

Identificação rápida de bactérias por MALDI-QTOF/MS utilizando Análise de Componentes Principais

Carla Porto^{1,2*} (PG), Eduardo J. Pilau (PG)¹, Juliano S. Ribeiro (PQ)³, Fábio C. Gozzo¹

¹ Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, CEP 13084-971, Campinas, SP, Brasil

² Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda., Rod. Anhanguera, Km30.5, 07750-000, Cajamar, SP, Brasil.

³ Instituto Federal de Educação do Espírito Santo, Av. Vitória, 1729, 29040-780, Vitória, ES, Brasil.

* e-mail: carlaporto@natura.net

Palavras Chave: bactérias, MALDI-QTOF, quimiometria, PCA.

Introdução

MALDI-TOF/MS (Ionização/Dessorção auxiliada por matriz) *fingerprinting* é um método moderno e rápido de caracterização de micro-organismos¹. É baseado no espectro de massas específico de cada espécie, contendo predominantemente sinais de proteínas abundantes e altamente conservadas². A aplicação dessa técnica para a classificação e identificação de micro-organismos, especialmente bactérias, é descrita como uma ferramenta eficiente de triagem rápida, sensível e de fácil execução.

Entretanto, micro-organismos não podem ser diferenciados por apenas um sinal, mas sim, por um padrão complexo de sinais, sendo necessária uma abordagem multivariada. Um método bem estabelecido estatisticamente para diferenciar grupos com base em várias características é a Análise de Componentes Principais (PCA).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um banco de dados para caracterização de bactérias (células intactas) utilizando MALDI-QTOF e quimiometria, visando a classificação e identificação de diversas espécies bacterianas isoladas e em misturas, com base nos espectros obtidos.

Resultados e Discussão

Para o estudo proposto e desenvolvimento do banco de dados, foram selecionadas 52 linhagens de bactérias, que foram cultivadas em ágar nutriente por 24 h a 30°C. A massa celular (10mg) foi coletada diretamente da placa de cultivo para a realização das análises, sendo submetida a sucessivas lavagens com uma solução de água/TFA. A suspensão celular resultante foi solubilizada em solução de matriz para ionização (ácido sinapínico), os espectros foram adquiridos no equipamento Waters SYNAPT HDMS (QTOF), na faixa de m/z 2.000-20.000, todos em sextuplicata.

A construção do banco de dados foi direcionada de modo a reunir um número considerável de linhagens de interesse médico e ambiental, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Tabela 1. Gêneros de bactérias do banco de dados.

Gênero	nº sp	Gênero	nº sp
<i>Acinetobacter</i>	1	<i>Klebsiella</i>	1
<i>Achromobacter</i>	2	<i>Kocuria</i>	1
<i>Agrobacterium</i>	1	<i>Microbacterium</i>	1
<i>Arthrobacter</i>	2	<i>Micrococcus</i>	3
<i>Bacillus</i>	8	<i>Proteus</i>	1
<i>Brevibacillus</i>	1	<i>Pseudomonas</i>	2
<i>Burkholderia</i>	2	<i>Salmonella</i>	1
<i>Corynebacterium</i>	5	<i>Serratia</i>	3
<i>Enterobacter</i>	1	<i>Staphylococcus</i>	8
<i>Escherichia</i>	3	<i>Xanthomonas</i>	1
<i>Kingella</i>	2	<i>Yersinia</i>	2

*Espécies de bactérias oriundas da FAT e da CCT/CPQBA.

Uma vez obtidos os espectros de razão m/z de cada espécie, os mesmos foram organizados em forma de matriz $X(I \times J)$, onde I são as amostras e J as variáveis. O pré-tratamento dos dados iniciais foi realizado da seguinte forma: primeiramente, o número de variáveis foi diminuído em 100 vezes, (10.000.000 para 10.000), posteriormente, os dados foram normalizados (norma euclidiana), seguidos de um alisamento para diminuição de ruídos³. A análise de componentes principais foi utilizada como método exploratório⁴.

Seguindo a PCA foi possível observar os grupos distintos das replicatas das linhagens, além de agrupamentos naturais entre as bactérias com características ou espécies semelhantes. Uma análise de correlação, apresentada na forma de um correlograma, possibilitou ainda determinar bactérias presentes em misturas pré-estabelecidas.

Conclusões

A identificação de bactérias por MALDI-QTOF apresentou grandes vantagens, tais como a menor quantidade de material biológico, pouco preparo de amostra, alta precisão e reprodutibilidade. Quando aliada a ferramentas quimiométricas permitiu a construção de um banco de dados customizado capaz de identificar bactérias isoladas e em misturas, de forma rápida e precisa.

Agradecimentos

Prof^a. Anita Marsaioli pela disponibilização de cepas microbianas e estrutura laboratorial para este trabalho.

Natura, CNPQ, FAPESP, IQ-Unicamp.

¹Demirev, P. A.; Fenselau, C. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 71.

²Russell, S. C.O. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 376.

³Savitzky, A.; Golay, M. J. E. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627-1679.

⁴Ferreira, M. M. C.; et al. *Quim. Nova*, **1999**, *22*, 724-731.