

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO**

**COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE**

**INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA**

THAÍS FERNANDA ONORIO CAMPOS

FERNANDA DE CASTRO MESQUITA

**PADRONIZAÇÃO DO USO DA MONOAZIDA DE PROPÍDIO (PMAxx™)**

**NA DETECÇÃO DE VIABILIDADE DO *Mycobacterium leprae***

BAURU

2022

THAÍS FERNANDA ONORIO CAMPOS  
FERNANDA DE CASTRO MESQUITA

**PADRONIZAÇÃO DO USO DA MONOAZIDA DE PROPÍDIO (PMAxx™)  
NA DETECÇÃO DE VIABILIDADE DO *Mycobacterium leprae***

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Instituto Lauro de Souza Lima, Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP– “Dr. Antônio Guilherme de Souza” como requisito parcial para obtenção do título de Especialista Multiprofissional em Assistência Dermatológica, área de concentração em microbiologia sob orientação da Ms. Suzana Madeira Diorio e coorientação da Ms. Daniele Ferreira de Faria Bertoluci.

BAURU

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO “LAURO DE SOUZA LIMA”

C157p Campos, Taís Fernanda Onorio

Padronização do uso da monoazida de propídio (PMAxx™) na detecção de viabilidade do *Mycobacterium leprae*. / Taís Fernanda Onorio Campos; Fernanda de Castro Mesquita, Bauru, 2022.

32f.; il.

Monografia apresentada ao programa de Especialização Multiprofissional em Assistência Dermatológica do Centro Formador de Recursos Humanos para o SUS/SP “Dr. Antônio Guilherme de Souza”, unidade didática Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação Ms. Suzana Madeira Diorio e coorientação da Ms. Daniele Ferreira de Faria Bertoluci.

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Hanseníase. 3. Corantes fluorescentes. I. Mesquita, Fernanda de Castro. II. Diorio, Suzana Madeira. III. Bertoluci,

CRB8/8247

**THAÍS FERNANDA ONORIO CAMPOS  
FERNANDA DE CASTRO MESQUITA**

**PADRONIZAÇÃO DO USO DA MONOAZIDA DE PROPÍDIO (PMAxx™)  
NA DETECÇÃO DE VIABILIDADE DO *Mycobacterium leprae***

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Instituto Lauro de Souza Lima, Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP- “Dr. Antônio Guilherme de Souza” como requisito parcial para obtenção do título de Especialista Multiprofissional em Assistência Dermatológica, área de concentração Microbiologia sob orientação da Ms. Suzana Madeira Diorio.

---

Orientador

---

Coorientador

---

Avaliador

Bauru, 8 de março de 2022

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos primeiramente aos nossos pais por todo incentivo e apoio.

Agradecemos ao Jonatas Perico, por auxiliar nas atividades práticas.

Agradecemos as nossas orientadoras por toda a ajuda e orientação.

## RESUMO

**Introdução** A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que se manifesta na pele e pode invadir o sistema nervoso periférico do paciente. O cultivo de seu agente etiológico em meios de cultura artificiais ou celulares ainda é um desafio e obstáculo para estudos relacionados à sua microbiologia. Para avaliar a viabilidade de células bacterianas, utiliza-se corantes fluorescente, como a monoazida de propídeo (PMA). O corante penetra somente nas células que estão com a membrana celular comprometida e reage com fração de hidrocarboneto a fim de resultar em uma modificação permanente do DNA. **Objetivo** Padronizar a utilização do corante monoazida de propídeo (PMAxx™) em combinação com a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT qPCR) para detecção da viabilidade do *M. leprae*. **Metodologia** Diferentes concentrações de PMAxx™ foram adicionadas a 250µl de suspensão bacilar purificada, proveniente de coxim plantar de camundongos previamente infectados. As amostras foram incubadas no escuro por diferentes tempos. Após a incubação, foram fotoativadas por exposição em lâmpada halógena de 650 W. Foram avaliados os parâmetros de concentração bacilar, tempo de incubação no escuro, tempo de exposição à luz e concentração do PMAxx™. O DNA do bacilo foi extraído utilizando-se um kit comercial e amplificadas por RT qPCR, com uso de primers específicos para as regiões Specific Repetitive Element (RLEP) do DNA de *M. leprae*. **Resultados** Não houve diferença significativa no valor do  $\Delta Ct$  em nenhuma das concentrações de bacilos, indicando que não foi possível fazer a discriminação entre células vivas e inviáveis. O tempo ideal de incubação no escuro foi de 60 minutos, pois apresentaram uma diferenciação significativa do  $\Delta Ct^{\text{vivo-morto}}$  com PMAxx™ e  $\Delta Ct^{\text{morto}}$  com e sem PMAxx™. Em relação ao tempo de fotoativação, o maior valor de  $\Delta Ct$  observado foi submetido a sete minutos em exposição à luz. A concentração do PMAxx™ que apresentou uma diferenciação de  $\Delta Ct$  maior foi de 25µL. **Discussão** Os resultados mostram que o PMAxx™ tem uma boa eficácia com outras bactérias, mas ainda apresenta dificuldades em intercalar ao DNA de *M. leprae*. O uso do corante após análise com RT qPCR/RLEP para o bacilo é um método que ainda necessita de ajustes nos parâmetros como purificação da amostra, tempo de exposição e fotoativação. Esses dados ainda são preliminares e não inviabilizam a perspectiva de novos experimentos a partir dos ajustes nos parâmetros já avaliados.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium leprae*; Hanseníase; corantes fluorescentes; viabilidade; monoazida de propídeo.

## ABSTRACT

**Introduction** Leprosy is a chronic infectious disease, caused by *Mycobacterium leprae*, which manifests itself in the skin and may invade the peripheral nervous system of the patient. Culturing its etiologic agent in artificial or cell culture media is still a challenge and obstacle for studies related to its microbiology. To assess the viability of bacterial cells, fluorescent dyes such as propidium monoazide (PMA) are used. The dye penetrates only cells with a compromised cell membrane and reacts with a hydrocarbon fraction to result in a permanent modification of the DNA. **Objective** To standardize the use of the dye propidium monoazide (PMAxx™) in combination with the real-time polymerase chain reaction (RT qPCR) technique for detection of *M. leprae* viability. **Methodology** Different concentrations of PMAxx™ were added to 250µl of purified bacillary suspension from plantar cushion of previously infected mice. The samples were incubated in the dark for different times. After incubation, they were photoactivated by exposure in a 650 W halogen lamp. The parameters of bacillary concentration, incubation time in the dark, light exposure time and concentration of PMAxx™ were evaluated. The bacillus DNA was extracted using a commercial kit and amplified by RT qPCR using specific primers for the Specific Repetitive Element (RLEP) regions of the *M. leprae*. **Results** There was no significant difference in the  $\Delta C_t$  value at any of the bacilli concentrations, indicating that discrimination between live and non-viable cells was not possible. The optimal incubation time in the dark was 60 minutes, as they showed a significant differentiation of  $\Delta C_t^{\text{live-dead}}$  with PMAxx™ and  $\Delta C_t^{\text{dead}}$  with and without PMAxx™. Regarding photoactivation time, the highest value of  $\Delta C_t$  observed was subjected to seven minutes in light exposure. The concentration of PMAxx™ that showed a greater differentiation of  $\Delta C_t$  was 25µL. **Discussion** The results show that PMAxx™ has good efficacy with other bacteria, but still presents difficulties in intercalating to *M. leprae* DNA. The use of the dye after analysis with RT qPCR/RLEP for the bacillus is a method that still needs adjustments in parameters such as sample purification, exposure time and photoactivation. These data are still preliminary and do not preclude the prospect of new experiments based on adjustments in the parameters already evaluated.

**Keywords:** *Mycobacterium leprae*; leprosy; fluorescent dyes; viability; propidium monoazide.

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	6
1.1 TÉCNICA PARA AVALIAR A VIABILIDADE DO <i>M. leprae</i> .....	8
1.1.1TÉCNICA DE SHEPARD.....	8
1.1.2 BACILOSCOPIA.....	9
1.1.3 OUTRAS METODOLOGIAS.....	9
1.1.4 MÉTODOS BIOMOLECULARES.....	10
1.1.5 CORANTES FLUORESCENTES.....	10
<b>2. OBJETIVO</b> .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	13
3.1 PRINCÍPIO DE AÇÃO DO CORANTE MONOAZIDA DE PROPÍDIO.....	13
3.2 OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO BACILAR PURIFICADA.....	14
3.3 PADRONIZAÇÃO DOS PARAMETROS EXPERIMENTAIS A PARTIR DA SUSPENSÃO DO <i>M.leprae</i> .....	14
3.4 EXTRAÇÃO DO DNA E RT qPCR.....	15
<b>4. RESULTADOS</b> .....	16
<b>5.DISSCUSSÃO</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26



## 1. INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), também conhecido como bacilo de Hansen, foi identificado em 1873 pelo médico dermatologista e bacteriologista norueguês Gerhard Henrick Armauer Hansen, tornando-se o primeiro patógeno bacteriano a ser associado a uma doença infecciosa humana, a hanseníase.<sup>1,2</sup>

Essa bactéria pertence à família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* e é um parasita intracelular obrigatório; apresenta-se sob a forma de um bacilo álcool-ácido levemente curvado ou reto, possui as extremidades arredondadas, imóvel e que se reproduz lentamente pelo processo de divisão binária – sua reprodução pode durar 20 dias – e que não possui plasmídeos nem produz toxinas.<sup>1,2</sup>

A hanseníase é uma doença crônica infecciosa que se manifesta na pele e pode invadir o sistema nervoso periférico do paciente, conhecida biblicamente desde 1500 a.C, cuja transmissão ocorre pela eliminação dos bacilos por meio das secreções nasais e pele lesionada.<sup>2,3,4</sup>

O diagnóstico da doença se baseia na presença de anestesia em lesões cutâneas, no espessamento de nervos periféricos ou na demonstração do bacilo no esfregaço de linfa.<sup>5</sup>

Acredita-se que a primeira manifestação da hanseníase tenha ocorrido na Índia, tendo sido levada para a Europa pelas tropas de Alexandre, o Grande, em 300 a.C, mantendo uma alta incidência no Oriente Médio e na Europa da Idade Média. Nas Américas, no entanto, entende-se como causa principal da disseminação o tráfico de escravos africanos. No Brasil, os primeiros casos foram detectados em 1600, na cidade do Rio de Janeiro, capital do país à época.<sup>6</sup>

Há quatro formas clínicas da hanseníase, cujas características estão baseadas nos critérios imunológicos, clínicos e histológicos da doença.<sup>5,6</sup>:

- Hanseníase Indeterminada: é a manifestação inicial da doença, comum de ser encontrada em crianças, cujo sistema imunológico ainda não é capaz de combater o bacilo. Manifesta-se através de máculas hipopigmentadas nas peles. Seu nome advém da dificuldade em se detectar a doença nessa fase, entretanto, é a forma mais fácil de ser curada.<sup>5,6</sup>

- Hanseníase Tuberculóide: manifesta-se através de poucas e pequenas lesões cutâneas que podem ocasionar a diminuição ou ausência de pelos e comprometimento neural. Além disso, nessa fase a degradação dos tecidos nervosos ocorre de maneira frequente. Se o paciente tiver um bom sistema imunológico, ele pode ser curado de maneira espontânea.<sup>5</sup>
- Hanseníase Virchoviana: é nessa forma clínica que o bacilo se multiplica rapidamente, aumentando a disseminação da doença. “Inicia-se com máculas mal definidas, discretamente hipocrômicas ou eritematosas, pouco visíveis, amplas e simetricamente distribuídas sobre a superfície corpórea. Esta fase tende a comprometer os lóbulos das orelhas, a região frontal, áreas extensas do tegumento entre outras. Em sua forma avançada, a doença pode ocasionar coriza mucopurulenta, obstrução, anosmia, epistaxe, desabamento nasal etc.”<sup>5</sup>
- Hanseníase *Borderline* ou Dimorfa: esta doença se caracteriza pela instabilidade imunológica, porque caminha entre os polos virchoviano e tuberculóide, podendo apresentar ambos os aspectos clínicos e sendo a forma mais instável dentro do espectro.<sup>5</sup>

Estudos comprovam que cada paciente possui uma resposta imune, que pode ocorrer em qualquer fase da doença, sendo considerada uma relação de dicotomia imunológica entre o bacilo e seu hospedeiro. Entretanto, é de suma importância considerar os episódios reacionais. Estes são considerados “fenômenos agudos sobrepostos à evolução crônica e insidiosa da hanseníase” potencialmente responsáveis pela perda funcional dos nervos periféricos e que podem agravar as incapacidades.<sup>6</sup>

As pesquisas em relação aos estudos reacionais mostram que eles são decorrentes do processo inflamatório e das respostas imunológicas contra os antígenos do bacilo *M. leprae*, e têm correlação com o status imunológico do paciente e a carga bacilar.<sup>6</sup>

Embora a hanseníase parece ser uma das mais antigas doenças que acometem o homem, o cultivo de seu agente etiológico em meios de cultura artificiais ou celulares, ainda é um desafio e obstáculo para o avanço em estudos relacionados

à sua microbiologia. Além de permitir isolar o microrganismo, o método de cultura “*in vitro*” também é muito útil na detecção de células viáveis. Como exemplo podemos citar a tuberculose, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, cuja quantidade dos bacilos viáveis presentes nas amostras de escarro dos pacientes é demonstrada por meio da cultura quantitativa. Já nos primeiros dias de tratamento da doença já se pode observar o declínio da viabilidade do bacilo, identificando precocemente se o tratamento está sendo adequado ou não, indicando a necessidade de testes de susceptibilidade para aqueles casos de resistência medicamentosa.<sup>7,8</sup>

## **1.1. TÉCNICAS PARA AVALIAR A VIABILIDADE DO *M. leprae***

### **1.1.1. TÉCNICA DE SHEPARD**

Na ausência do meio de cultura “*in vitro*”, a multiplicação dos bacilos e, conseqüentemente, a “comprovação da viabilidade” fora do organismo humano tem se limitado à inoculação do bacilo em alguns modelos animais como tatu e camundongos imunocompetentes ou imunodeficientes (*nude mouse*).<sup>9</sup> A técnica foi desenvolvida por Charles Shepard em 1960, inoculando entre 5000 e 10000 bacilos nos coxins plantares traseiros de camundongos imunocompetentes.<sup>10</sup>

A técnica de inoculação do bacilo em coxim plantar de camundongos (técnica de Shepard) foi o primeiro modelo confiável sobre a reprodução do bacilo fora do corpo humano. Neste estudo, Shepard inoculou bacilos obtidos a partir de biópsias de pacientes multibacilares não tratados, em camundongos que foram eutanasiados em diferentes períodos de tempo para exérese dos coxins. Ele observou que o bacilo se multiplicava por até um período de seis a oito meses após a inoculação e então atingia um platô, onde o processo de multiplicação bacilar cessava. A padronização da técnica foi muito importante para a implementação da poliquimioterapia (PQT) pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1981. Graças ao modelo, foi possível demonstrar que a associação de mais de uma droga ao invés do esquema de monoterapia (apenas uma droga) era mais eficaz para o tratamento da doença. Assim, o tratamento passou a ser administrado em esquema de associação das medicações dapsona, clofazimina e rifampicina.<sup>6</sup>

Essa técnica é utilizada como padrão ouro para comprovação da multiplicação e viabilidade do bacilo fora do organismo humano, além de ser útil na realização de

teste fenotípico para resistência a drogas, estudos de farmacocinética para novas drogas e para se criarem testes para agentes imunoproliféricos.<sup>6</sup>

### 1.1.2. BACILOSCOPIA DE RASPADO INTRADÉRMICO

Este método consiste na utilização de coloração de Ziehl-Neelsen à frio a fim de estimar a quantidade de bacilo, resultando em seu Índice Baciloscópico (IB) e Morfológico (IM)<sup>1</sup>. O IB expressa o número de bacilos, demonstrando que a doença se manifesta positiva em multibacilares e negativa em paucibacilares, enquanto o IM está associado à viabilidade do bacilo. A coloração irregular está associada com a morte do patógeno, uma vez que alterações na membrana citoplasmática podem levar a perda parcial e gradativa de conteúdo celular. Por outro lado, a integridade da coloração na morfologia do bacilo está associada com sua viabilidade, ou seja, acredita-se que apenas as células viáveis apresentem uma coloração intensa e sólida.<sup>11</sup> Até o momento o IM tem sido o método mais utilizado para descrever o aspecto dos bacilos em esfregaços de raspados dérmicos (baciloscopia) ou de biópsia.<sup>12</sup>

O exame de baciloscopia é um dos mais úteis no auxílio-diagnóstico da hanseníase, porque é de fácil execução, apresenta baixo custo, tem 100% de especificidade e baixa sensibilidade.<sup>13</sup>

### 1.1.3 OUTRAS METODOLOGIAS

Estudos envolvendo a utilização de técnicas mais complexas e com padrão de sensibilidade e confiabilidade maior, têm sido descritos por alguns autores. Métodos “in vitro” que avaliam produção de metabólitos específicos como adenosina trifosfato ou oxidação do ácido palmítico (método Buddemeyer), coloração com marcadores fluorescentes como diacetato de fluoresceína/brometo de etídeo e o kit para detecção de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight®, tem produzido bons resultados, com índices maiores de sensibilidade e especificidade quando comparados ao IM.<sup>14-19</sup>

#### 1.1.4. MÉTODOS BIOMOLECULARES

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido muito utilizada nos últimos anos, por ser um método sensível, rápido e específico para detecção do *M. leprae* em amostras clínicas. Assim, ela é utilizada para desenvolver diferentes sistemas de amplificação de sequências genômicas do bacilo para que o limite de detecção aumente ainda mais, especialmente quando se há um baixo número de bacilos, uma vez que ela também detecta e quantifica a bactéria em um curto espaço de tempo.<sup>6,20</sup>

A principal desvantagem, no entanto, é sua incapacidade de discriminar entre células vivas e mortas. Para o procedimento tornar-se ainda mais eficaz, é ideal associá-lo a outras ferramentas moleculares que agreguem o componente de viabilidade, como a análise de expressão e amplificação do RNA mensageiro (m-RNA).<sup>1</sup> Mesmo tratando-se de uma molécula instável, ela pode ser considerada uma boa escolha para a detecção de viabilidade de células bacterianas.<sup>21</sup> Martinez *et al.*, obtiveram um bom índice de correlação entre a expressão do mRNA/RLEP/16S com outros métodos já descritos, sugerindo que estas metodologias podem, de fato, oferecer um bom parâmetro de análise de viabilidade para o *M. leprae*.<sup>3</sup> No entanto, mesmo sendo resultados promissores, a degradação do RNA, a causa da morte celular, natureza e estabilidade do transcrito de RNA específico e a região amplificada podem ser fatores limitantes para aplicação desta metodologia para fins de diagnóstico.<sup>22</sup>

#### 1.1.5. CORANTES FLUORESCENTES

Outro método aplicável para avaliar a viabilidade de células bacterianas é a que se baseia na utilização de corantes fluorescentes como a monoazida de etídio (EMA) e a monoazida de propídeo (PMA).<sup>22</sup> O PMA é um corante de alta afinidade que reage com qualquer fração de hidrocarboneto a fim de resultar em uma modificação permanente do DNA. Estes corantes penetram seletivamente nas células que estão com a membrana celular comprometida, mas não naquelas intactas. Tradicionalmente, a integridade da membrana celular tem sido aceito como um indicador de morte celular, ou seja, células metabolicamente ativas ou viáveis

possuem a membrana celular intacta enquanto que a perda da integridade da mesma está associada à morte. O princípio desta metodologia se baseia no pressuposto de que o EMA ou PMA quando adicionado a uma mistura de células com membranas intactas e comprometidas, penetrariam seletivamente apenas nestas últimas. Uma vez no interior da célula, o corante consegue intercalar-se no DNA que, ao ser exposto à luz, será ativado levando à uma modificação irreversível e consequentemente interferindo na amplificação subsequente pela PCR quantitativo em tempo real (RT qPCR). O corante que não penetrou nas células – membrana intacta – é, ao mesmo tempo, inativado pela exposição à luz, não modificando o DNA durante o procedimento de extração. Comparando os dados de RT qPCR de amostras com corantes e sem corantes, é possível saber a proporção entre as células inviáveis e vivas presentes nessa amostra.<sup>23</sup>

O primeiro estudo utilizando o corante PMA para avaliar viabilidade em micobactérias foi realizado por Nocker *et al.* em 2006. Os autores obtiveram um bom índice de correlação entre os resultados do perfil de viabilidade do *M. avium* submetido ao PMA e qPCR com os da cultura convencional.<sup>24</sup>

Estudos envolvendo a aplicação do corante PMA para avaliar a viabilidade de micobactérias ainda são poucos, sendo a maioria relacionado ao *M. tuberculosis* uma vez que esta espécie é considerada potencialmente patogênica para o homem.<sup>25,26</sup> Os resultados obtidos por esses autores demonstraram que há uma necessidade em validar e padronizar os protocolos para cada espécie de microrganismo que será analisada. Dessa forma, variáveis como concentração do corante PMA, das condições de exposição à luz, tempos de incubação, entre outras devem ser testadas para que o resultado possa ter um bom índice de confiabilidade.

Em relação ao *M. leprae*, não há nenhum trabalho ou protocolo descrevendo a utilização do corante PMA na detecção de viabilidade. Considerando que ele não é cultivável *in vitro*, é muito importante e útil a padronização de uma metodologia que ofereça resultados rápidos e com alto valor de sensibilidade.

## 2. OBJETIVO

Padronizar parâmetros experimentais do uso do corante monoazida de propídio (PMAxx™) para detecção de viabilidade do *M. leprae* obtido de suspensão purificada de coxim plantar de camundongos previamente infectados.

### 3. MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 PRINCÍPIO DE AÇÃO DO CORANTE MONOAZIDA DE PROPÍDIO

A monoazida de propídio (PMAxx™) *Biotium* é um corante fotorreativo com alta afinidade para o DNA, que intercala em DNA, por ligação covalente, após exposição à luz visível intensa. Assim, inibe a amplificação do DNA por PCR. Uma vez que o corante não penetra na célula íntegra, apenas células com membranas celulares comprometidas são suscetíveis à modificação do DNA. Assim, a discriminação entre bactérias vivas e inviáveis pode ser feita por meio da RT qPCR, já que o DNA das células inviáveis terá amplificação retardada em relação às células viáveis, permitindo a detecção da viabilidade celular em populações mistas.

Diferentes concentrações de PMAxx™ foram adicionadas em 250µl de suspensão bacilar. Essas misturas foram incubadas no escuro por diferentes tempos. Após a incubação, as amostras foram fotoativadas por exposição em lâmpada halógena de 650 W (230 V, GX6.35 FS1, 3400 K; Osram GmbH, Augsburg, Germany), em diferentes tempos, à distância de 20 cm. Para a exposição os microtubos foram posicionados horizontalmente em gelo coberto com papel alumínio, em agitador horizontal. Após a fotoativação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 50 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o pellet usado para extração de DNA por meio de kit comercial.

Como controle de morte bacilar, para todas as amostras foram utilizadas suspensões idênticas submetidas a choque térmico para a morte do bacilo. Para tanto, estas suspensões foram submetidas ao choque térmico com três ciclos de um minuto em banho maria em 95°C e um minuto em imersão em nitrogênio líquido.

Os ciclos thresholds (Cts) fornecidos pelo software do equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific) foram analisados das seguintes formas:

- $\Delta C_t$  vivo-morto com PMAxx™ para avaliação da capacidade de discriminação entre as células vivas e inviáveis;



- $\Delta Ct$  morto com e sem PMAxx™ para avaliação da eficiência do ensaio (controle positivo);
- $\Delta Ct$  vivo com e sem PMAxx™ como controle efeito do corante sobre a viabilidade.

### 3.2. OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO BACILAR PURIFICADA

Os bacilos foram obtidos dos coxins plantares de camundongos atímicos nude (athymic nude, nu/nu – Foxn1nu) previamente infectados com a cepa *Thai* (*wild type*) de *M. leprae*, conforme descrito por Trombone *et al.*<sup>27</sup>. Em seguida, para ajuste da concentração bacilar, foi realizada a contagem dos bacilos em lâmina previamente preparada, fixada por aquecimento e corada pela técnica de Ziehl Neelsen a frio. Projeto submetido e aprovado pelo CEUA nº ILSL 004/19.

### 3.3 PADRONIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS A PARTIR DA SUSPENSÃO DE *M. leprae*

Os experimentos foram conduzidos conforme orientação do fabricante PMAxx™, com seguindo os seguintes parâmetros:

- Concentração do PMAxx™

Foram testadas as concentrações de 25, 50 e 100  $\mu M$ .

- Concentração bacilar

O PMAxx™ foi adicionado em 250  $\mu l$  de suspensões contendo  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  bacilos.

- Tempo de incubação

Os tempos de incubação da amostra com PMAxx™ no escuro foram de 05 (conforme bula do fabricante), 60 e 120 minutos.<sup>25</sup>

- Tempo de fotoativação

Foram testados os seguintes períodos de fotoativação: 05, 07 e 10 minutos.

### 3.4 EXTRAÇÃO DO DNA E RT-qPCR

O DNA do bacilo foi extraído utilizando-se um kit comercial (DNeasy Tissue QIAGEN®) de acordo com as orientações do fabricante. Para quantificar a concentração em ng/μl e pureza do DNA isolado foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

As amostras de DNA foram amplificadas por RT qPCR, com uso de primers específicos para as regiões Specific Repetitive Element (RLEP) do DNA de *M. leprae*, em equipamento StepOne Plus, conforme protocolo padrão instituído no laboratório de Biologia Molecular do Instituto Lauro de Souza Lima por Azevedo *et al.*<sup>28</sup>

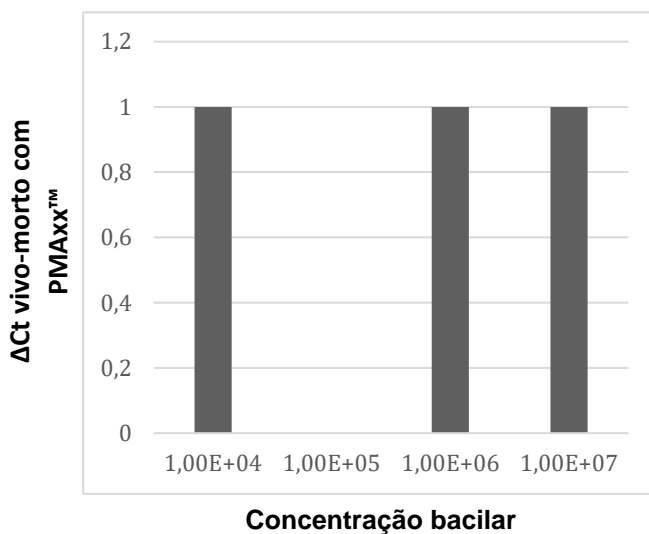
A curva de *melting*, fornecida pelo software do equipamento de RT qPCR, foi usada como controle de especificidade da reação, uma vez que os primers utilizados são específicos.

## 4. RESULTADOS

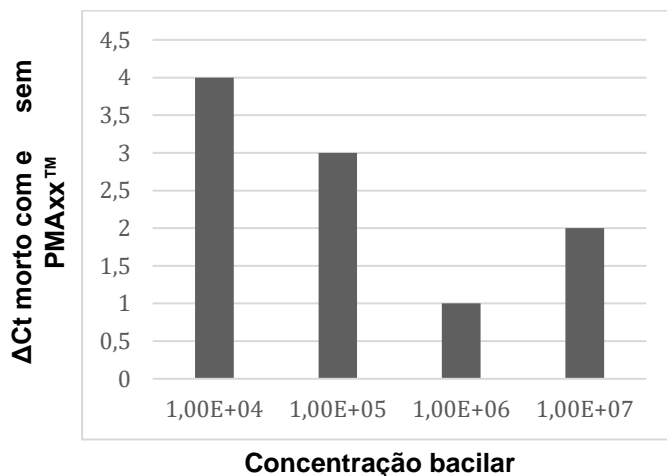
### 4.1 EFEITO DO PMAxx™ EM RELAÇÃO ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BACILO

Para a análise das diferentes concentrações de bacilo e sua influência na eficácia do corante em relação a capacidade de discriminação entre as células vivas e mortas, foram utilizados os seguintes parâmetros: tempo de incubação de 05 minutos, tempo de fotoativação de 03 minutos e concentração de PMAxx™ de 50µM (Figura 1). Não houve diferença significativa no valor do  $\Delta Ct$  em nenhuma das concentrações de bacilos, indicando que nessas condições (tempo de incubação, fotoativação e concentração do PMAxx™) não foi possível fazer a discriminação entre células vivas e mortas.

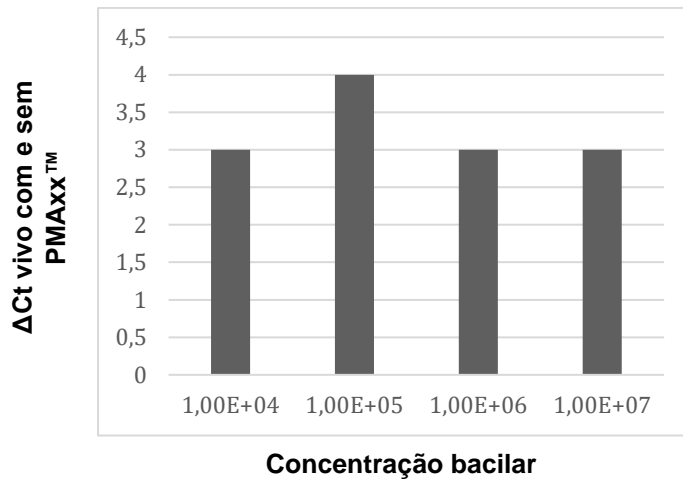
**Figura 1:** (A) Efeito das diferentes concentrações de bacilos na capacidade de discriminação entre células vivas e mortas. (B) Avaliação da eficiência do ensaio. (C) Controle no efeito do corante sobre a viabilidade.



A



B



C

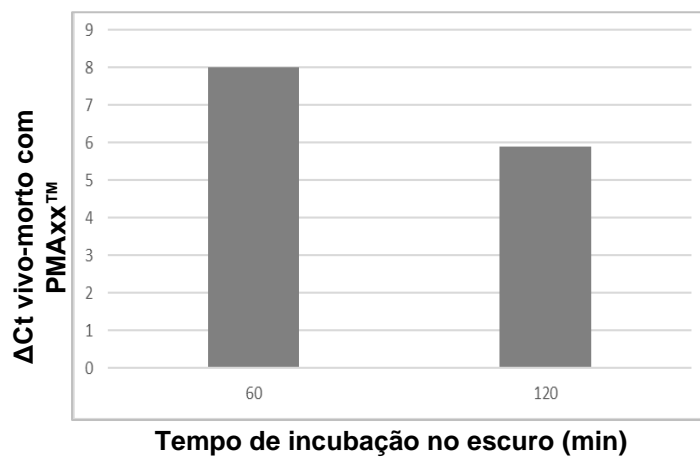
**Fonte:** Elaborada pelas autoras.

#### 4.2 TEMPO DE INCUBAÇÃO NO ESCURO

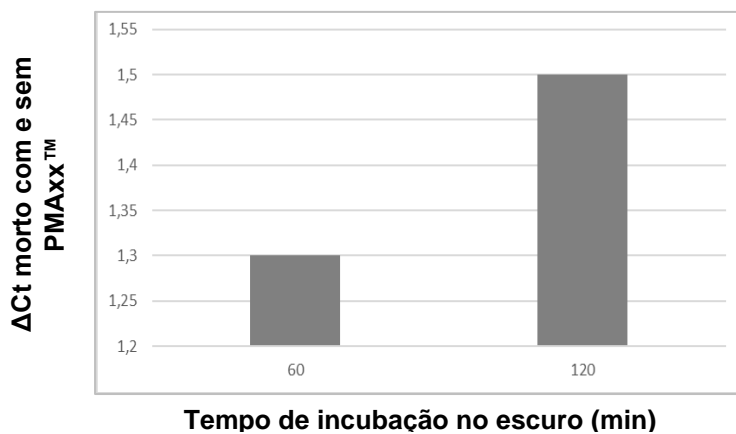
A avaliação da influência do tempo de incubação na discriminação entre as células vivas e mortas, eficiência do ensaio e efeito do corante sobre a viabilidade estão descritos na figura 2. Para este ensaio foi utilizada a concentração de  $10^6$  de bacilos.

O tempo ideal de incubação, conforme os gráficos abaixo, foi de 60 minutos, pois apresentaram uma diferenciação significativa do  $\Delta Ct^{\text{vivo-morto}}$  com PMAxx™ e  $\Delta Ct^{\text{morto}}$  com e sem PMAxx™, o que pode significar que esse tempo retardou a amplificação dos bacilos mortos, deixando um  $\Delta CT$  de 6,5 e  $\Delta CT$  de 8,0, respectivamente.

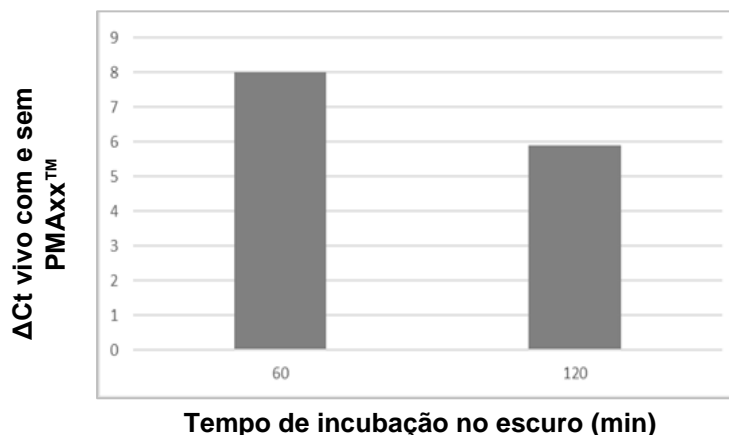
**Figura 2:** (A) Efeito dos diferentes tempos de incubação no escuro na capacidade de discriminação entre células vivas e mortas. (B) Avaliação da eficiência do ensaio. (C) Controle do efeito do corante sobre a viabilidade no tempo de incubação.



A



B



C

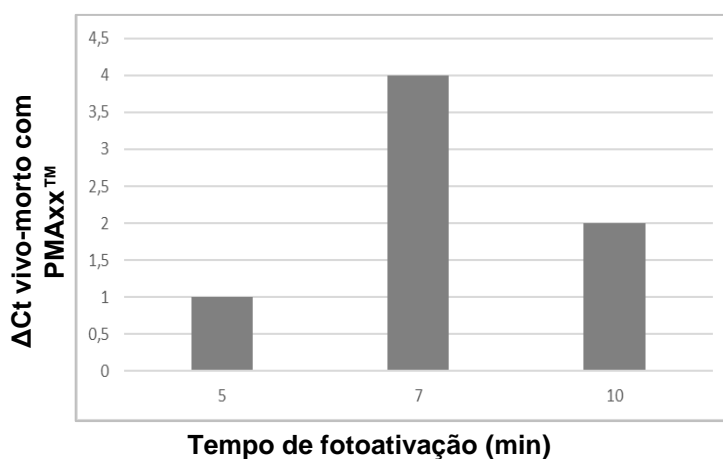
Fonte: elaborada pelas autoras.

### 4.3 TEMPO DE FOTOATIVAÇÃO

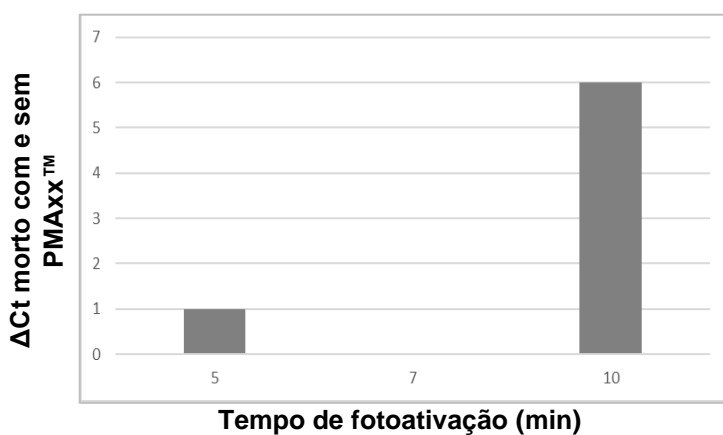
A avaliação da influência do tempo fotoativação (exposição à luz) na discriminação entre as células vivas e mortas, eficiência do ensaio e efeito do corante sobre a viabilidade, estão descritos na figura 3. Para este ensaio foi utilizada a concentração de  $10^6$  de bacilos.

Após análise do valor do  $\Delta Ct$ , comparando-se a diferença de CT entre bacilo morto e vivo tratados com PMAxx™, o maior valor foi observado no grupo foi submetido a sete minutos de exposição à luz.

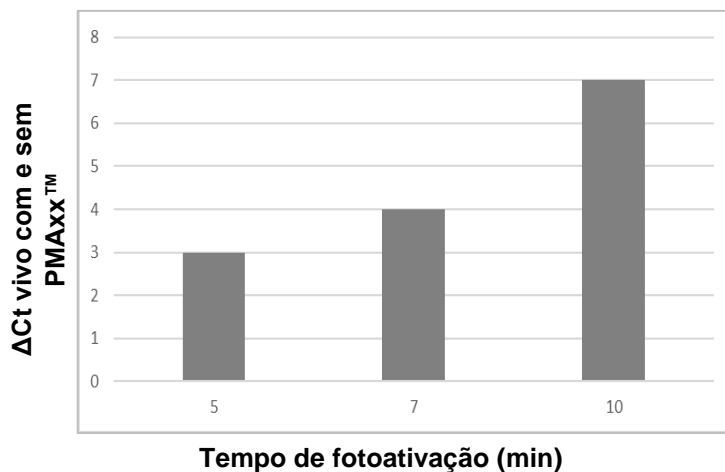
**Figura 3:** (A) Efeito dos tempos de fotoativação na capacidade de discriminação entre células vivas e inviáveis. (B) Avaliação da eficiência do ensaio. (C) Controle do efeito do corante sobre a viabilidade na fotoativação.



A



B



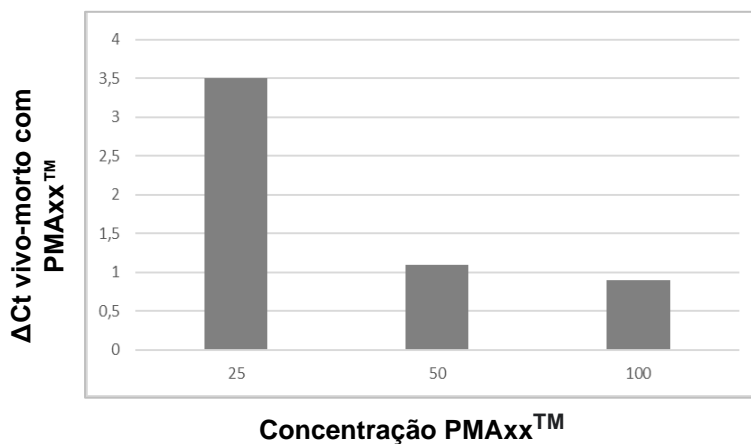
C

Fonte: Elaborada pelas autoras.

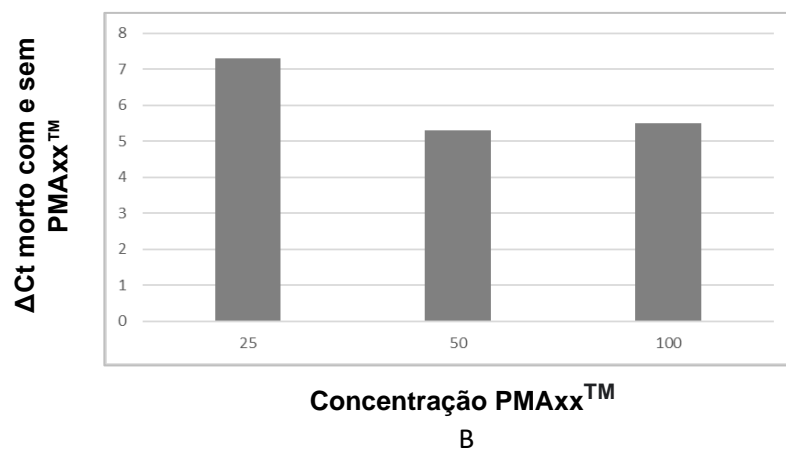
#### 4.4 CONCENTRAÇÃO DO PMAxx™

As células vivas e mortas foram expostas as diferentes concentrações do corante (25μl, 50μl e 100μl), para avaliar a possibilidade de altas concentrações do corante interferir na eficácia do teste, ou seja, capacidade de distinguir entre bacilo vivo e morto. Para este ensaio foi utilizada a concentração de  $10^6$  de bacilos. Conforme mostrado nos gráficos abaixo, a concentração de 25μL foi a que apresentou uma maior variação no  $\Delta C_t$  se comparado às outras concentrações.

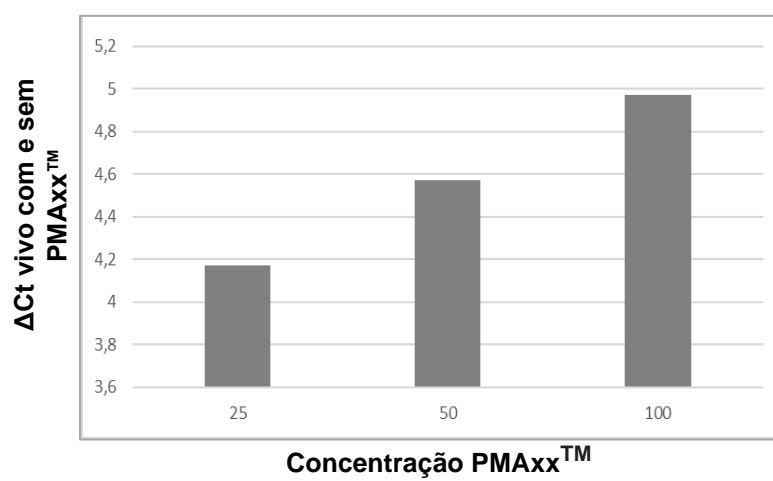
**Figura 4:** (A) Efeito da concentração do PMAxx™ na capacidade de discriminação entre células vivas e mortas. (B) Avaliação da eficiência do ensaio. (C) Controle da concentração do PMAxx™ sobre a viabilidade.



A



B



C

Fonte: elaborada pelas autoras.



## 5. DISCUSSÃO

A integridade da membrana celular tem sido aceita como um indicador de morte celular, ou seja, células metabolicamente ativas ou viáveis possuem a membrana celular intacta enquanto que a perda da integridade da mesma está associada à morte. Diversos fatores como temperatura, predação e infecção viral, atuam na regulação da vida/morte das células, incluindo as bacterianas, culminando em um processo de perda morfológica e funcional da célula, como a replicação.

Relatos da utilização do PMA para avaliar viabilidade de organismos do gênero *Mycobacterium* são raros na literatura, sendo o *M. tuberculosis* e *M. avium* as espécies avaliadas com as quais foi possível a reprodutibilidade da técnica. As espécies do gênero *Mycobacterium* possuem algumas características microbiológicas distintas quando comparadas às bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. Uma delas é que a maioria necessita de algumas semanas para formar colônias visíveis na superfície do meio de cultura e a outra é a parede celular mais espessa e rica em lipídios. Estas peculiaridades aliadas às outras condições metabólicas demandam a necessidade de se padronizar e ajustar os protocolos que são aplicáveis aos outros microrganismos, como às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Em trabalho realizado por Jie L *et al.*<sup>25</sup>, amostras de escarro de pacientes com tuberculose foram cultivadas em meio de cultura e utilizadas como controle nas análises para avaliar a performance do PMA na detecção da viabilidade do *M. tuberculosis*. Kralik P *et al.*<sup>23</sup>, também utilizaram amostras do *M. avium* em cultura. Embora o crescimento em meio de cultura seja considerado o padrão ouro para controle de viabilidade micobacteriana, o tempo necessário para que a colônia seja visível na superfície do meio, pode demorar em torno de uma até quatro semanas, dependendo da espécie. Esta demora acaba trazendo prejuízo ao paciente, levando ao diagnóstico e tratamento tardio da infecção.

Em relação ao *M. leprae*, a padronização desta metodologia torna-se mais complicada, devido à característica intrínseca do bacilo de não se reproduzir em meios de cultura artificiais, o que impede análises comparativas de viabilidade. Os resultados mostrados na figura 1 foram obtidos a partir da utilização dos parâmetros indicados na bula do PMAxx™. A diferença no valor do  $\Delta Ct$  foi de apenas um ciclo, indicando

que nestas condições, a técnica não foi capaz de produzir um resultado confiável de eficácia. *Nocker et al.*<sup>24</sup> obtiveram uma diferença de sete ciclos (CT) ao avaliarem amostras de *M. avium* vivo e morto tratadas com PMAxx™. No entanto, os autores consideraram que o índice não foi tão expressivo quando comparado com o de outras espécies bacterianas, usando os mesmos parâmetros de concentração, tempo de incubação e fotoativação.

Considerando que as condições propostas pela bula do kit do PMAxx™ não produziram resultados satisfatórios, o tempo de incubação no escuro foi modificado para 60 e 120 minutos. Conforme demonstrado na figura 2, o tempo de incubação no escuro por 60 minutos apresentou uma eficácia aceitável, com diferença de 6,5 no CT entre vivo e morto com PMAxx™. Segundo *Lu et al.*<sup>23</sup>, para o *M. tuberculosis* o tempo de incubação por 120 minutos produziu valores de  $\Delta Ct$  (vivo e morto com PMA), mais altos quando comparado com os dos demais tempos avaliados (10, 20, 40 e 60 minutos). É bem conhecido que a parede celular da família *Mycobacterium* é espessa, formando uma barreira de permeabilidade eficiente, que torna essa família naturalmente resistente à entrada de substâncias químicas. No caso do *M. tuberculosis*, essa camada de gordura é bem espessa que a do *M. leprae* e por isso a diferença no tempo de incubação apresenta resultados distintos entre as duas espécies.

Os tempos de fotoativação (figura 3) avaliados foram de 05, 07 e 10 minutos. Nesta etapa o corante se liga covalentemente ao DNA da célula morta, por meio da exposição à luz. Em relação à eficácia do teste, o melhor resultado, com maior diferença de CT, foi no tempo de 07 minutos. No de 10 minutos, o efeito do corante sobre a viabilidade mostrou uma diferença de 07 CTs, o que não é um resultado aceitável considerando que para essa análise considera-se apenas bacilos viáveis com e sem PMAxx™, sem variação de CT. Corantes fluorescentes usados para determinar a viabilidade de patógenos bacterianos, como EMA e PMA, embora sejam eficientes para inibir a amplificação do DNA das células com comprometimento na membrana (mortas), também pode penetrar na membrana das células vivas, levando à erros de interpretação do resultado.<sup>29-32</sup> O quanto é possível o corante penetrar nas células intactas é dependente da espécie bacteriana. O PMA, por outro lado, parece ser altamente seletivo para células com membrana danificada, sem entrada em

células viáveis.<sup>33</sup> No nosso estudo, um tempo mais longo de fotoativação pode ter favorecido a entrada do corante ou danificado a membrana do bacilo, levando a uma inconsistência do resultado.

Em relação a concentração do corante (figura 4), foi observado que uma concentração muito alta de PMAxx™ interfere na diferenciação de CTs entre células vivas e ~~inviáveis~~ mortas. Kralik *et al.*<sup>23</sup>, trabalhando com a adequação do tratamento do PMA em *M. avium*, relataram que para diferença de CTs entre células vivas e inviáveis a concentração ideal foi de PMA até 25 µM. Entretanto, não observaram mudanças significativas nas concentrações de 50 µM e 100 µM. Além disso, vários estudos demonstram que uma concentração alta de PMA pode levar a resultados falsos-negativos devido à associação da toxicidade dos corantes nas células vivas.<sup>23</sup>

Os resultados mostram que o PMAxx™ tem uma boa eficácia com outras bactérias, mas ainda possui dificuldade em intercalar no DNA de *M. leprae*. O motivo não é totalmente identificado e preciso, mas pode ocorrer devido a abundância de lipídios em sua parede externa (bacilo álcool-ácido resistente) da mesma forma como se observa em outras espécies de micobactérias patogênicas. A parede celular do *M. leprae* possui cerca de 20 nm de espessura e sua estrutura química e é composta por peptidoglicanos e polissacarídeos, semelhante à de outras micobactérias, com função de suporte para os ácidos micólicos. Porém, além da parede celular, o bacilo apresenta uma estrutura mais externa denominada cápsula, o que torna mais complexa a degradação e rompimento de sua membrana celular do que de outras micobactérias, dificultando a entrada integral do corante PMAxx™.<sup>34</sup>

Um fator que pode limitar a qualidade dos resultados, independente da variável analisada, é que a suspensão do bacilo, mesmo após ter passado pelo processo de purificação, ainda carrega *debris* celulares da pata do camundongo. Na etapa de extração do DNA, ~~provavelmente~~ o do camundongo é extraído juntamente com o do bacilo, diminuindo o valor da pureza das amostras e conseqüentemente interferindo no experimento. Esse viés não se observa com bactérias cultiváveis, como *M. tuberculosis* e *M. avium*, pois tem-se a amostra pura, livre do DNA do hospedeiro. Outra possibilidade é a característica - comum às micobactérias - de formar aglomerados (*clumps*) ou globias, como é o caso do *M. leprae*. Este fenômeno pode ter afetado a etapa de extração do DNA pela técnica do choque térmico, impedindo

que a parede celular fosse rompida uniformemente, principalmente entre aqueles bacilos das globias; esses aglomerados também poderiam “aprisionar” bacilos mortos, conforme descrito por Kralik *et al.*<sup>23</sup> ao avaliar os resultados com *M. avium*.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o uso do corante PMAxx™ após análise com RT qPCR/RLEP para o *M. leprae* é um método que ainda necessita de ajustes nos parâmetros como purificação da amostra, tempo de exposição e fotoativação. Esses dados ainda são preliminares e não inviabilizam a perspectiva de novos experimentos a partir dos ajustes nos parâmetros já avaliados.

## REFERÊNCIAS

1. Diorio SM; Latini ACP; Bertoluci DFF; Rosa PS; Fachin LRV. Padronização do uso da monoazida de propídio (PMAxx™) na detecção de viabilidade do *Mycobacterium leprae*. Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, mai. 2019.
2. Paula NA. Pele humana como modelo ex vivo para manutenção do bacilo *Mycobacterium leprae* [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2019.
3. Martinez ANM; Lahiri R; Pittman TL; Scollard D; Truman R; Moraes MO; Williams DL. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2124-30, jul. 2009.
4. Desikan KV. Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev*, v. 66, p. 287-95, 1995.
5. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial, *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 30, p. 325-34, jul./set. 1997.
6. Sartori BGC. Determinação Molecular da Viabilidade do *Mycobacterium leprae*: uma comparação com outras abordagens metodológicas. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2015.
7. Jindani A; Doré CJ; Mitchison DA. Bactericidal and sterilizing activities of antituberculosis drugs during the first 14 days. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1348–54.
8. Davies GR; Brindle R; Khoo SH; Aarons LJ. Use of nonlinear mixed effects analysis for improved precision of early pharmacodynamic measures in tuberculosis treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3154–6.
9. Truman RW; Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 2001; 69:1-12.
10. Charles B; Shepard C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 960;112:445–54.
11. Kazuko S; Shinzo I. Electron Microscopic Study of the Morphologic Index. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1973; 41(1): p 1-6

12. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2010, 54 p.
13. Limeira OM. Um estudo sobre a concordância entre os testes ML Flow e Baciloscopia no controle da hanseníase em casos novos e reacionais pós alta multibacilares e seus contatos. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina; 2006.
14. Agrawal VP; Shetty VP. Comparison of the mouse foot pad test with a Buddemeyer type radiorespirometric assay in detecting viable *Mycobacterium leprae* in human lesional biopsies. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2007; 73(6):384-88.
15. Franzblau SG; Biswas AN; Jenner P; Colston MJ. Double-blind evaluation of BACTEC and Buddemeyer-type radiorespirometric assays for in vitro screening of antileprosy agents. *Lepr rev*, 1992; 63:125-33.
16. Franzblau, SG. Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an axenic medium. 1988, *J Clin Microbiol*; 26:18–21.
17. Harshan KV; Prasad HK; Chopra NK; Mishra RS; Gogiya P; Nath I. Comparison of radiometric macrophage assay and fluorescein diacetate/ Ethidium bromide staining for evaluation of *M. leprae* viability. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1987; 55:316-21.
18. Katoch VM; Katoch K; Ramanathan U; Sharma VD; Shivannavar CT; Datta AK, *et al.* Effect of chemotherapy on viability of *Mycobacterium leprae* as determined by ATP content, morphological index and FDA-EB fluorescent staining. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1989; 57:615-21.
19. Lahiri R; Randhawa B; Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic(nu/nu) mouse foot pad. *J Med Microbiol*, 2005; 54: 235–24.
20. Lastória JC; Abrey MAMM. Hanseníase: Diagnóstico e tratamento. *Diagn Tratamento*, v. 17, n. 4, p. 173-79, 2012.
21. Birmingham P; Helm JM; Manner PA; Tuan RS. Simulated joint infection assessment by rapid detection of live bacteria with real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2008 v.90A, 602– 08.
22. Birch L; Dawson CE; Cornett JH; Keer JT. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Letters in Applied Microbiology*. 2001 v.33, 296–301.
23. Kralik P; A Nocker, I Pavlik. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide

treatment. *Int J Food Microbiol.* 2010 Jul 31;141 Suppl 1:S80-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.018>.

24. Nocker A; Cheung, CY; Camper AK. Comparison of propidium monoazide and ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods.* 2006 Nov;67(2):310-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.015>.310–20.

25. Lu J; Zheng H; Chu P *et al.* Direct detection from clinical sputum samples to differentiate live and dead *Mycobacterium Tuberculosis*. *J Clin Lab Anal* 2019 mar;33(3):e22716. doi: <https://doi.org/10.1002/jcla.22716>.

26. Xavier AK; Sven OF; Miriam NK; Lize van der Merwe; Neil AM; Andreas HD. Propidium monoazide and Xpert MTB/RIF to quantify *Mycobacterium tuberculosis* cells. *Tuberculose(Edinb).* 2016 dez; 101:79-84. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.08.006>.

27. Ana Paula FT; Sílvia CBP; Suzana MD; Andrea FFB; Luciana RVF; Dejair CN; Patrícia SR. optimized Protocols for *Mycobacterium leprae* Strain Management: Frozen Stock Preservation and Maintenance in Athymic Nude Mice. *Journal of Visualized Experiments. Fator de Impacto(2017 JCR):* 1,1840, v.85, p.1 - 7, 2014.

28. Michelle CSA; Natália MR; Luciana RVF; Mônica T; Patrícia SR; Andrea FFB; Suzana MD; Cleverson TS; Gustavo PG; Ana Paula FT. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases (Impresso). Fator de Impacto(2017 JCR):* 2,0830, v.21, p.71 - 78, 2016.

29. Cawthorn DM; Witthuhn RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J. Appl. Microbiol.* 2008 105, 1178–85.

30. Flekna G; Stefanic P; Wagner M; Smulders FJ; Mozina SS; Hein I. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Res. Microbiol.* . 2007 158, 405–12.

31. Pan Y; Breidt Jr F, 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by realtime PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 8028–31.

32. Rueckert A; Ronimus RS; Morgan HW. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology* 2005 v. 99, 1246–55.

33. Nocker A; Mazza A; Masson L; Camper AK; Brousseau R. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of Microbiological Methods*. 2009 v.76, 253–61.
34. Madeira S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia* [Internet]. Bauru: Centro de Estudos “ Dr. Reynaldo Quagliato”; 2000. p. 13-7. [citado em 10 fev. 2022]. Disponível em<[http://hansen.bvs.isl.br/textoc/livros/OPROMOLLA\\_DILTOR\\_nocoos/PDF/aspecto\\_leprae.pdf](http://hansen.bvs.isl.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoos/PDF/aspecto_leprae.pdf)>.