



Padronização do uso da *Galleria mellonella* em modelo de infecção para o estudo da patogenicidade *in vivo* de *Escherichia coli* patogênica aviária

THAÍNA DE BRITES WEBER¹, CARLOS TADEU PIPPI SALLE²

¹ Autora, Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Orientador, Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INTRODUÇÃO

A larva da traça grande da cera (*Galleria mellonella*) está sendo utilizada como uma alternativa a modelos que utilizam animais vertebrados não-humanos para o estudo da virulência de bactérias de interesse para a saúde pública^{2,4}. A habilidade da larva sobreviver em temperaturas próximas a 37°C e a similaridade, em termos gerais, do seu sistema imune inato ao dos vertebrados, justifica o uso do inseto como hospedeiro⁵. Por consequência, acredita-se que o modelo de infecção possa ser adotado em estudos de avaliação de isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). Para alcançar adequada repetibilidade e reprodutibilidade, a metodologia de inoculação das larvas com bactérias requer a padronização de procedimentos a serem realizados e de parâmetros a serem avaliados. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi definir o peso mínimo das larvas na técnica de inoculação, o período de tempo necessário para contabilização das mortes e a dose letal para 50% das larvas (DL₅₀) a partir da inoculação de diferentes cepas de APEC.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Determinação do peso mínimo

Cinco categorias de peso (10 larvas/categoria)

241-250 mg | 251-260 mg | 261-270 mg
271-280 mg | 281-290 mg.

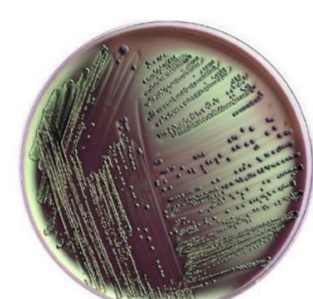


três inoculadores
treinados

10 µL/larva
solução salina 0,9%

- Criação das larvas em laboratório³.
- Inóculos e inoculação conforme descrito por Alghoribi *et al.* (2014)¹.
- Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2. Elaboração das suspensões bacterianas



15 isolados
APEC



Repique
em BHI

incubação
37°C por 18h



Centrifugação
13.000 x g por 5 min

1 lavagem

células bacterianas em
solução 0,9% NaCl

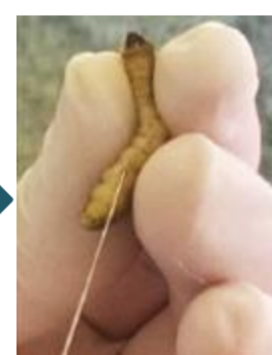


Padronização em
espectrofotômetro
(DO_{620nm})

3. DL₅₀

4. Tempo de morte

10⁷ 10⁶ 10⁵ 10⁴
Inóculos
(UFC/10 µL)



Inoculação
10 µL/larva



Morte das larvas computada
a cada 12h/7 dias

Análise estatística*

DL₅₀ de cada cepa APEC
↓
determinada por análise de
regressão (modelo Probit)

Correlação entre as DL₅₀
(a partir de diferentes períodos
de observação)

Coeficiente de correlação de
Pearson

Curvas de sobrevivência
(método Kaplan-Meier)

Comparação múltipla pelo teste
Log-rank (Mantel-Cox)

* Software para análise estatística: Microsoft Excel 2010, PASW Statistics 18 e GraphPad Prism 6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

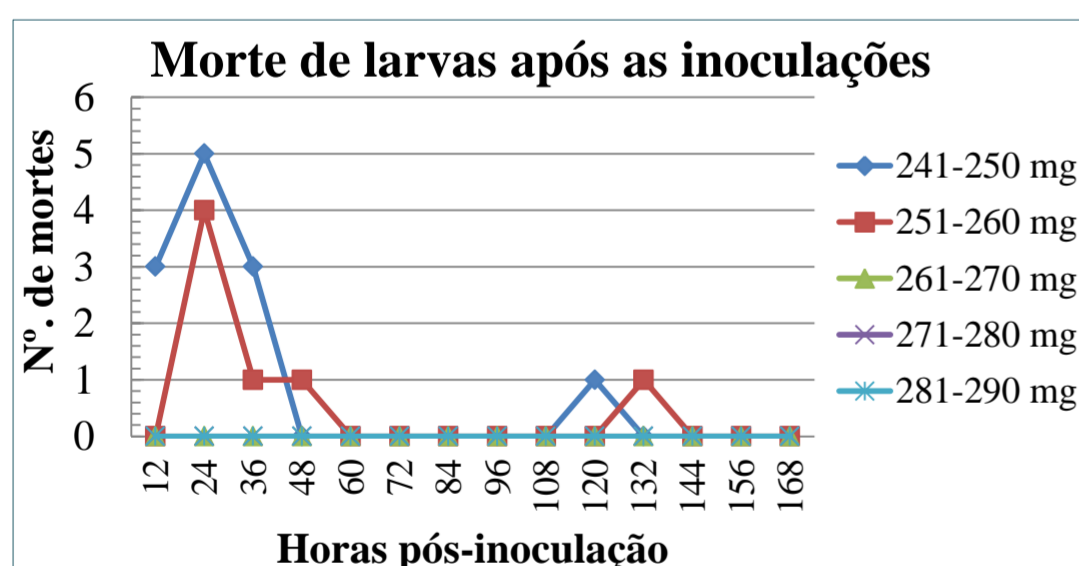


Figura 1. Número de larvas mortas após a inoculação, conforme a categoria de peso.

- O critério para determinação do peso mínimo das larvas é a ausência de mortes durante o período de observação. Sendo assim, o peso das larvas, para uso no modelo de infecção, deve ser ≥261mg. As mortes são decorrentes de lesões pelo procedimento de inoculação.
- A DL₅₀ mínima, média e máxima observadas foram 3,744, 5,580±0,99 e 7,056 Log₁₀ UFC/10µL, respectivamente.

Tabela 1. Correlação entre as DL₅₀ calculadas a partir de diferentes períodos de observação.

Variável	Correlação	DL ₅₀ das 15 cepas APEC			
		DL ₅₀ (1)	DL ₅₀ (2)	DL ₅₀ (3)	DL ₅₀ (4)
DL ₅₀ (7)	Coef. de correlação	0,954	0,976	0,989	0,968

Foi observado valor de p < 0,05 em todas as correlações. O número entre parênteses se refere ao período de observação, em dias.

Tabela 2. DL₅₀ das 15 cepas de APEC inoculadas.

Cepa	DL ₅₀	Cepa	DL ₅₀	Cepa	DL ₅₀
148	6,834	34	7,252	181	6,046
120	4,410	170	5,337	19R	7,223
85	6,150	289	5,030	198	4,310
48	5,888	69	6,452	23	5,179
104	6,787	126	5,791	17	3,840

- O período de observação da mortalidade de larvas após os ensaios de inoculação deve ser de três dias, pois foi o que apresentou a melhor correlação de DL₅₀ (0,989) com o período total de 7 dias.

Tabela 3. Mortalidade observada após a inoculação.

Larvas mortas após a inoculação	Pós-inoculação (horas)						
	12	24	36	48	60	72	168
% relativo	55,1	21,3	4,7	4,7	2,6	2,9	100
% acumulativo	55,1	77,3	81,7	86,4	89,0	91,7	100

Mortalidade após a inoculação das suspensões bacterianas nas concentrações de 10⁷, 10⁵ e 10⁴ UFC/10 µL.

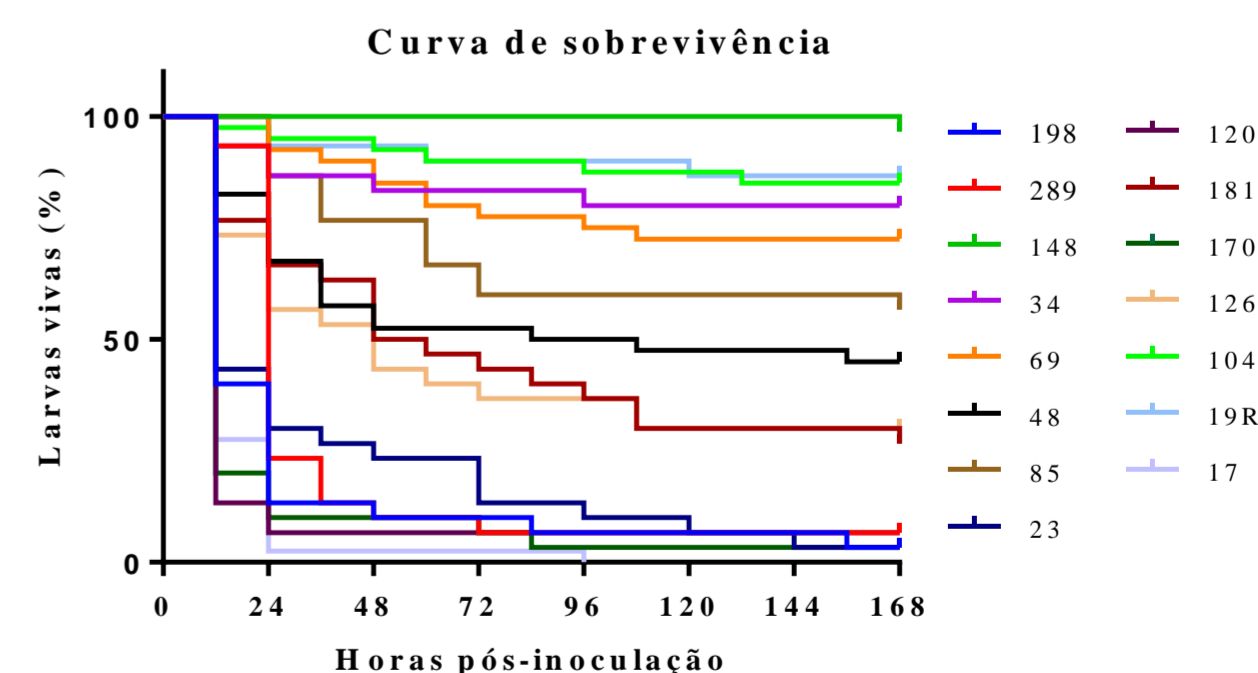


Figura 2. Curva de sobrevivências das larvas inoculadas com as 15 cepas de APEC. Inóculo de 10⁶ UFC/10 µL.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir não ser possível o uso de larvas de *G. mellonella* no modelo de infecção com peso corporal inferior a 260 mg e evidenciam a possibilidade de redução do período de observação de mortes para 72 horas, diminuindo-se o tempo necessário para conclusão dos futuros ensaios de inoculação.

REFERÊNCIAS

1. ALGHORIBI, M. F. *et al.* *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. *PLoS One*, v. 9, p. 1-10, 2014.
2. CIESIELCZUK, H. *et al.* Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Virulence*, v. 6, p. 145-151, 2015.
3. JORJÃO, A. L. Metodologia da criação de *Galleria mellonella* para uso como modelo de infecção e efeitos de *Lactobacillus rhamnosus* inativado pelo calor *in vivo* e *in vitro*, desafiados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. 2016. 95 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Biopatologia Bucal). Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José dos Campos, SP, 2016.
4. JUNQUEIRA, J. C. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence*, v. 3, p. 474-476, 2012.
5. TSAI, C.J.; LOH J. M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.