a manutenção da viabilidade, porém diminui expressivamente a recuperação da cepa. E no caso das cepas vacinais do sorovar Copenhageni, em nenhuma das concentrações testadas para este reagente foi possível manter estável a viabilidade em todo o período testado.

Palit *et al.* (1986) ainda demonstraram de maneira expressiva que acima da concentração de 10% , para qualquer criopreservador, seja o DMSO ou glicerol, ocorre um aumento no grau de citotoxicidade, com efeito variável na dependência do sorovar utilizado. Entretanto, ao comparar concentrações mais baixas, o glicerol apresentou em sua maioria uma capacidade citotóxica 10 vezes maior para *Leptospira* que o DMSO, o que vai de encontro com os resultados obtidos neste trabalho.

Ao avaliar a concentração e a motilidade das leptospirosas, sem levar em consideração um sorovar específico, notou-se não haver diferença significativa estatística quando levado em consideração os o tipo de reagente, método e intervalo de congelamento, mostrando que ao avaliar todas as amostras, o fato de usar o DMSO ou o glicerol, no freezer ou nitrogênio líquido, pelo período de 60 dias não influenciou na viabilidade das cepas. Já ao analisar o sorovar Hardjo separadamente notou-se que ao utilizar o DMSO como reagente, os valores de concentração e motilidade foram maiores e a recuperação pós-congelamento mais eficiente. Para o sorovar Copenhageni não houve diferença expressiva, vista nos dados analisados. Estes resultados podem ser explicados, por cada sorovar

possuir características intrínsecas e exclusivas, que podem interferir de alguma maneira no momento do congelamento e/ou descongelamento.

Para o tempo de congelamento não foi observado diferença significativa nos valores obtidos neste estudo para motilidade e concentração quando não especificado o sorovar, porém quando considerado somente o sorovar Copenhageni, notou-se que com passar do tempo houve uma queda nas taxas de recuperação das leptospiros, principalmente com 60 dias de congelamento em que os valores para motilidade alta (3 cruces) e concentração (4 cruces), ou seja, 10^6 - 10^8 foram baixos, de somente a metade das amostras (2/4 amostras descongeladas do momento 60 dias), isto provavelmente pela própria exposição ao criopreservador, que acaba por deteriorar a viabilidade das cepas, e pelas características próprias de cada sorovar que podem levar a uma queda maior nas concentrações e viabilidade das leptospiros presentes de acordo com o tempo de exposição ao congelamento.

De maneira geral, pode-se afirmar que os fatores críticos para se preservar leptospiros de maneira eficiente, em condições viáveis e estáveis em baixas temperaturas de congelamento, são aqueles relacionados à concentração do agente criopreservador adicionado a cultura; a concentração dos microorganismos; a idade dos cultivos e o modo de congelamento, ou seja, a taxa de resfriamento, levando-se a obter um maior ou menos eficiente resultado de recuperação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de viabilidade obtidos no estudo mostraram que as técnicas de conservação dos sorotipos de leptospiros em nitrogênio líquido e freezer - 70°C, com a utilização tanto de DMSO como glicerol por diferentes períodos são métodos eficazes e práticos, entretanto o criopreservador

DMSO mostrou-se um método mais confiável, não importando se realizado no nitrogênio líquido ou no freezer. De maneira geral, foi desenvolvido um procedimento simples e rápido para a preservação por longos períodos de cepas de *Leptospira* spp. utilizadas comumente na realização de exames relacionados a enfermidade, sugerindo, portanto, a sua aplicabilidade para todos os sorovares mantidos em condições laboratoriais. Estudos adicionais poderão ser realizados para comprovar a estabilidade por maior período de tempo nas mesmas condições avaliadas, a fim de obter um conhecimento maior sobre estas técnicas.

6. REFERÊNCIAS

- ABLETT, S., IZZARD, M. J, LILLFORD, P. J. Differential scanning calorimetric study of frozen sucrose and glycerol solutions. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.** v. 88, p. 789–794, 1992.
- ALBRECHT, R. M., ORNDORFF, G. R., MACKENZIE, A. P. Survival of certain microorganisms subjected to rapid and very rapid freezing on membrane filters. **Cryobiology**. v.10.233–239, 1973.
- ALEXANDER, A.D. *Leptospira*. In: Ballows A, HAUSLER, W.J, HERRMANN, K.L, ISENBERG, H.D., SHADOMY, H.J., editors. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington D.C., ASM Press, p. 554-9, 1991.
- BAJAJ, Y.: Cryopreservation of plant cell, Tissue, and organ culture for the conservation of Germplasm and Biodiversity. En Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin.v 32. p. 3-18,1995.
- BRIHUEGA, B., FERNÁNDEZ,E. La liofilización como método de conservación para las leptospiros. **Vet Art.** v.1, p.3268- 71, 1996.
- COGHLAN, J.D, LUMSDEN, W.H.R., MCNEILLAGE, G.J.C. Low-temperature preservation of *Leptospira*, preliminary communication. **J Hyg Camb**;v 65,p. 373-9, 1967.

DUMONT, F., MARECHAL, P., GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Appl Environ Microbiol.** v.70,p. 268-72, 2004.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis.Melbourne, MediSci, p.272, 1999.

DUMONT, F., MARECHAL, P.A., GERVAIS, P. Involvement of Two Specific Causes of Cell Mortality in Freeze-Thaw Cycles with Freezing to 196°C. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1330–1335, 2006.

HECKLY, R.. Preservation of Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology.* v.24: p.19- 53, 1978.

HIGUERA, L.D.T., ORTEGA, D.T., BAUTISTA, J.L.R BURBANO, R.E.P. Comparison of three methods for the cryopreservation of *Leptospira* strains in Liquid Nitrogen. **Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria** . v.9, p.72-76, 2008.

HUBALÉK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Medical Zoology Laboratory, Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences, Czech Republic, Received 7 October 2002;accepted 7 May 2003.

LEVETT, P. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infections Disease** v. 36, p.447-52, 2003.

LINSCOTT, W. D., BOAK, R. Action of glycerol in the freezing of leptospirae. **J. Bacteriol.** v.80, p. 573-574, 1960.

MAURA, L.R.B., RODRÍGUEZ, A.G., SARDIÑAS, C.D.P.,SANTIESTEBAN,I.N.B., ABREU, Y.V. Conservación de cepas vacunales de *Leptospira* a -70°C.**Rev. Cub Med Trop.**v.58, p.50-5,2006.

MAZUR, P. Cryobiology: The Freezing of Biological **System. Science.** v. 168, p. 939-49, 1970.

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Leptospirosis. En Capítulo 1.1.9. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals, p.251, 2008..

PALIT, A., HAYLOCK, L.M., COX, J.C. Storage of pathogenic leptospires in liquid nitrogen. **J Applied Bacteriol** , v. 61:p.407-11,1986.

PESCADOR, C.A.; CORBELHINI, L.G.; LORETTI, A.P.; WUNDER JÚNIOR, E.; FRANTZ, F. J.; DRIEMEIER, D. Aborto eqüino por *Leptospiras* sp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.271-274, 2004.

REED, N.E., VARNEY, W.C., GODDARD, R.C., WYETH, P.J. The maintenance of challenge strains used in the potency test for canine leptospira vaccines. **Biologicals**;v. 28,p. 25-8, 2000.

SIMIONE, F. Cryopreservation Manual Nalgene Nunc International. <http://www.nalgenelabware.com/techdata/technical/cryopdf> 15 p, 1998.

SHUNG-CHANG JONG. 1989. Capitulo 13: Biotic diversity and Germplasm preservation global imperatives. En KnustsonL, Stonner A (eds). Beltsville Symposia in Agricultural Research, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp 241-271

Triola, M.F., 2005. Introdução à estatística. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC. 682p.

VICTORIA, B., FERNÁNDEZ, C., RODRÍGUEZ, J. E., OBREGÓN, A.M., RODRÍGUEZ, I. Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. **Rev Cubana Med.Trop**.v.54, p.48-51, 2002.

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