



Imageamento por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por Tempo de voo (MALDI-TOF) de colônias de bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina: etapas iniciais

Milena C. V. Fernandes, Pedro H. Vendramini, Marcelo Brocchi, Ana Valéria C. Simionato

Abstract

Pathogenic bacteria remain the primary target of studies due to their prevalence in the environment, specifically the healthcare setting. The use of antibiotics and antimicrobials are essential to treat the symptoms of harmful strains of bacteria. However, although medicinal alternatives exist to eliminate harmful microorganisms, bacteria have the capability to evolve. For this reason, resistant properties have become a growing problem in the healthcare setting, creating various scientific interests of study. Herein, mass spectrometry imaging will be used to identify, compare and evaluate metabolites produced by both methicillin-resistant and non-resistant strains of *Staphylococcus aureus* bacteria. Comparison between the metabolic profile of both strains provides a further comprehension on how these resistant characteristics were formed, their biological function, and how they can potentially be treated.

Keywords: Mass Spectrometry Imaging, Resistant bacteria, Metabolomics

Resumo

Bactérias patogênicas continuam sendo o alvo principal de estudos devido à sua prevalência no meio ambiente, especificamente no ambiente hospitalar. O uso de antibióticos e antimicrobianos é essencial para tratar os sintomas de cepas de bactérias nocivas. No entanto, embora existam alternativas medicinais para eliminar microrganismos nocivos à saúde humana, as bactérias têm a capacidade de evoluir. Por isso, as propriedades de resistência têm se tornado um problema crescente no cenário da saúde, gerando diversos interesses científicos de estudo. Neste estudo, o imageamento por espectrometria de massas será usado para identificar, comparar e avaliar os metabólitos produzidos por cepas de bactéria *Staphylococcus aureus* resistentes e não resistentes a metilina. A comparação entre os perfis metabólicos de ambas as cepas fornece uma compreensão mais ampla sobre como essas características resistentes foram formadas, sua função biológica e como podem ser potencialmente tratadas.

Palavras-chaves: Imageamento por Espectrometria de Massas, bactérias resistentes, Metabolômica

Introdução

Infecções nosocomiais são infecções secundárias causadas por bactérias propensas a situações hospitalares. Ocasionalmente, esses microrganismos patogênicos contêm propriedades resistentes devido a um evento de internação do paciente no ambiente hospitalar, levando à resistência a antibióticos comumente usados. Propriedades resistentes podem ser formadas ao longo do tempo ou através de alterações da estrutura celular, como a membrana bacteriana. Muitos alvos de medicamentos estão localizados na membrana celular, parede ou citoplasma; portanto, modificações nessas organelas podem impedir o acesso do medicamento a um alvo.¹

Para estudar essas propriedades de resistência, o presente trabalho utilizará uma abordagem metabolômica. A metabolômica é a ciência ômica que estuda os metabólitos de um sistema biológico e suas alterações. Entende-se por metabólitos as espécies de baixa massa molar e diversas funções químicas, sendo os produtos finais ou intermediários do metabolismo do sistema biológico a ser estudado.²

A análise dos metabólitos de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e selvagem, será feita por Imageamento por Espectrometria de Massas (MSI). O MSI tornou-se particularmente popular devido à capacidade de localizar espacialmente um composto de interesse em uma superfície pela investigação da razão m/z . De forma simplificada, uma imagem é obtida por MSI pela ionização da superfície

da amostra e análise dos respectivos íons em cada pixel. Os espectros obtidos são compilados e imagens para cada m/z são geradas por softwares. Como cada pixel da imagem gerada tem seu respectivo espectro, do qual a informação da abundância relativa é obtida, é possível identificar quais os compostos presentes e sua abundância em cada região da superfície (Figura 1).³

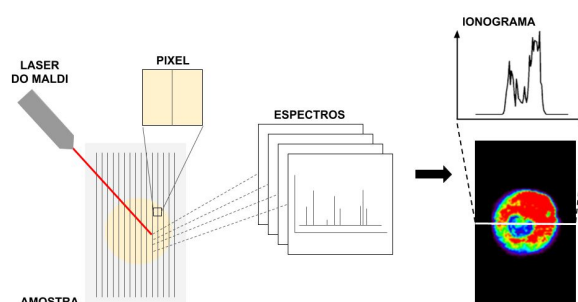


Figura 1. Esquema da obtenção de imagens por MALDI-MSI.

Para obtenção das imagens desse trabalho, será usada a Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI) e o analisador por Tempo de voo (TOF). Assim, nas análises por MALDI-IMS, a matriz pode ser depositada sobre a amostra por re-sublimação para formação de cristais. Um laser atinge a amostra incorporada aos cristais de matriz e as moléculas da matriz são fotoionizadas, gerando os respectivos íons. A energia absorvida pelos íons da matriz é transferida para moléculas neutras de analito e os íons dos analitos e da matriz são introduzidos no analisador de massas (Figura 2). A matriz é fundamental em todo o processo e deve ser escolhida de acordo com o grupo de analitos que se deseja analisar e ao comprimento de onda do laser utilizado.⁴

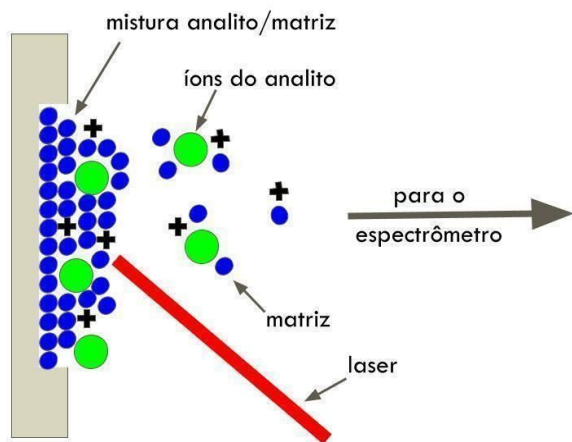


Figura 2. Esquema simplificado do MALDI. Baseada na referência 5.

Resultados e discussões

Inicialmente diferentes cepas de *S. aureus* foram cultivadas em meio BHI (Brain Heart Infusion) a 30°C por 4 dias. Em seguida, em um tubo eppendorf de 2 mL, foi adicionado 1 mL de metanol e uma porção da colônia da bactéria sem o meio, com o auxílio de uma alça de plástico para microbiologia. Levou-se o tubo ao Vórtex por 2 min, seguido por centrifugação por 30 min a 14000 rpm. Então, o sobrenadante foi concentrado com fluxo de N₂. O mesmo procedimento foi feito com todas as cepas. Com essas amostras selecionou-se a matriz mais adequada para MALDI-MSI. Através da sobreposição dos espectros de massas obtidos com as matrizes ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), concluiu-se que o DHB é uma matriz mais adequada para ionização dos analitos devido a maior quantidade e intensidade de sinais (Figura 3). Também foram obtidos os espectros das matrizes DHB e CHCA, que foram considerados o branco do método (Figuras 4 e 5).

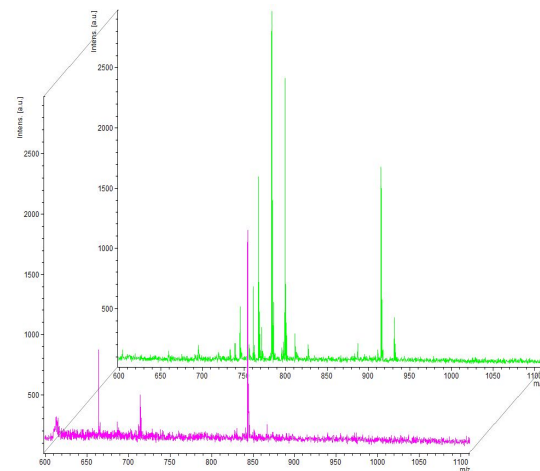


Figura 3. Espectros de massas sobrepostos da amostra de *S. aureus* selvagem em meio BHI com a matriz CHCA (rosa) e DHB (verde) obtidos por MALDI-ToF.

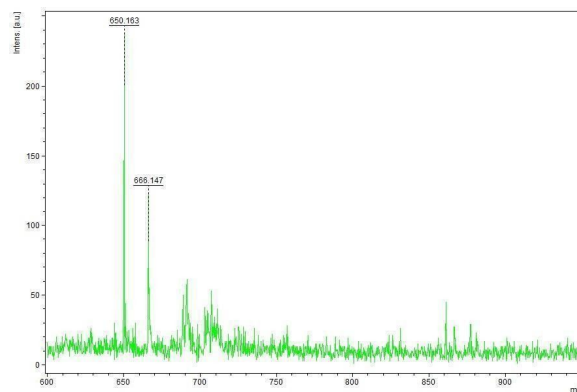


Figura 4. Espectro de massas da matriz CHCA, obtido por MALDI-ToF.

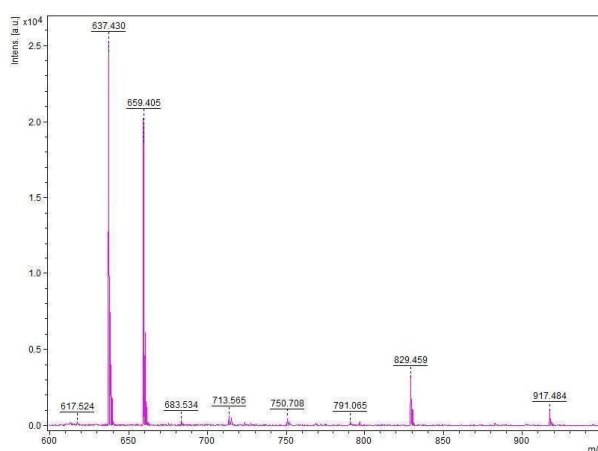


Figura 5. Espectro de massas da matriz DHB obtido por MALDI-ToF.

Futuramente serão obtidas imagens das bactérias na presença de antibiótico, a fim de mimetizar as condições de tratamento de pacientes infectados com *S. aureus*. Sendo assim será preciso determinar a concentração inibitória mínima (MIC) do antibiótico para as cepas. Para tal é preciso construir a curva de crescimento das cepas.

Curvas de crescimento das cepas por diluição seriada foram feitas para determinar o tempo de crescimento das colônias para atingir 10^7 unidades formadoras de colônia/unidade de volume (UFC/mL). A diluição seriada foi feita de meia em meia hora até 5 h de crescimento da cepa. A Figura 6 mostra as colônias obtidas por diluição seriada para 4 h e 4 h 30 min de crescimento. Assim, observou-se que a cepa resistente e a selvagem atingem 10^7 UFC/mL em, respectivamente, 1 h e 30 min.

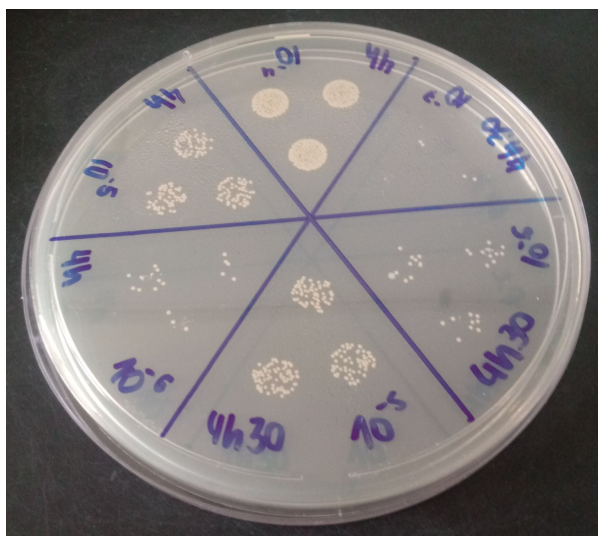


Figura 6. Placa de petri com o cultivo da cepa resistente obtido por crescimento com diluição seriada de 4 h e 4 h 30 min.

Conclusões

O Imageamento por Espectrometria de Massas é uma potente ferramenta para o estudo das propriedades de resistências de bactérias patogênicas, pois alia a detecção de metabólitos à informação da localização espacial desses na amostra.

Foram feitas diversas etapas da otimização dos parâmetros críticos para a realização do experimento de MALDI-MSI. Futuramente, serão feitas imagem das cepas com e sem antibiótico na MIC.

Agradecimentos



Referências

- 1) Santos, N. D. Q. (2004). A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto & Contexto-Enfermagem*, 13(SPE), 64-70.
- 2) Rathahao-Paris, E., Alves, S., Junot, C., & Tabet, J. C. (2016). High resolution mass spectrometry for structural identification of metabolites in metabolomics. *Metabolomics*, 12(1), 10.
- 3) Watrous, J. D., & Dorrestein, P. C. (2011). Imaging mass spectrometry in microbiology. *Nature Reviews Microbiology*, 9(9), 683–694.
- 4) Awad, H., Khamis, M. M., & El-Aneed, A. (2015). Mass spectrometry, review of the basics: ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(2), 158-175.
- 5) Imagem baseada em <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/maldi-ionisation.xhtml> (acessado em 09/10/2020)