



UTILIZAÇÃO DE RESAZURINA PARA QUANTIFICAÇÃO DE LEPTOSPIRAS *IN VITRO*

GUILHERME AUGUSTO ROSA¹; CAROLINA RODRIGUES FELIX²; LIANA NUNES BARBOSA³; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – guiguilherme.rosa@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolinarodriguesfelix@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – liana.tlo@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leptospira*, pertencente à família Leptospiraceae, compreendido dentro da ordem Spirochaetales (ADLER, 2015). Possui 35 espécies descritas, sendo estas divididas entre 13 espécies patogênicas, 11 espécies intermediárias e 11 espécies saprófitas (PICARDEAU et al, 2017; THIBEAUX et al, 2018). As espécies patogênicas do gênero *Leptospira* são os agentes etiológicos da leptospirose, uma importante e negligenciada zoonose de distribuição mundial (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010), que possui altos índices de morbidade e mortalidade por ano, chegando a 59 mil mortes e mais de um milhão de casos graves em humanos (COSTA et al, 2015).

Embora seja uma doença importante, o conhecimento sobre agente etiológico é pouco desenvolvido. Percebe-se principalmente no âmbito de técnicas para manipulação do microrganismo em condições *in vitro* e experimentais. Técnicas elucidadas em outros microrganismos não se traduzem bem quando testados em leptospirose. Isso inclui até técnicas mais simples, como a quantificação de leptospirose para quaisquer fins, apresentam pouca variabilidade e inovação. A quantificação de leptospirose é feita por contagem manual, através de microscopia de campo escuro com o auxílio da câmara de Petroff-Hauser. É um processo laborioso e demorado que requer pessoal treinado para obter resultados confiáveis. Existem métodos alternativos para a quantificação de leptospirose, mas mesmo estes apresentam diversas complicações. Uma destas metodologias é a citometria de fluxo (FONTANA, 2017). Este método não apresenta ganho de sensibilidade quando comparado à microscopia, e necessita de equipamentos e insumos caros. Este método, embora eficaz, se mostra custoso e dependente de pessoal treinado para manipular o equipamento corretamente, o que não torna esta metodologia a ideal para a pesquisa.

A metodologia de quantificação com resazurina utiliza insumos baratos e sua execução é simples, mas nunca foi aplicada a leptospirose. A resazurina é uma substância de coloração azulada, que pode ser reduzida à resorufina através do metabolismo dos organismos. A resazurina não apresenta propriedades fluorescentes, diferente da resorufina, que sua excitação entre os comprimentos de onda de 530-570 nm fazem a molécula emitir sinais nos comprimentos de onda de 590-620 nm (BARNES et al, 1980). O equipamento utilizado é mais barato do que os de metodologias alternativas, e várias amostras podem ser analisadas simultaneamente. A resazurina já foi demonstrada como não tóxica, e um bom indicador para viabilidade celular (RAMPERSAD, 2012), podendo ser possível até recuperar as leptospirose utilizadas para a quantificação, caso necessário. Também já foi testada para a quantificação de biofilme a partir da



medição de fluorescência obtida em outras bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* e *Candida albicans* (DRIESSCHE et al, 2014). Este trabalho tem como o objetivo estabelecer uma nova metodologia simples, eficaz e de baixo custo a partir do uso da resazurina, e que seja capaz de quantificar com um bom grau de confiança a concentração de leptospiras aproximada em uma amostra, apresentando vantagens em comparação com outros métodos.

2. METODOLOGIA

A bactéria utilizada foi a cepa não patogênica Castellon 3 de *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum sorovar Castellonis. A cepa foi descongelada e sua manutenção *in vitro* se deu por repiques semanais em meio EMJH++ (GRASSMANN et al, 2015). A avaliação da qualidade da cultura foi realizada previamente a cada repique, sendo este sempre realizado com uma cultura saudável e em fase exponencial.

Para certificar-se que a resazurina é capaz de discriminar leptospiras vivas de mortas, realizou-se um teste visual. Para isso, quatro diferentes concentrações finais de resazurina (250 µg/ml, 100 µg/ml, 25 µg/ml e 10 µg/ml) foram adicionadas em amostras bacterianas com concentrações entre 5×10^7 e 1×10^8 leptospiras/ml. Realizou-se este teste com leptospiras saudáveis e com leptospiras inativadas termicamente a 56 °C por 20 minutos. A reação foi incubada por 4 horas, onde a cada hora de incubação se observava o andamento da reação. Para essa análise, o experimento foi realizado apenas uma vez.

A partir do teste visual, definiu-se para testes com fluorescência a utilização das concentrações finais de 100 e 25 µg/ml de resazurina para este piloto e as concentrações finais de leptospiras de 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 e 5×10^7 leptospiras/ml para as análises de emissão de fluorescência. Este teste foi realizado para avaliar se existe uma correlação entre a emissão de fluorescência e a concentração de leptospiras nas amostras. A cultura bacteriana foi contada com o auxílio da câmara de Petroff-Hauser, e diluiu-se as leptospiras para as concentrações desejadas. As leituras foram feitas em duplicata experimental para cada condição, e o período de incubação foi de 3 horas. Os parâmetros utilizados foram de 590 nm para a leitura da emissão, e 540 nm para a excitação da fluorescência da resorufina, molécula obtida através da interação com o metabolismo celular, responsável pelas leituras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste visual avaliando a diferença entre culturas vivas e mortas em contato com resazurina demonstrou que leptospiras inativadas termicamente não reagem com a resazurina, conforme observado na figura 1. Tal resultado indica uma leitura sensível, que distingue leptospiras vivas de mortas, portanto os valores lidos sempre relacionados com as leptospiras vivas em amostras.

A resazurina apresenta uma forte coloração azulada. Quando em contato com enzimas envolvidas na respiração celular é reduzida à resorufina, e sua tonalidade muda para tons de rosa, sendo perceptível o metabolismo das bactérias em suspensão (BARNES et al, 1980; RAMPERSAD, 2012).



Figura 1 – Amostras com as concentrações de resazurina de 250 µg/ml (A), 100 µg/ml (B), 25 µg/ml (C) e 10 µg/ml (D) após 4 horas de incubação. Da esquerda para a direita: culturas vivas nas concentrações de resazurina A, B, C e D, respectivamente, e culturas mortas nas concentrações de resazurina A, B, C e D, respectivamente.

As leituras de fluorescência apresentaram valores de emissão que possuíam uma forte correlação conforme o aumento da concentração de bactérias nas amostras. Os valores de fluorescência observados em cada amostra estão apresentados, Tabela 1. Da mesma forma, um gráfico representando as concentrações de leptospiros, bem como as emissões observadas de cada leitura, estão dispostas, Figura 2.

Tabela 1 - Valores de fluorescência emitida a partir das duplicatas das diferentes concentrações de leptospiros/ml.

Concentração de leptospiros/ml	Fluorescência da Primeira Amostra	Fluorescência da Segunda Amostra	Média das Fluorescências
5×10^5	6.205	3.493	4.849
1×10^6	6.750	6.208	6.479
5×10^6	38.805	33.231	36.018
1×10^7	65.420	64.855	65.138
5×10^7	192.072	204.567	198.320

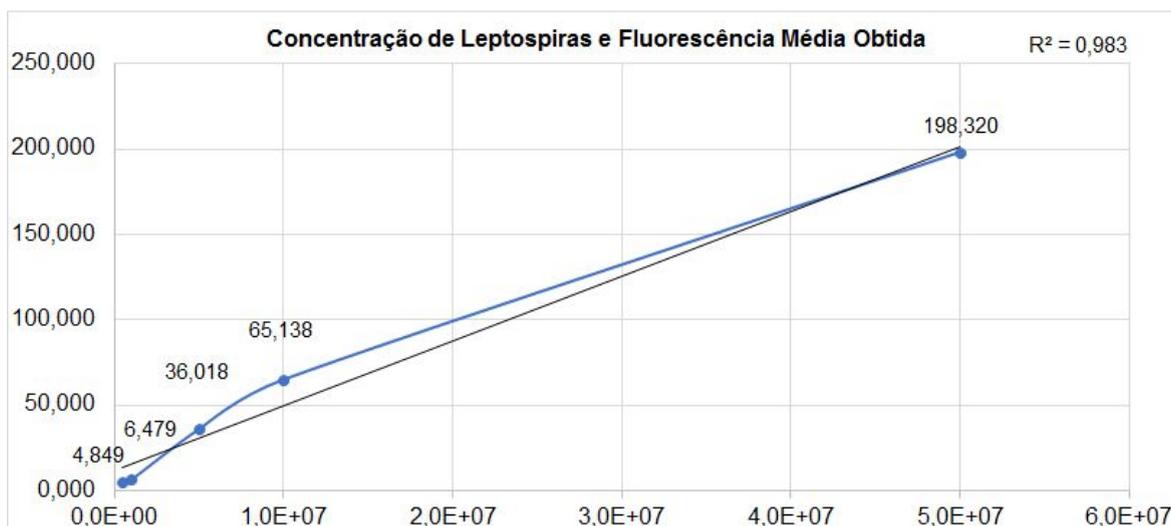


Figura 2 - Emissão média de fluorescência pelas diferentes concentrações de leptospiros nas amostras. Observa-se que há uma forte tendência linear dos resultados obtidos, com um $R^2 = 0,983$.



4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados prévios obtidos, pode-se inferir que a resazurina apresenta potencial para ser utilizada na quantificação de leptospiras. Dessa forma, pode ser possível determinar em qual escala logarítmica encontra-se a cultura, baseado na fluorescência emitida.

A técnica de quantificação de leptospiras utilizando resazurina pode, com mais testes e maior compreensão da técnica de se tornar tão boa quanto as técnicas de quantificação clássicas e alternativas. Pode equiparar-se em termos de qualidade, de uma forma pouco laboriosa e de baixo custo, sendo também capaz de fornecer resultados confiáveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. Current topics in Microbiology and Immunology, v.387, doi:10.1007/978-3-662-45059-8.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still *terra incognita*? **Nat Rev Microbiol**, v.15, n. 5, p. 297-307, 2017.

THIBEAUX, R., et al. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. **Microbial Genomics**, Londres, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2018.

ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3, p. 287-296, 2010.

COSTA, F., et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.9, n.9, p. e0003898. 2015.

FONTANA, C.. Use of flow cytometry for rapid and accurate enumeration of live pathogenic *Leptospira* strains. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 34-40, 2017.

BARNES, S. Stoichiometry of the nadh-oxidoreductase reaction for dehydrogenase determinations, **Clinica Chimica Acta**, North-Holland, v. 107, n. 3, p. 149-154, 1980.

RAMPERSAD, S. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays, **Sensors**, Basel, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

DRIESSCHE, F. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 98, p. 31-34, 2014.

GRASSMANN, A., et al. Generation of Mammalian Host-adapted *Leptospira* interrogans by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats. **Bio-protocol**, Sunnyvale, v.5, e1536, 2015.