

Metodologia de Identificação de Cepas Bacterianas por Espectroscopia de Fluorescência

Patrícia Marcondes dos Santos¹, **Mestre Héctor Enrique Giana**², **Dr. Landulfo Silveira Júnior**³, **Dr. Renato Amaro Zângaro**⁴, **Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco**⁵.

¹ Aluna da Engenharia Elétrica e Eletrônica da Faculdade de Engenharia, Arquitetura e Urbanismo e Aluna do Mestrado em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), ambos da Universidade do Vale do Paraíba – Univap. Avenida Shishima Hifume, 2911, Urbanova, 12.244-000, São José dos Campos – S.P., e-mail: patricia.marcondes@terra.com.br

² Colaborador do Projeto, Laboratório de Análises Clínicas Oswaldo Cruz, Rua Santa Clara, 393, Vila Adyanna, 12.243-630 - São José dos Campos - SP, - e-mail1: laboratorio@oswaldocruz.com

³ Professor Orientador e Coordenador da Engenharia da Faculdade de Engenharia, Arquitetura e Urbanismo da Universidade do Vale do Paraíba – Univap. Avenida Shishima Hifume, 2911, Urbanova, 12.244-000, São José dos Campos – S.P., e-mail: landulfo@univap.br

⁴ Coordenador do Curso de Mestrado em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba – Univap. Avenida Shishima Hifume, 2911, Urbanova, 12.244-000, São José dos Campos – S.P., e-mail: zangaro@univap.br

⁵ Diretor do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba – Univap. Avenida Shishima Hifume, 2911, Urbanova, 12.244-000, São José dos Campos – S.P., e-mail: mtadeu@univap.br

Resumo – Após a verificação da importância do conhecimento e identificação de bactéria patogênica, foram criados diversos métodos de análises clínicas, dentre esses temos os métodos químicos, manuais e automatizados. Os métodos manuais são amplamente utilizados pelo seu baixo custo comparados com os automatizados que utilizam reagentes 500% mais caro, porém essa vantagem desaparece quando se compara o range de gêneros bacterianos, pois nos métodos manuais são de aproximadamente 20 grupos, não identificando subgrupos e nos métodos automatizados em torno de 20.000 espécies (inclusive subgrupos). O desenvolvimento de uma metodologia baseada em óptica, espectroscopia de fluorescência, sem a utilização de reagentes ou necessidade de tempo de reação, que provocam atrasos nas análises nos métodos já citados, poderá acelerar os diagnósticos e melhorar os custos da mesma. A demonstração de diferenças no espectro de autofluorescência em três cepas bacterianas e sua posterior separação poderá permitir o desenvolvimento de uma rotina que, pelo padrão de fluorescência obtido, identifique automaticamente o gênero e a espécie bacteriana em tempo não superior a 1 h, fornecendo melhores subsídios para o diagnóstico clínico, com desempenho similar a um custo bem inferior ao do método automatizado.

Palavra-chave: método identificação bactérias, espectroscopia de fluorescência, autofluorescência.

Área de conhecimento: III Engenharias (Elétrica e Biomédica)

Introdução:

Biológica: Louis Pasteur (1822-1895) e Robert Koch (1843-1910) deram início aos trabalhos bacteriológico e das infecções humanas. Com o tempo foram surgindo diversos métodos de análises e identificação de gêneros de bactérias

causadora de doenças humanas, podem ser citados:

Método manual: Os métodos manuais somente conseguem identificar menos de 20 (vinte) espécies de bactérias, sendo que, em muitos casos, possibilitam a

identificação do gênero, mas não a subespécie;

Método automatização: A automação laboratorial em bacteriologia resolve em grande medida este problema, detectando em torno de 20.000 (vinte mil) cepas diferentes, identificando gênero e espécie, porém com um custo de reagentes superior a 500% (quinhentos por cento) em relação ao método anterior.

O método citado anteriormente também tem em comum o tempo gasto para identificação bacteriana, desde a inoculação do material biológico em meio de cultura (18 a 24 horas podendo chegar até 72 horas), o isolamento e inoculação em meios específicos para identificação, meios bioquímicos ou galerias de provas bioquímicas para automação (mais 18 a 24 horas), essa demora traz como agravantes: o diagnóstico tardio e somente depois o tratamento (seja por antibióticos ou quimioterapia), piora no quadro clínico do paciente e o aparecimento de cepas resistentes aos medicamentos empregados devido à pré-medicação recomendada pelo médico até a obtenção dos resultados laboratoriais ou até mesmo a auto-medicação.

Estudo da Luz: A Luz é um fenômeno que intriga cientistas há muito tempo. Os próprios gregos já haviam indagado a respeito de sua natureza, chegando a duas conclusões, por vezes conflitantes, desde então houve uma seqüência de pesquisas e descoberta por parte de vários cientistas, até que Albert Einstein (1879-1955) em 1905 propôs que “a teoria ondulatória (a luz é onda) era incompleta, e que a luz poderia ter característica também de partícula. Matematicamente, demonstrou que um elétron liberado podia absorver uma partícula radiante, e ela então daria energia a ele, chamando essa energia de fóton ou quantum de energia. Então, quanto menor o comprimento de onda, mais energia ela poderia liberar. A luz, portanto é ondulatória e corpuscular, predominando por vezes uma, por vezes outra, mas sua constituição é de ambas as características”, sendo essa teoria aceita e utilizada até os dias de hoje.

Física Básica Fluorescência: A luz é uma fonte de radiante do espectro eletromagnético, constituída de fótons, providos de movimentos vibratórios ou ondulatórios.

A freqüência da radiação (ν) representa o número de ondas que passam

por um ponto fixo, no eixo x, por segundo (equação 1).

A relação entre o período(T) da onda e a sua freqüência (ν) é dado (equação2):

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (1) \qquad \nu = \frac{1}{T} \quad (2)$$

$$E = h \times \nu \quad (3) \qquad E = \frac{h \times c}{\lambda} \quad (4)$$

A emissão da radiação se processa de maneira descontínua, com cada fóton sendo um quantum de energia (E) proporcional à freqüência da radiação e a uma constante de proporcionalidade (h), a constante de Planck, cujo valor é $6,62 \times 10^{-27}$ erg.s (equação 3).

Verifica-se, então, que a energia do fóton é maior quanto menor é o seu comprimento de onda (equação 4), conforme Einstein havia dito.

As moléculas em geral absorvem energia luminosa e o fazem diferentemente umas das outras, conforme sua estrutura. Tal absorção seletiva de energia de diferentes comprimentos de onda se traduz nas cores dos objetos. A energia absorvida pode ser liberada na forma de energia mecânica, térmica, mas quando o material tem propriedade de liberar a energia na forma luminosa, num período de tempo muito curto, na ordem de milissegundos, esse é o fenômeno da fluorescência.

A transição eletrônica no interior das moléculas pode envolver um, dois ou mais elétrons e ocorrer simultaneamente com uma multidão de moléculas, e assim, a emissão fluorescente se faz através de uma gama contínua de radiação que contém todos os comprimentos de onda de uma dada faixa do espectro visível (400 a 700 nm). A intensidade da radiação emitida é proporcional à intensidade da energia excitadora absorvida: $nF = q \times nA$, sendo nF o número de fótons de fluorescência emitido, nA o número de fótons absorvidos e q uma constante característica da substância fluorescente (chamada de rendimento ou eficiência quântica ou de fluorescência). Assim, quanto maior for a absorção da radiação excitadora maior a intensidade da fluorescência.

Imunofluorescência: A imunofluorescência é uma técnica de

diagnóstico que abriu amplos horizontes para a imunologia, e conseqüentemente, para a Patologia, a Medicina e a Biologia, até o momento somente dispunha de técnicas utilizando métodos indiretos, através de fenômenos secundários como precipitação, aglutinação, fixação do complemento, etc... decorrente de formação de imunocomplexos resultantes da união entre o antígeno e o anticorpo. Albert H. Coons, 1941, na Universidade de Harvard, deu início ao estudo da imunofluorescência, quando utilizou radicais fluorescentes para corar moléculas protéicas, após o insucesso da utilização de corantes comuns. Contudo diversos cientistas começaram a desbravar essa nova brecha no campo da ciência.

Objetivo

Pretende-se fazer à identificação das Cepas Bacterianas, em meio salino (branco), por Espectroscopia de Fluorescência, sendo a emissão fluorescente na região entre 400 e 700 nm. Os espectros serão utilizados para verificar diferenças espectrais passíveis de separação entre os tipos de bactérias. A técnica de identificação proposta, que se baseia na obtenção de espectros de autofluorescência de bactérias, representa uma nova ferramenta para os laboratórios de análises clínicas, principalmente na triagem do material a ser analisado, uma vez que o tempo de obtenção da identificação está limitado apenas pelo tempo de coleta e processamento do espectro.

Materiais e Métodos:

Foram escolhidas três cepas bacterianas dentre as de mais freqüente contaminação (maior incidência) e virulência (gravidade) em Laboratório de Análises Clínicas, conforme relação expedida pelo Laboratório Oswaldo Cruz, *Escherichia coli* (E.coli), *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (SA).

No Laboratório Oswaldo Cruz: será coletado o material do paciente para análise (sendo descartada qualquer informação sobre o paciente), o material coletado será armazenado na estufa bacteriológica (37°C), marca Fanem em placas bacteriológicas com meios de cultura CPS-ID2, Agar Sangue e Agar

McConkey, marca Biolab Mériex até a sua utilização. Antes da preparação da amostra, será feita a identificação das bactérias desejada pelo sistema Mini-Api marca BioMériex, posteriormente as bactérias já identificadas serão diluídas em solução salina, NaCl de 0,85%, com concentração conforme a tabela de Mc Farent, verificada através do Repipetador automático da marca Densimat, e finalizando com a preparação para transporte.

Materiais diversos: vidraria; Galerias com meios de cultura apropriados para identificação dos tipos bacterianos (ID 32 E, ID 32 STAPH e Rapid 32 STRP), marca Biolab Mériex; Autoclave marca Fanem; Câmara de fluxo laminar unidirecional FVL-II-A, marca TROX Technic; Bico de Bunsen; alça de inoculação de níquel-cromo; luvas, óculos e máscaras de procedimentos.

Espectroscopia de Fluorescência: Será utilizado o Espectrofluorímetro FluoroMax-2, marca SPEX com comprimento de onda de excitação programada de 390 nm, 410 nm e 430nm, e a coleta dos espectros de emissão iniciando-se a 20nm acima do comprimento de excitação, ao passo de 2 nm até 700 nm (conforme tabela 1). Será feita a análise utilizando uma cubeta de quartz, marca Hellma, de 10 mm de caminho óptico e 2cm³ de volume, de 06 amostras de pacientes diferentes da mesma cepa objetivando obter subgrupos diferentes, porém perfis semelhantes de análise;

Tabela 1: Comprimento de onda de excitação e análise

Comprimento de onda de excitação		
390 nm	410 nm	430 nm
Comprimento de onda de analisada		
410 nm a	430 nm a	450 nm a
700nm	700nm	700nm
(passo de	(passo de	(passo de
2nm)	2nm)	2nm)

Nota: Esses comprimentos de onda de excitação pré-determinados foram adotados devido a estudos que comprovam melhores respostas de análise na fluorescência de bactérias patogênicas.

Resultados e Discussões:

Foram realizados ensaios com 6 (seis) amostras de cada gênero de bactérias, sendo cada uma delas submetida aos 3 (três) comprimentos de onda de excitação, conforme tabela2.

Tabela 2: Informações sobre os dados coletados de autofluorescência dos três grupos analisados.

Total Amostra		Comprimento de Onda (λ)
3(grupos) 6(amostras) =18	x	3 (390, 410 e 430 nm)

Nº. pontos analisados (410 à 700nm)	Total de Pontos
145	18 (amostras) x 3 (λ) x 145(pontos) = 7.830

Obs.: Não foi considerado no calculo a amostra da substância branca (NaCl).

Para visualização dos espectros de autofluorescência de cada gênero bactericida no seu comprimento de onda de excitação, foi feita a média entre os valores (equação 5):

$$\frac{\sum(\text{valor.da.intensidade.no.ponto})}{6(\text{número.de.amostra.no.ponto})} \quad (5)$$

Gráfico 1: Média dos Espectros em cada ponto e em cada comprimento de onda de excitação da bactéria Escherichia coli.

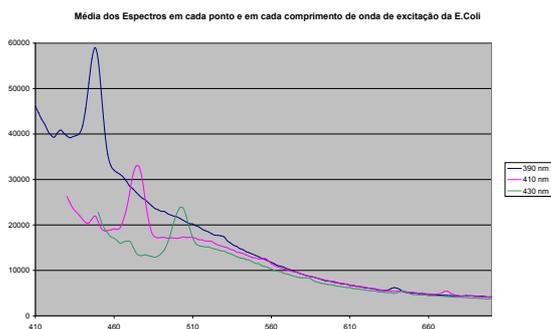


Gráfico 2: Média dos Espectros em cada ponto e em cada comprimento de onda de excitação da bactéria Enterococcus Faecalis

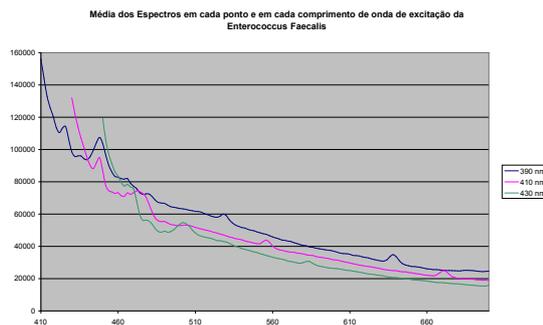
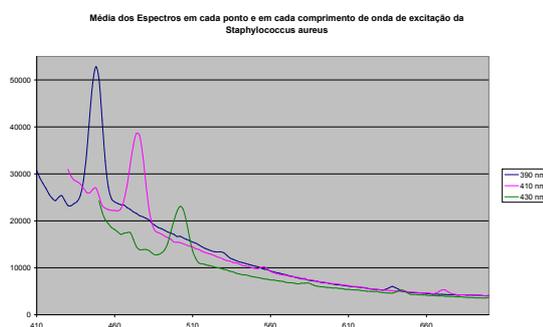


Gráfico 3: Média dos Espectros em cada ponto e em cada comprimento de onda de excitação da bactéria Staphylococcus aureus.

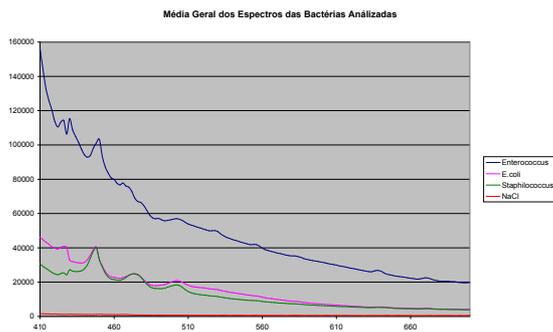


Visando comparar os espectros de cada bactéria entre si e a amostra branca (NaCl, que teve os valores de espectros, ruído, também coletados para cada comprimento de onda de excitação), foi aplicada uma outra média aos gráficos demonstrados acima e aos valores do NaCl, colocando-os em uma só planilha, observando-se os seguintes detalhes: para as intensidades compreendidas entre os comprimentos de onda de 410 nm a 428nm, utilizou-se o seu único valor, para as intensidades compreendidas entre os comprimentos de onda de 430 nm a 448nm, e 450 nm a 700 nm foram feitas à média conforme equações 6 e 7 respectivamente.

$$\frac{\sum(\text{valor.da.intensidade.no.ponto})}{2(\text{número.de.amostra.no.ponto})} \quad (6)$$

$$\frac{\sum(\text{valor.da.intensidade.no.ponto})}{3(\text{número.de.amostra.no.ponto})} \quad (7)$$

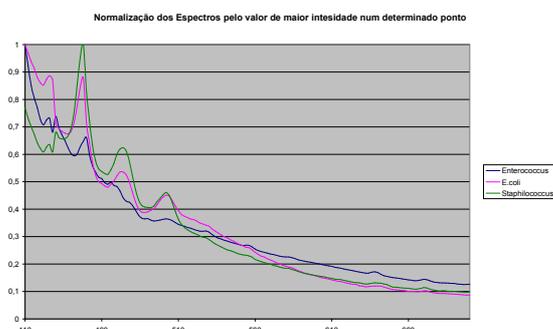
Gráfico 4: Gráfico geral dos espectros para demonstração das diferenças entre os Gêneros bactericidas analisados e NaCl



Utilizando-se de mais um artifício matemático objetivando melhor visualização as diferenças entre os espectros de autofluorescência das amostras estudadas, foi feita a normalização dos valores do gráfico 4, dividindo de todo o espectro pelo pico de maior intensidade (equação 7). E.coli pico em 410 nm com valor de intensidade de 46.105, Enterococcus pico em 410 nm com valor de intensidade de 156.237,8 e Staphilococcus pico em 448 nm com valor de intensidade de 39.910,58.

$$\frac{\text{valor da intensidade no ponto}}{\text{valor pico correspondente a bactéria}} \quad (7)$$

Gráfico 5: Gráfico Normalizado dos espectros para demonstração das diferenças entre os Gêneros bactericidas analisados



Conclusão:

Este trabalho é o início de uma grande pesquisa no campo da análise laboratorial através de Espectroscopia de Fluorescência, pois os resultados obtidos demonstraram “visualmente” que existe diferença entre os espectros de autofluorescência das bactérias analisadas. Porém para uma análise ser confiável o resultado não deve somente se basear na opinião visual do observado por isso, será

feito um tratamento dos resultados obtidos com o método estatístico PCA (Análise das Componentes Principais), utilizando o software Matlab para traçar parâmetros estatísticos de diferenciação das Cepas Bacteriana.

O método proposto significa um grande avanço na identificação bacteriana, com rapidez e alta sensibilidade. Testes com um número maior e novos tipos de bactérias são necessários para aprofundar o estudo, tentando minimizar os casos falso-positivos, assim como também um software automático para a identificação proposta.

Referencias Bibliográficas:

[1] Zângaro, R. A., Silveira Jr., L., Chavantes, M. C., Pasqualucci, C. A. G., Pacheco, M. T. T. (1998). "A Spectrofluorimeter for Diagnosis of Colon Dysplasia", RBE – Caderno de Engenharia Biomédica, v. 14, n. 2, p. 49-59;

[2] Bier, O. (1976), Bacteriologia e Imunologia, São Paulo: Melhoramentos;

[3] Daguet, G. L. (1977), Técnicas en Bacteriologia, 3 vol., Barcelona: JIMS;

[4] Giana, Héctor Enrique (2001), Identificação de Gêneros Bacterianos por espectroscopia de Fluorescência de Multi-Excitação, São José dos Campos: IP&D.