

IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN

Moreira LM; Santos FV; Lyon, JP; Santos VJSV; Silveira Jr, L., Villaverde AB; Pacheco MTT

¹Universidade do Vale do Paraíba; Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, julianalyon@univap.br

¹Universidade do Vale do Paraíba; Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, leonardomarmo@univap.br

Resumo- A espectroscopia Raman é uma ferramenta poderosa para a análise de materiais biológicos. A partir da obtenção de um espectro Raman é possível determinar a composição de uma amostra como função de seus modos vibracionais. Esta técnica permite resultados precisos com baixo custo, sem que seja necessária a extração de tecido, uso de corantes ou marcadores e outros agentes de contraste. Várias técnicas espectroscópicas têm sido aplicadas para a identificação microbiana. Neste contexto, métodos baseados em espectroscopia Raman têm sido considerados adequados para aplicação de rotina em laboratórios. O presente trabalho realiza uma revisão sobre a aplicação da espectroscopia Raman na identificação microbiana

Palavras-chave: Espectroscopia Raman; Raman microfocal, microrganismos, fungos

Área do Conhecimento: Saúde

Introdução

A espectroscopia Raman consiste em um processo inelástico que ocorre quando uma amostra é iluminada por uma fonte de luz monocromática, como um feixe de laser. Nesse processo, a energia dos fótons incidentes é transferida para as moléculas da amostra, excitando-as a modos vibracionais elevados. Fótons espalhados possuem uma frequência mais baixa do que os fótons incidentes devido à energia de transferência (GUIMARÃES et al., 2006). Assim, os fótons incidentes em uma amostra transferem energia de ou para um modo vibracional molecular. Nesse processo, a absorção simultânea de um fóton incidente é acompanhada pela emissão do fóton Raman com um desvio no comprimento de onda correspondente a diferença no nível de energia vibracional presente na molécula (YU et al., 2006).

A espectroscopia Raman é uma ferramenta poderosa para a análise de materiais biológicos. O espectro Raman pode determinar a composição de uma amostra como função de seus modos vibracionais (GUIMARÃES et al., 2006). A idéia de que a espectroscopia vibracional poderia ter um papel clínico ou diagnóstico surgiu através de estudos pioneiros que demonstraram que mesmo biomoléculas complexas como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos possuem assinaturas vibracionais distintas que refletem diferenças na estrutura e conformação teciduais.

A principal vantagem do emprego da espectroscopia Raman é o fato desta técnica permitir que o procedimento de análise seja realizado em tempo real, proporcionando

resultados mais precisos com baixo custo, sem que seja necessária a extração de tecido, uso de corantes ou marcadores e outros agentes de contraste (SHEN et al., 2007).

Desta forma, a versatilidade da espectroscopia Raman aplicada a análises bioquímicas e ao diagnóstico é evidente e as perspectivas de futuros avanços são promissoras. A identificação rápida de microrganismos patogênicos representa um assunto de grande interesse para microbiologistas e médicos, pois corresponde a um ponto crítico para o tratamento de infecções. A maioria dos sistemas disponíveis para a identificação microbiana baseia-se em provas bioquímicas, morfológicas e fisiológicas. Tais procedimentos são demorados, muitas vezes levando de um a cinco dias entre a recepção da amostra do paciente e a resposta do laboratório para o clínico (MAQUELIN et al., 2003).

Recentemente, métodos baseados em técnicas de biologia molecular, tais como amplificação de uma seqüência gênica específica por PCR, têm sido desenvolvidos e amplamente empregados. Apesar do fato de abordagens genotípicas serem mais rápidas e mais precisas do que a tradicional identificação através do perfil bioquímico, a técnica ainda requer a extração do DNA, muitas vezes de culturas puras, e envolvem o consumo de reagentes caros. Devido ao longo período necessário para a correta identificação microbiana, os clínicos normalmente começam uma terapia empírica enquanto aguardam o resultado do laboratório (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). De acordo com Kolef et al. (2000), dez a 30 % dos pacientes com septicemia não recebem a terapia antimicrobiana correta e a taxa

de mortalidade entre estes pacientes é 30 a 60% maior do que entre os pacientes que receberam o tratamento correto desde o início.

Assim, é possível perceber que o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e eficazes de identificação de microrganismos são de grande relevância.

Metodologia

Foi realizada uma revisão da literatura baseada em artigos internacionais de alta qualidade focando o uso da microscopia Raman na identificação de microrganismos. Os bancos de dados utilizados para a seleção dos artigos foram Pubmed e o Web of science

Resultados e Discussão

Várias técnicas espectroscópicas têm sido aplicadas recentemente para a identificação microbiana, tais como a espectroscopia de fluorescência (GIANA et al., 2003). Neste contexto, métodos baseados em espectroscopia Raman e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) têm sido consideradas como procedimentos de análise adequados para aplicação de rotina em laboratórios (CHOO-SMITH et al., 2001; MAQUELIN et al., 2003; RÖSCH et al., 2005; HARZ et al., 2005). As vantagens de tais técnicas são inúmeras. Técnicas de espectroscopia vibracional requerem uma manipulação mínima da amostra, não envolvem consumo de reagentes e são adequadas a automação, pois podem ser utilizadas por pessoas não especializadas. Além disso, um inóculo muito pequeno é suficiente e o tempo gasto na identificação pode ser significativamente reduzido em comparação com as metodologias convencionais. Dentro de seis a oito horas após a inoculação em meio sólido, a maioria dos patógenos forma micro-colônias que podem ser identificadas por espectroscopia Raman (MAQUELIN et al., 2002a; MAQUELIN et al., 2003).

Vários trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar patógenos bacterianos utilizando espectroscopia Raman. Maquelin e colaboradores (2003) demonstraram uma identificação precisa de patógenos recuperados de amostras de sangue utilizando técnicas vibracionais. Rösch et al. (2005) descreveram a identificação de uma única célula bacteriana através de análise por micro-Raman. De fato, vários grupos relataram a identificação bacteriana por meio de espectroscopia Raman confocal (CHOO-SMITH et al., 2000; MAQUELIN et al., 2000; KIRSCHNER et al., 2001; BERGER et al., 2001; HARZ et al., 2005). Além disso, outras metodologias derivadas da espectroscopia

Raman, tais como a espectroscopia Raman de Ressonância Ultravioleta (LOPEZ-DIÉZ E GOODACRE, 2004; JARVIS E GOODACRE, 2004) e Espetroscopia Raman de Superfície Ampliada (GOELLER E RILEY, 2007; LIU et al., 2007) também têm sido aplicadas na identificação bacteriana.

A identificação fúngica pode ser ainda mais complicada do que a identificação de patógenos bacterianos. Frequentemente, características morfológicas, como esporos e conídios são características determinantes de uma espécie e os laboratórios possivelmente necessitarão de um micologista treinado para a identificação de espécimes clínicos. A espectroscopia Raman surgiu como uma ferramenta promissora para este procedimento. De Gussen et al., (2007) demonstraram a aplicação de tal tecnologia para a identificação de espécies de fungos filamentosos. De acordo com estes autores, a espectroscopia Raman representa uma ferramenta acessível para micologistas e não especialistas, apesar de não substituir as provas clássicas de identificação. Além disso, a identificação de leveduras também tem sido realizada empregando técnicas de espectroscopia vibracional. Maquelin e colaboradores (2002b) desenvolveram um método para a identificação de espécies de *Candida* por micro-espectroscopia Raman Confocal. De forma semelhante, Ibell et al. (2005) empregou a micro-espectroscopia Raman para identificar *Candida* spp. em pacientes com peritonite e Rösch e colaboradores (2005 b; 2006) estudaram a variação intracelular e a identificação de uma única célula de levedura utilizando esta tecnologia.

Conclusão

A partir do presente trabalho é possível concluir que a espectroscopia Raman tem sido utilizada com sucesso para a identificação de microrganismos e que abordagens promissoras têm sido desenvolvidas.

Referências

1. A.E GUIMARÃES, M.T.T. PACHECO, L. SILVEIRA JR, D. BASOTTINI, J. DUARTE, A.B. VILLAVARDE AND R.A. ZÂNGARO, Near Infrared Raman Spectroscopy (NIRS): A technique for doping control, Spectroscopy 20 (2006), 185-194.
2. C. YU, E. GESTL, K. ECKERT, D. ALLARA AND J. IRUDAYARAJ Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy Cancer Detection and Prevention 30 (2006), 515-522.

3. A. SHEN, Z.L.H. WANG, I. GOAN, Y. WY, X. WANG, Z. YU AND J. HU, Study on the *in vitro* and *in vivo* activation of rat hepatic stellate cells by Raman spectroscopy, *Journal of Biomedical Optics* 12 (2007), 034003.
4. K. MAQUELIN, C. KIRCHNER, L.P. CHOO-SMITH, N.A. NGO-THI, T. VAN VREEWIJK, M. STAMMLER, H.P. ENDTZ, H.A. BRUINING, D. NAUMANN AND G.J. PUPPELS, Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures, *Journal of Clinical Microbiology* 41 (2003), 324-329.
5. J.L. RODRIGUEZ-TUDELA, T.M. DIAZ-GUERRA, E. MELLADO, V. CANO, C. TAPIA, A. PERKINS, A. GOMEZ-LOPEZ, L. RODERO, M. CUENCA-ESTRELA, Susceptibility patterns and Molecular Identification of *Trichosporon* species, *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49 (2005), 4026-4034.
6. M.H. KOLLEF, Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients, *Clinical Infectious Diseases* 31 (2000), 131-138.
7. H.E. GIANA, L. SILVEIRA JR., R.A. ZÂNGARO AND M.T.T. PACHECO, Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and classification through principal components analysis, *Journal of Fluorescence* 13 (2003), 489-493.
8. L.P. CHOO-SMITH, T. VAN VREEWIJK, H.A. BRUINING, G.J. PUPPELS, N.A. NGO-THI, C. KIRCHNER, D. NAUMANN, D. AMI, A.M. VILLA, F. ORSINI, S.M. DOGLIA, H. LAMFARRAJ, G.D. SOCKALINGUM, M. MANFAIT, P. ALLOUCH AND H.P. ENDTZ HP, Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopies, *Applied Environmental Microbiology* 67 (2001), 1461-1469.
9. P. RÖSCH, M. HARZ, M. SCHMITT, K.D. PESCHKE, O. RONNENBERG, H. BURKHARDT, H.W. MOTZKUS, M. LANKERS, S. HOFER, H. THIELE AND J. POPP, Chemotaxonomic identification of single bacteria by Micro-Raman spectroscopy: Application to clean-room-relevant biological contamination. *Applied Environmental Microbiology* 71 (2005), 1626-1637.
10. M.S. IBELINGS, K. MAQUELIN, H.P. ENDTZ, H.A. BRUINING AND G.J. PUPPELS, Rapid Identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy. *Clinical Microbiology and Infection* 11 (2005), 353-358.
11. M. HARZ, P. RÖSCH, K.D. PESCHKE, O. RONNEBERGER, H. BURKHARDT AND J. POPP J, Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions, *Analytist* 130 (2005), 1543- 1550.
12. K. MAQUELIN, C. KIRSCHNER, L.P. CHOO-SMITH, N. VAN DEN BRAAK, H.P. ENDTZ, D. NAUNMANN AND G.J. PUPPELS, Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy, *Journal of Microbiological Methods* 51 (2002a), 255-271.
13. K. MAQUELIN, L.P. CHOO-SMITH, T. VAN VREESWIJK, H.P. ENDTZ, B. SMITH, R. BENNETT, H.A. BRUINING AND G.J. PUPPELS, Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium, *Analytical Chemistry* 72 (2000), 12-19.
14. C. KIRSCHNER, K. MAQUELIN, P. PINA, N.A. NGO THI, L.P. CHOO-SMITH, G.D. SOCKALINGUM, C. SANDT, D. AMI, F. ORSINI, S.M. DOGLIA, P. ALLOUCH, M. MAINFAIT, G.J. PUPPELS AND D. NAUMANN, Classification and Identification of Enterococci: A comparative Phenotypic, Genotypic and Vibrational Spectroscopic Study, *Journal of Clinical Microbiology* 39 (2001), 1763-1770.
15. A.J. BERGER AND Q. ZHU, Identification of oral bacteria by Raman microspectroscopy, *Journal of Modern Optics* 50 (2001), 2375-2380.
16. E.C. LÓPEZ-DÍEZ AND R. GOODACRE, Characterization of microorganisms using UV resonance Raman spectroscopy and chemometrics, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 585-591
17. R.M. JARVIS AND R. GOODACRE, Ultra-violet resonance Raman spectroscopy for the rapid discrimination of urinary tract infection bacteria. *FEMS Microbiological Letters* 19 (2004), 127-132.
18. L.J. GOELLER AND M.R. RILEY, Discrimination of bacteria and bacteriophages by Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy, *Applied Spectroscopy* 61 (2007), 679-685.
19. Y. LIU, Y.R. CHEN, X. NOU AND K. CHAO, Potential of surface-enhanced Raman spectroscopy for the rapid identification of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* cultures on silver

- colloidal nanoparticles, Applied Spectroscopy 61 (2007) 824-831.
20. K. DE GUSSEM, P. VANDENABEELE, A. VERBEKEN AND L. MOENS, Chemotaxonomical identification of spores of macrofungi: possibilities of Raman spectroscopy, Analytical and Bioanalytical Chemistry 387 (2007), 2823-2832.
 21. K. MAQUELIN, L.P. CHOO-SMITH, H.P. ENDTZ, H.A. BRUINING AND G.J. PUPPLES, Rapid identification of *Candida* species by Confocal Raman microspectroscopy, Journal of Clinical Microbiology 40 (2002b), 594- 600.
 22. P. ROSCH, M. HARZ, M. SCHMITT AND J. POPP, Raman spectroscopic identification of single yeast cells, Journal of Raman Spectroscopy 36 (2005b), 377-379.
 23. P. RÖSCH, M. HARZ, K.D. PESCHKE, O. RONNEBERGER, H. BURKHARDT AND J. POPP, Identification of single eukaryotic cells with micro-Raman spectroscopy. Biopolymers 82 (2006) 312-316.