



APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MODERNAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS NÃO FERMENTADORAS EM FIBROSE CÍSTICA E INFECÇÃO HOSPITALAR-RESULTADOS PRELIMINARES



ESTEVES CZ¹, LEVY CE², CATHARINO RC².

1cibele_bi@hotmail.com, 2celevy@fcm.unicamp.br, rrc@fcm.unicamp.br

Espectrometria de Massas, Bactérias Não Fermentadoras, Fibrose Cística, Infecção Hospitalar

¹Fac Farmácia FCM UNICAMP, ²Depto Patologia Clínica FCM UNICAMP, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Bactérias Gram negativas não fermentadoras são potenciais patógenos envolvidos em infecções hospitalares e em infecções crônicas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística. Sua identificação é um grande desafio para os Laboratórios de Microbiologia pela diversidade de agentes, dificuldade de caracterização, falta de experiência dos microbiologistas com microrganismos menos frequentes, limitação dos recursos manuais e automatizados para a caracterização e carência de dados na literatura. A taxonomia deste grupo de bactérias encontra-se em constante evolução e para muitos gêneros e espécies os dados disponíveis são muito limitados, envolvendo poucas cepas para caracterizá-los. Por outro lado, tanto a identificação por automação como por testes bioquímicos é presuntiva.

A Biologia Molecular é, na atualidade, uma ferramenta muito utilizada para caracterizar em nível de Gênero e Espécie estas bactérias não fermentadoras. A técnica mais empregada é a Reação em Cadeia da Polimerase ou PCR (Polimerase Chain Reaction). Mas esta técnica é ainda cara, demorada e apresenta limitações quanto à reprodutibilidade e por isso ainda não foi incorporada à rotina dos Laboratórios de Microbiologia. Desta forma, permanece a busca por métodos diagnósticos que sejam mais rápidos, reprodutíveis, confiáveis.

A Espectrometria de Massas constitui uma interessante técnica, embora ainda experimental, com diversos campos de aplicação, como química, biologia, ciências médicas e tecnológicas e vem se consolidando como uma ferramenta extremamente versátil e essencial na ciência. A partir da Espectrometria de Massas podemos determinar padrões dos lipídeos de membrana (Fingerprints) característicos de cada espécie bacteriana e a partir destes dados determinar sua taxonomia de modo rápido e eficiente comparando com suas respectivas Cepas Padrão LMG[®] e ATCC[®]. Recentes trabalhos demonstraram a aplicabilidade da técnica que ora pretendemos padronizar em nosso meio com a finalidade de superar as dificuldades ora encontradas para caracterização bioquímica e molecular destes microrganismos

OBJETIVO

Verificar a utilidade da análise por Espectrometria de Massas dos lipídeos da parede bacteriana para identificação de bactérias não fermentadoras comparando com a técnica de PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas Padrão: Coleção de Cepas Padrão BCC LMG[®].

LMG1225 *P. pseudoalcaligenes*, LMG1224 *P. alcaligenes*, LMG1222 *B. cepacia*, LMG18822 *B. multivorans*, LMG13010 *B. multivorans*, LMG19230 *B. cenocepacia*, LMG18829 *B. cenocepacia*, LMG21462 *B. cenocepacia*, LMG14294 *B. stabilis*, LMG14291 *B. stabilis*, LMG10929 *B. vietnamiensis*, LMG18836 *B. vietnamiensis*, LMG18943 *B. dolosa*, LMG19182 *B. ambifaria*, LMG16670 *B. anthina*, LMG14191 *B. pyrrocinia*, LMG2216 *B. gladioli*, LMG1873 *A. piechaudi*, LMG1231 *A. denitrificans*, LMG1229 *A. faecalis subsp. faecalis*, LMG1863 *A. xylosoxidans*, LMG20952 *I. limosus*, LMG1232 *B. bronchiseptica*, LMG16407 *P. apista*, LMG18379 *P. norimbergensis*, LMG18087 *P. pnompenusa*, LMG18106 *P. pulmonicola*, LMG18819 *P. sputorum*, LMG3244 *C. pauculus*, LMG6866 *R. mannitolilytica*, LMG21421 *R. insidiosa*, LMG21510 *C. respiraculi*, LMG5886 *C. gillardi*, LMG1195 *C. metalidurans*, LMG5942 *R. pickettii*, LMG958 *S. maltophilia*, LMG12279 *E. meningoseptica*, LMG1041 *A. baumannii*, LMG8337 *C. indologenes*, LMG1131 *A. odorans*, LMG22680 *A. faecalis subsp. parafaecalis*.

• **Cepas teste:** 27 cepas de *S. maltophilia*, 19 de *A. xylosoxidans*, 3 de *A. denitrificans*, 1 de *R. pickettii* e 2 de *R. mannitolilytica* isolados de pacientes diferentes de Fibrose Cística e Infecção Hospitalar identificados na rotina do Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP por provas bioquímicas.

• **Extração de DNA:** Tris, SDS, Proteinase K, Fenol Saturado, Solução 24:1 de Clorofórmio:Álcool Isoamílico, Etanol, Álcool 70%. Utilizados para extrair DNA de Cepas Padrão (controles positivos e negativos da reação de PCR) e Cepas Teste.

• **Reação de PCR para cada gênero de microrganismo:** primers para PCR 16S rRNA para cada Gênero, Taq Polimerase, Nucleotídeos, Tampão, Cloreto de magnésio. APCR foi padronizada para cada gênero de microrganismo, ajustando-se as concentrações de reagente e a temperatura de anelamento dos primers.

Extração de Lipídeos: solução salina 0,45%, clorofórmio, metanol, água. A extração de lipídeos foi realizada com todas as Cepas Padrão e Teste em duplicata pelo Método de Bligh-Dyer modificado.

RESULTADOS

Extração de DNA: todas as cepas tiveram seu DNA extraído com sucesso exceto as Cepa Padrão LMG 21421 e uma Cepa Teste de *S. maltophilia*, que não tiveram quantidade suficiente de DNA extraído para sua identificação molecular.

Identificação Molecular (PCR): a PCR foi padronizada para os três Gêneros de microrganismos. Para *Achromobacter* tiveram que ser alterados parâmetros como número de ciclos de reação, concentração de reagentes e temperatura de anelamento dos primers utilizados. Já para os Gêneros *Ralstonia* e *Stenotrophomonas* foram alterados apenas o número de ciclos de reação. Todas as cepas teste tiveram sua confirmação identificada.

Extração de Lipídeos: todas as Cepas Padrão e Teste tiveram seus lipídeos extraídos.

Identificação por Espectrometria de Massas: fase ainda em conclusão.

Figura 1: PCR Final após Padronização do Protocolo Para o Gênero *Achromobacter*. As três primeiras bandas são correspondentes aos controles positivos da reação. A quarta banda corresponde ao controle negativo e a quinta ao branco. As demais bandas correspondem a cepas teste de *A. xylosoxidans* com exceção das três últimas que correspondem a cepas a *A. denitrificans*.

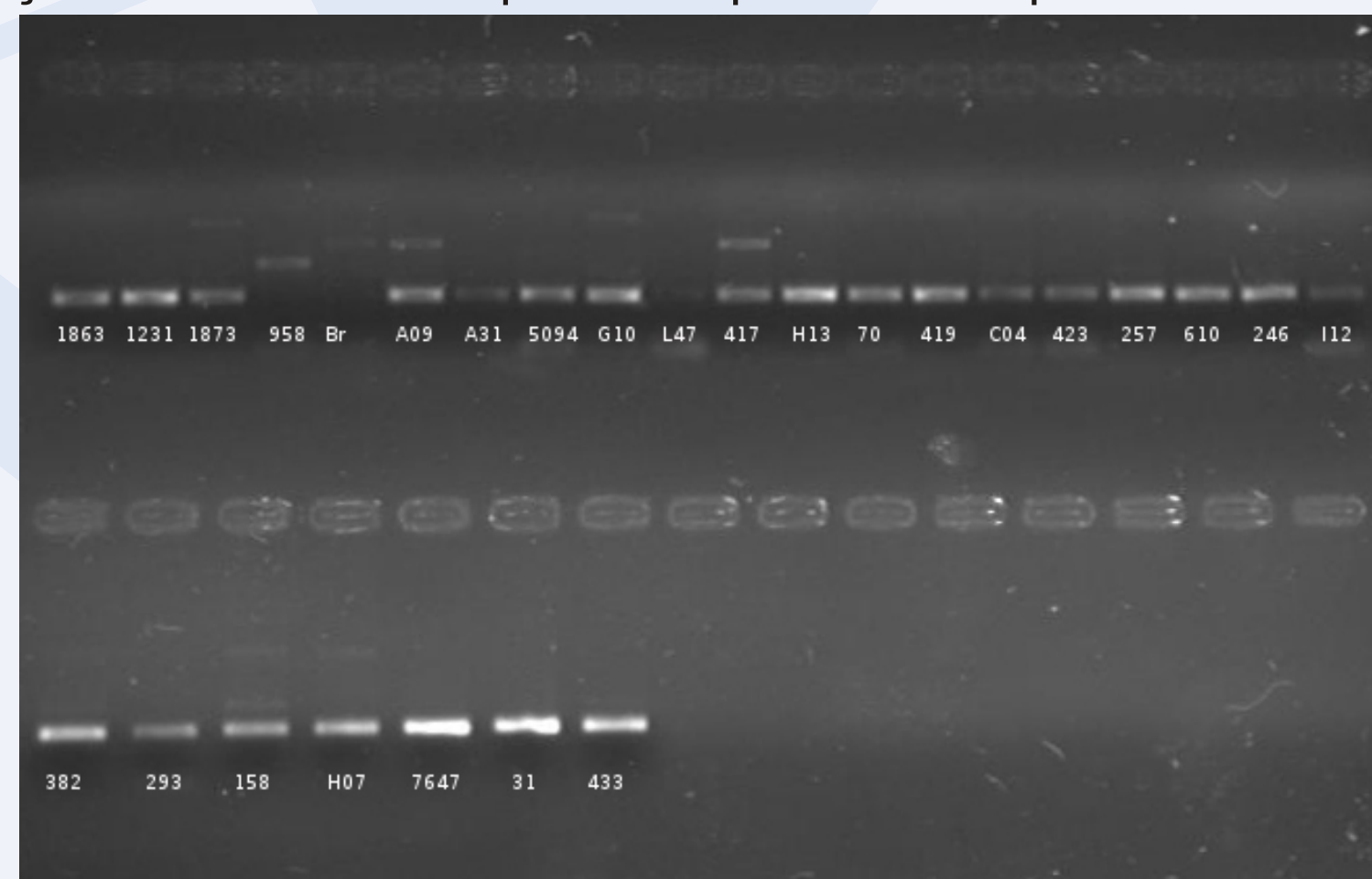


Tabela 1: Condições de reação e quantidades de reagentes antes e depois da padronização da PCR para o gênero *Achromobacter*. Em negrito pode-se observar as mudanças feitas no protocolo após a padronização: número de ciclos, temperatura de anelamento dos primers e quantidade de MgCl₂.

Primeira PCR – Primers URPL – UFPL			
Protocolo proposto pelo Artigo		Protocolo adotado após padronização	
Reagentes	Condições	Reagentes	Condições
DNA= 2 µL		DNA= 2 µL	
Taq= 0,2 µL		Taq= 0,2 µL	
Dntp= 5 µL		Dntp= 5 µL	
Tampão= 2,5 µL	T_{anel}= 56°C	Tampão= 2,5 µL	T_{anel}= 53,1°C
MgCl ₂ = 1,5 µL	30 ciclos	MgCl ₂ = 0,3 µL	30 ciclos
Primers= 2,5 µL		Primers= 2,5 µL	
Água= 8,8 µL		Água= 10µL	

Segunda PCR – Primers AXB1 – AxF1			
Protocolo proposto pelo Artigo		Protocolo adotado após padronização	
Reagentes	Condições	Reagentes	Condições
DNA= 2 µL		DNA= 2 µL	
Taq= 0,2 µL		Taq= 0,2 µL	
Dntp= 5 µL		Dntp= 5 µL	
Tampão= 2,5 µL	T_{anel}= 56°C	Tampão= 2,5 µL	T_{anel}= 53°C
MgCl ₂ = 1,5 µL	35 ciclos	MgCl ₂ = 1,6 µL	35 ciclos
Primers= 2,5 µL		Primers= 2,5 µL	
Água= 8,8 µL		Água= 9µL	

Figura 2: PCR Final após verificação de viabilidade do protocolo. A primeira banda corresponde ao controle positivo, a segunda banda ao controle negativo e a terceira banda ao branco. As demais bandas correspondem às cepas teste.

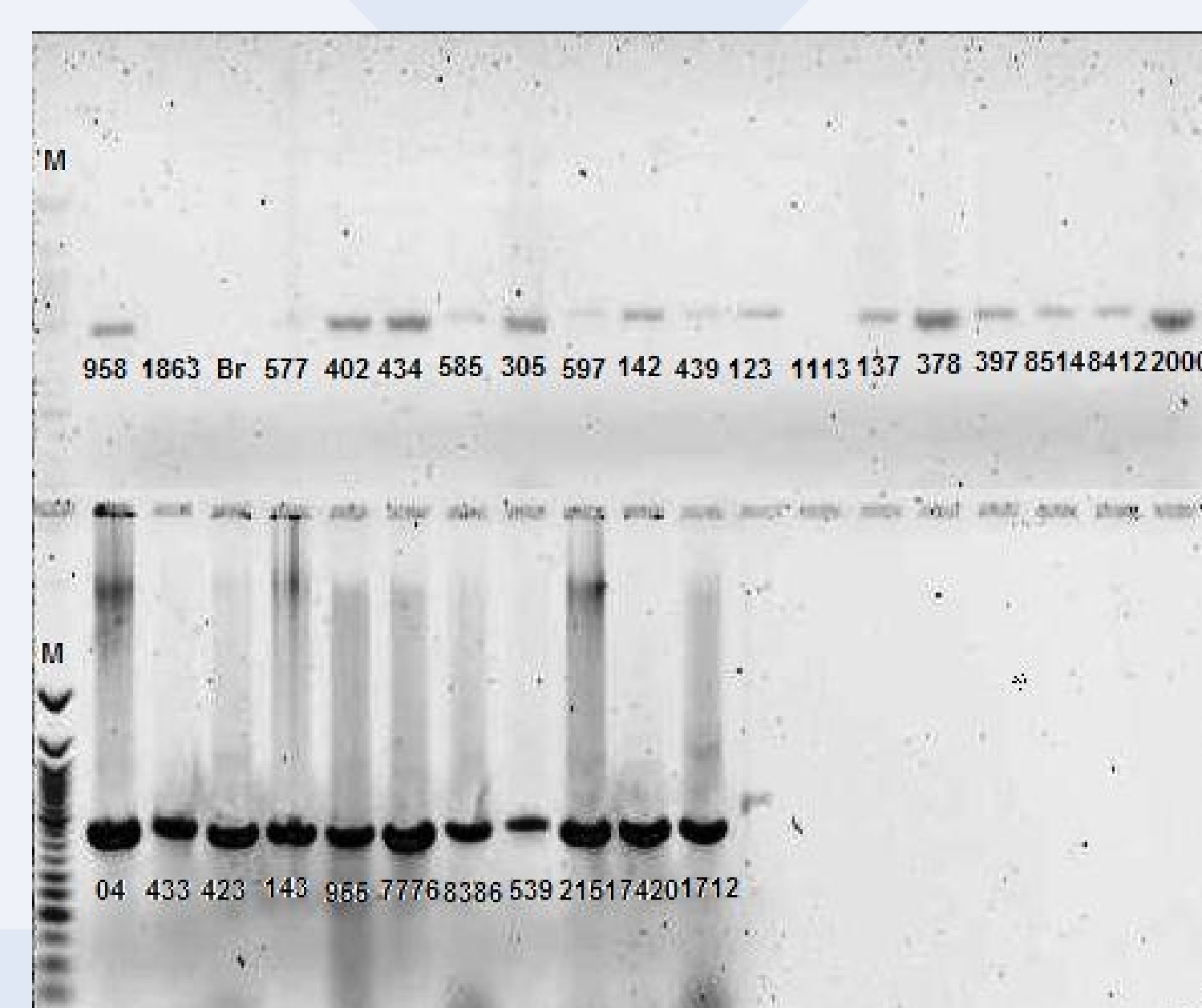


Tabela 2: Condições de reação e quantidades de reagentes antes e depois da padronização da PCR para *S. maltophilia*. Em negrito pode-se observar que a única mudança realizada foi o número de ciclos de reação

Primers SM1-SM4			
Protocolo proposto pelo Artigo		Protocolo adotado após padronização	
Reagentes	Condições	Reagentes	Condições
DNA= 1 µL		DNA= 1 µL	
Taq= 0,25 µL		Taq= 0,25 µL	
Dntp= 8 µL		Dntp= 8 µL	
Tampão= 5 µL	T_{anel}= 58°C	Tampão= 5 µL	T_{anel}= 58°C
MgCl ₂ = 6 µL	30 ciclos	MgCl ₂ = 6 µL	35 ciclos
Primers= 5 µL		Primers= 5 µL	
Água= 19,75 µL		Água= 19,5µL	

Figura 3: PCR Padronizada para Gênero *Ralstonia*. As três primeiras bandas correspondem aos controles positivos, a terceira ao controle negativo e a quarta ao branco. As demais correspondem a cepas teste.

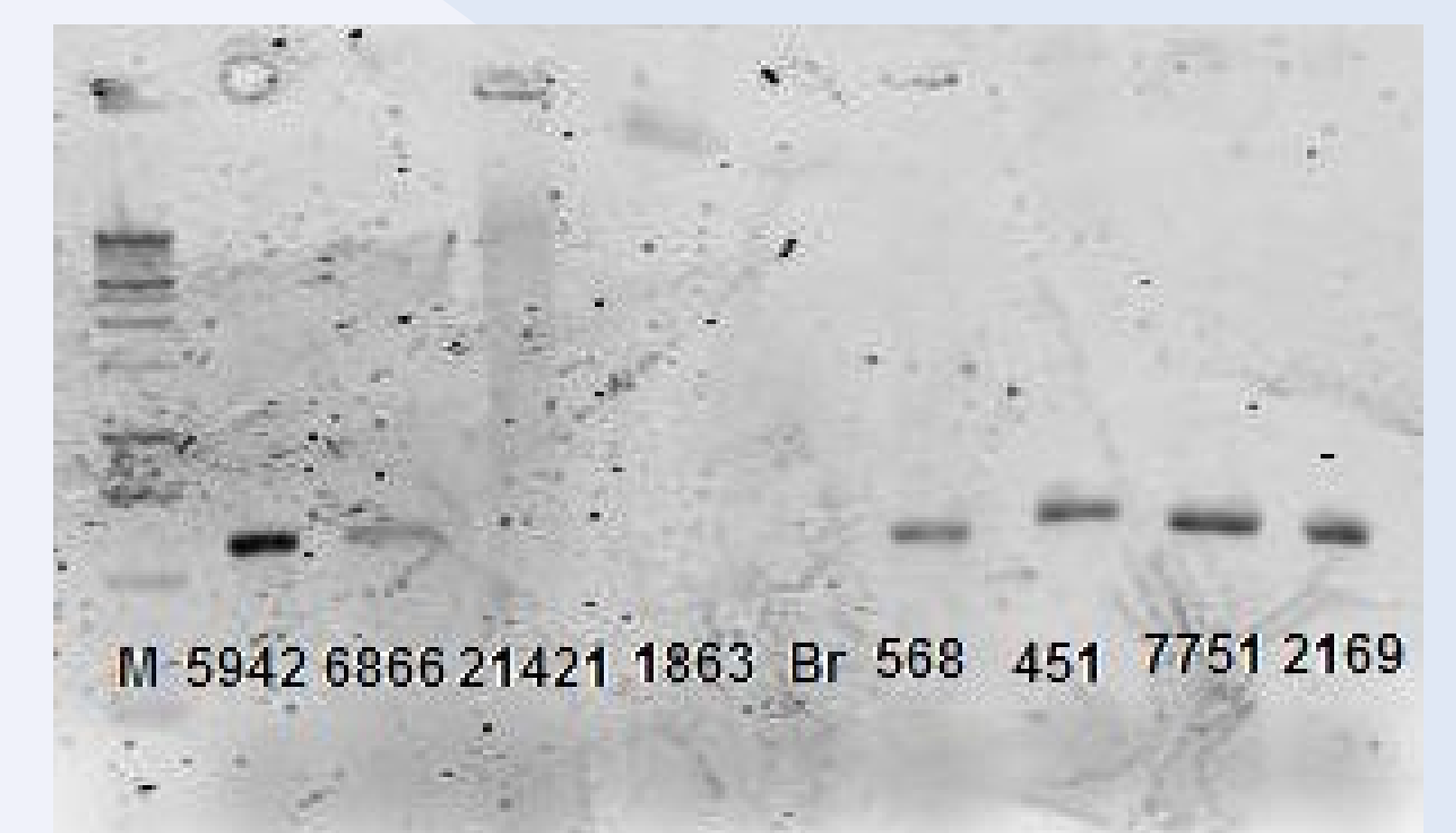


Tabela 3: Condições de reação e quantidades de reagentes antes e depois da padronização da PCR para *S. maltophilia*. Em negrito pode-se observar que a única mudança realizada foi o número de ciclos de reação

Primers RaiGS F - RaiGS R			
Protocolo proposto pelo Artigo		Protocolo adotado após padronização	
Reagentes	Condições	Reagentes	Condições
DNA= 2 µL		DNA= 2 µL	
Taq= 0,2 µL		Taq= 0,2 µL	
Dntp= 5 µL		Dntp= 5 µL	
Tampão= 2,5 µL	T_{anel}= 58°C	Tampão= 2,5 µL	T_{anel}= 58°C
MgCl ₂ = 2 µL	30 ciclos	MgCl ₂ = 2 µL	35 ciclos
Primers= 1 µL		Primers= 1 µL	
Água= 13,7 µL		Água= 13,7µL	

CONCLUSÕES

A partir da padronização das PCRs para os Gêneros *Achromobacter* e *Ralstonia* e para *S. maltophilia* as técnicas de Biologia Molecular poderão auxiliar na identificação de microrganismos isolados de amostras de pacientes com Fibrose Cística e Infecção Hospitalar pelo Laboratório de Microbiologia do HC da Unicamp.

As técnicas de Biologia Molecular são, em geral, demoradas porque dependem do crescimento bacteriano para que a extração de DNA seja eficiente e com isso sua identificação por PCR seja realizada. Estas técnicas também são relativamente caras, pois necessitam de reagentes de custo alto, como Proteinase K e Taq Polimerase ou kits de extração. Outros reagentes podem oferecer riscos à saúde do pesquisador, como Fenol e Brometo de Etídio, que devem ser manipulados em capela e ter descarte específico, dificultando a realização do procedimento em qualquer local.

Já a Espectrometria de Massas vem se destacando como uma técnica versátil e vem sendo pesquisada no mundo todo como uma ferramenta de diagnóstico de microrganismos. É uma técnica extremamente rápida. A extração de lipídeos das bactérias pelo método de Bligh-Dyer é simples e utiliza solventes comuns como Clorofórmio e Metanol. Dependendo do método de injeção da amostra no Espectrômetro esta etapa não é necessária e pode-se aplicar diretamente uma suspensão bacteriana no equipamento. E após a criação de um banco de dados, consegue-se identificar microrganismo em menos de um minuto. A principal desvantagem é que um Espectrômetro de Massas tem um custo muito elevado, dificultando sua inserção na rotina de um Laboratório de Microbiologia.