

Avaliação da lactalbumina e ovoalbumina como alternativas à albumina sérica bovina (BSA) no enriquecimento do meio EMJH para cultivo de *Leptospira* spp.

Rubia Diaz Taveiros Kühne

Prof. Dr Marcos Bryan Heinemann

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo

rubia kuhne@usp.br

Objetivos

Avaliar a lactalbumina (ALA) e ovalbumina (OVA) como potenciais substitutos à albumina sérica bovina (BSA) utilizada no enriquecimento do meio EMJH empregado para o cultivo e manutenção de *Leptospira* spp., consequentemente, barateando o custo de produção deste enriquecimento.

Métodos e Procedimentos

O enriquecimento foi preparado de acordo com Faine (1982) e utilizado a 10% no meio basal (EMJH-DIFCO™), sendo que duas formulações foram produzidas: a primeira utilizada como controle, na qual foi empregada a albumina sérica bovina fração V (BSA); na segunda, a BSA foi substituída pela ovalbumina (OVA).

As soluções estoques dos demais componentes do enriquecimento foram preparadas, e em seguida, adicionadas lentamente a solução de BSA e ovalbumina já filtrada até alteração de cor, com posterior aferição de pH e filtração em membrana de 0,22 µm.

Após a hidratação e esterilização em autoclave a 15 psi de pressão (121 °C) por 15 minutos, os enriquecimentos foram distribuídos igualmente em tubos de ensaio esterilizados.

Foram selecionados aleatoriamente 10 sorotipos vivos de *Leptospira* spp.: sorovares Bratislava, Castellonis, Canicola, Copenhageni,

Javanica, Pomona, Hardjo-Prajitno, Shermani, Tarassovi e Andamana.

Os sorotipos foram mantidos em meio de semissólido de Fletcher, sendo repicado individualmente na proporção de 1:10 em tubos contendo os meios de EMJH enriquecidos com seus respectivos suplementos (repique inicial – 10⁰). Os repiques semanais consecutivos foram realizados até um terceiro repique (10⁻³).

Cada sorotipo foi examinado através da observação macro e microscópica, sendo considerado ideal os cultivos que atingiram uma concentração de $\geq 2 \times 10^8$ leptospiplas/mL.

Resultados

Na análise macroscópica dos meios de cultura, não houve contaminação e os meios tinham uma coloração discretamente amarelada e límpida. No teste funcional, todos os 10 sorotipos cresceram de forma satisfatória no meio EMJH com o enriquecimento controle, contendo albumina sérica bovina fração V (BSA); porém, no meio de EMJH contendo o enriquecimento à base de ovalbumina, apenas quatro sorotipos cresceram de forma satisfatória (sorovares: Bratislava, Canicola, Copenhageni e Hardjo-Prajitno). Os sorovares Andamana, Javanica e Pomona tiveram crescimento satisfatório apenas no primeiro repique, já que nos repiques seguintes não foram observadas leptospiplas viáveis. Os demais sorovares não cresceram desde o primeiro repique.

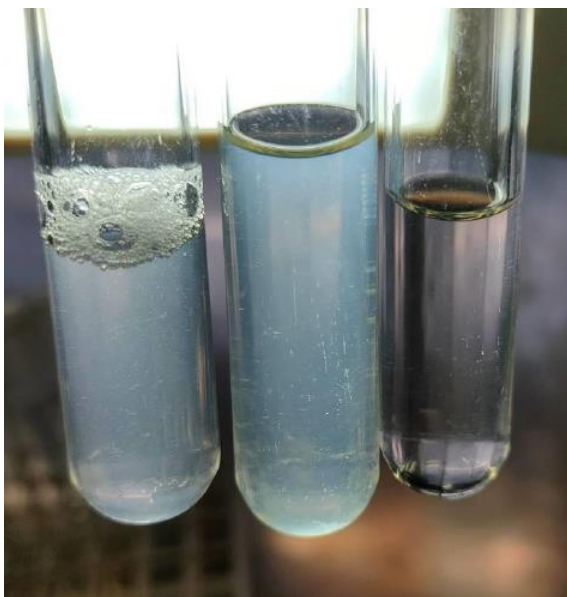


Figura 1: Tubo à esquerda contém o meio EMJH suplementado com o enriquecimento à base da ovalbumina onde foi semeado o sorovar Hardjo-Prajitno. O tubo central contém o meio EMJH suplementado com o enriquecimento à base da albumina bovina (controle) onde foi semeado o mesmo sorovar citado anteriormente e o tubo à direita contém o mesmo meio descrito para o tubo central, sem leptospirosas.

Conclusões

Seria possível a realização da substituição do meio EMJH enriquecido à base de albumina bovina por ovoalbumina apenas em culturas de sorovares Bratislava, Canicola, Copenhageni e Hardjo-Prajitno. Estes quatro sorovares apresentaram o mesmo desempenho no meio EMJH contendo a albumina bovina (controle), tanto em coloração quanto no aspecto de turvação do meio.

Houve uma dificuldade na dissolução completa da ovalbumina, assim como na filtração para esterilização do enriquecimento contendo este reagente, o que pode ter resultado na perda parcial da albumina, durante a produção do enriquecimento, influenciando no crescimento dos demais sorovares. Outras formas de processar a ovalbumina devem ser estudadas na composição deste enriquecimento para uma melhor avaliação.

Referências Bibliográficas

- Ellinghausen, Jr., H.C.; McCullough, W. G.; Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex (OAC) and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 45-51, 1965.
- Faine, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. WHO offset publication. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1982.
- Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: Medicine Science 2nd. ed., 1999.
- Huntington, J. A.; Stein, P. E. Structure and properties of ovalbumin. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 756, n. 1-2, p. 189-198, 2001.
- Johnson, R.; Harris, V.G. Harris. Differentiation of pathogenic of leptospires. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1967.
- Layman, D.; Lonnerdal, B.; Fernstrom, J. D. Applications for α -lactalbumin in human nutrition. **Nutrition Reviews**, v. 76, n. 6, p. 444-460, 2018.
- Levett, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Staneck, J.; Henneberry, R.; Cox, C.D. Growth Requirements of Pathogenic *Leptospira*. **Infection and Immunity**, v. 7, n. 6, p. 886-897, 1973.
- World Health Organization (WHO). **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva, 2003.

Evaluation of lactalbumin and ovalbumin as alternatives to bovine serum albumin (BSA) in the enrichment of EMJH medium for *Leptospira* spp. cultivation

Rubia Diaz Taveiros Kühne

Prof. Dr Marcos Bryan Heinemann

School of Veterinary Medicine and Animal Science – University of São Paulo

rubia kuhne@usp.br

Objectives

Evaluate lactalbumin (ALA) and ovalbumin (OVA) as potential substitutes for bovine serum albumin (BSA) used in the enrichment of EMJH medium used for the cultivation and maintenance of this enrichment.

proportion of 1:10 in tubes containing EMJH media enriched with their respective supplements (initial subculture – 10^0). Consecutive weekly peals were performed until a third peal (10^{-3}).

Each antigen was examined through macro and microscopic observation, and cultures that reached a concentration of $\geq 2 \times 10^8$ leptospores/mL were considered ideal.

Materials and Methods

The enrichment was prepared according to Faine (1982) and used at 10% in the basal medium (EMJH-DIFCOTM), being that two formulations were produced: the first used as control, in which bovine serum albumin fraction V (BSA) was used; in the second, BSA was replaced by ovalbumin (OVA)

Stock solutions of the other enrichment components were prepared, and then, slowly added to the filtered BSA and ovalbumin solution until color change, with subsequent pH measurement and 0.22 μ m membrane filtration. After hydration and sterilization in an autoclave at 15 psi of pressure (121 °C) for 15 minutes, the enrichments were distributed evenly in sterilized test tubes.

Ten live *Leptospira* spp. antigens were randomly selected: serovars Bratislava, Castellonis, Canicola, Copenhageni, Javanica, Pomona, Hardjo-Prajitno, Shermani, Tarassovi and Andamana.

The antigens were kept in Fletcher's semi-solid medium, being individually pealed at a

Results

In the macroscopic analysis of the culture media, there was no contamination, and the media had a slightly yellowish and clear color. In the functional test, all 10 antigens grew satisfactory in the EMJH medium with the control enrichment, containing bovine serum albumin fraction V (BSA); however, in the medium containing the ovalbumin-based enrichment, only four antigens grew satisfactory (serovars: Bratislava, Canicola, Copenhageni e Hardjo-Prajitno). The serovars Andamana, Javanica e Pomona had satisfactory growth only in the first peal, since in the following peals no viable leptospores were observed. The other serovars did not grow from the first peal.

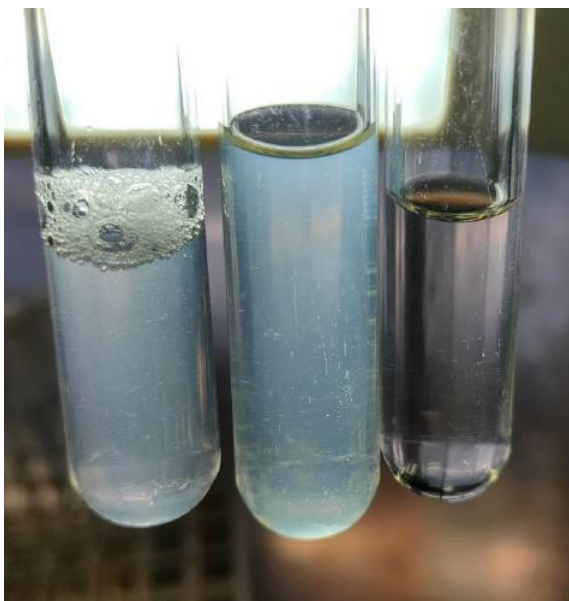


Figura 1: Tub on the left contains EMJH medium supplemented with ovalbumin-based enrichment where serovar Hardjo-Prajitno was seeded. The central tube contains the EMJH medium supplemented with enrichment based on bovine albumin (control) where the same serovar mentioned above was seeded and the tube on the right contains the same medium described for the central tube, without leptospires.

Conclusions

It would be possible to replace EMJH medium enriched with bovine albumin by ovalbumin only in cultures of serovars Bratislava, Canicola, Capenhageni and Hardjo-Prajitno. These four serovars showed the same performance in EMJH medium containing bovine albumin (control), both in color and in the turbidity aspect of the medium.

There was a difficulty in the complete dissolution of ovalbumin, as well as in the filtration to sterilize the enrichment containing this reagent, which may have resulted in the partial loss of albumin during the enrichment production, influencing the growth of the other serovars. Other ways of processing ovalbumin should be studied in the composition of this enrichment for a better evaluation.

References

- Ellinghausen, Jr., H.C.; McCullough, W. G.; Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex (OAC) and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 45-51, 1965.
- Faine, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. WHO offset publication. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1982.
- Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: Medicine Science 2nd. ed., 1999.
- Huntington, J. A.; Stein, P. E. Structure and properties of ovalbumin. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 756, n. 1-2, p. 189-198, 2001.
- Johnson, R.; Harris, V.G. Harris. Differentiation of pathogenic of leptospires. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1967.
- Layman, D.; Lonnerdal, B.; Fernstrom, J. D. Applications for α -lactalbumin in human nutrition. **Nutrition Reviews**, v. 76, n. 6, p. 444-460, 2018.
- Levett, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Staneck, J.; Henneberry, R.; Cox, C.D. Growth Requirements of Pathogenic *Leptospira*. **Infection and Immunity**, v. 7, n. 6, p. 886-897, 1973.
- World Health Organization (WHO). **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva, 2003.