

Inovação Diagnóstica em Infecções Crônicas: Detecção Nanométrica de Variantes de Pequenas Colônias (SCVs) em Biofilmes Polimicrobianos via Espectroscopia de Infravermelho com Luz Síncrotron

Ohanna Maria Menezes Madeiro da Costa – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

Introdução

A resistência antimicrobiana (AMR) representa uma crise de saúde pública global, com projeções indicando até 10 milhões de mortes anuais até 2050 [1]. Em infecções crônicas severas, como feridas diabéticas e fibrose cística, a coinfeção por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resulta em falhas terapêuticas frequentes. O desafio clínico central é que sob estresse competitivo, o *S. aureus* adota um fenótipo de sobrevivência chamado Variantes de Pequenas Colônias (SCVs), caracterizado por metabolismo reduzido e crescimento extremamente lento [2]. As SCVs são rotineiramente não detectadas (falsos-negativos) em métodos de cultura padrão de 24 horas, mascarando a verdadeira etiologia da infecção e induzindo prescrições antibióticas ineficazes [3].

Para superar esta barreira diagnóstica, a espectroscopia de infravermelho de campo próximo com radiação síncrotron (SINS) surge como uma tecnologia disruptiva. O SINS combina a resolução topográfica da Microscopia de Força Atômica (AFM) com a sensibilidade química do nano-FTIR, permitindo a identificação molecular de células bacterianas individuais com resolução espacial de 25 nm [4]. A aplicação desta tecnologia na linha IMBUA do Sirius tem potencial de revolucionar a detecção de SCVs, estabelecendo novas bases para diagnóstico rápido e preciso de infecções crônicas.

Estado da arte

O diagnóstico clínico atual de infecções associadas a biofilmes depende de métodos dependentes de cultura que falham sistematicamente na detecção de SCVs. Embora sequenciamento 16S rRNA ofereça precisão na identificação de espécies, não fornece informações sobre o estado fenotípico ou metabólico das bactérias [5]. A microscopia confocal permite visualização da arquitetura do biofilme, mas exige fluoróforos que alteram a fisiologia celular [6].

A espectroscopia microFTIR é uma ferramenta *label-free* promissora, capaz de diferenciar espécies bacterianas através de assinaturas vibracionais de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos [7]. Contudo, a identificação de SCVs individuais em matriz polimicrobiana densa requer resolução nanométrica.

O SINS integra um AFM operando em modo espalhamento (s-SNOM) com radiação infravermelha síncrotron de banda larga. A ponteira do AFM concentra o campo elétrico em seu ápice, superando o limite de difração [8]. Estudos recentes demonstraram que nano-FTIR identifica bactérias em nível de célula única com 100% de precisão, baseando-se em vibrações moleculares da parede celular e citosol [9]. A aplicação do SINS para detecção direta de SCVs em biofilmes mistos representa uma fronteira inexplorada com imenso potencial para tradução clínica.

Objetivos

Objetivo Geral: Desenvolver uma abordagem analítica inovadora para detecção e caracterização em nanoescala de Variantes de Pequenas Colônias (SCVs) de *S. aureus* em biofilmes polimicrobianos com *P. aeruginosa*, utilizando SINS (AFM + nano-FTIR) e microFTIR, visando aprimorar o diagnóstico de infecções crônicas.

Objetivos Específicos:

(1) Estabelecer protocolos otimizados para cultivo de biofilmes sobre substratos de ouro, garantindo compatibilidade e amplificação de sinal para análises de infravermelho;

(2) Mapear heterogeneidade química em escala micrométrica utilizando microFTIR;

(3) Empregar SINS para adquirir simultaneamente topografia (AFM) e assinatura química (nano-FTIR) de células individuais com resolução de 25 nm, estabelecendo marcadores espectrais para diferenciação entre fenótipo selvagem e SCVs;

(4) Correlacionar assinaturas nanoespectroscópicas com dados de viabilidade por Microscopia Confocal, validando SINS como ferramenta diagnóstica.

Metologia

Cultivo de Biofilmes: Cepas de *P. aeruginosa* (PA14) e *S. aureus* (Newman) serão cultivadas em meio TSB sobre substratos de silício revestidos com ouro. O ouro amplifica o sinal óptico de campo próximo em até 10 vezes, minimizando artefatos de substrato [9]. Biofilmes serão incubados a 37 °C para induzir formação de SCVs no cultivo.

MicroFTIR: Mapas hiperespectrais serão adquiridos na linha IMBUIA em modo reflexão (4000-800 cm^{-1}), permitindo avaliação global da composição da matriz extracelular e seleção de regiões para investigação nanométrica.

SINS (AFM + nano-FTIR): A ponteira do AFM fará varredura da superfície do biofilme, gerando imagens topográficas de alta resolução. Simultaneamente, radiação infravermelha síncrotron focada permitirá coleta de espectros nano-FTIR pontuais (resolução 25 nm) em células individuais, identificando alterações nas bandas de Amida I/II e marcadores de metabolismo energético característicos de SCVs.

Microscopia Confocal: Amostras cultivadas paralelamente serão analisadas com marcadores fluorescentes de viabilidade (LIVE/DEAD) e sondas específicas para diferenciar espécies, permitindo correlação com achados nanoespectroscópicos.

Análise Espectroscópica: Espectros de nano-FTIR e micro-FTIR serão submetidos a Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) para classificação de células e desenvolvimento de modelo preditivo para identificação automatizada de SCVs.

Cronograma de atividades

Mês	Atividades
01	Revisão bibliográfica aprofundada
02	Treinamento em biossegurança e cultivo
03	Cultivo de biofilmes monoespécies em substrato de ouro
04	Cultivo de biofilmes mistos
05	Caracterização por Microscopia Confocal

06	Validação e viabilidade e arquitetura dos biofilmes
07	Análise por microFTIR
08	Processamento espectral
09	Análises por SINS e processamento dos dados
10	Análises por SINS e processamento dos dados
11	Redação final e submissão
12	Redação final e submissão

Referências

- [1] Stratthdee, S. A., et al. (2020). Confronting antimicrobial resistance beyond the COVID-19 pandemic and the 2020 US election. *The Lancet*, 396(10257), 1050-1053.
- [2] Tuchscher, L., et al. (2020). Persistence of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(7), 151449.
- [3] Becker, K. (2023). Detection, Identification and Diagnostic Characterization of the Staphylococcal Small Colony-Variant (SCV) Phenotype. *Antibiotics*, 12(9), 1446.
- [4] Rodriguez, A., et al. (2025). Nano-Infrared Detection and Identification of Bacteria at the Single-Cell Level. *Analytical Chemistry*, 97(17), 9535-9539.
- [5] Vaudaux, P., et al. (2006). *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants: Difficult to Diagnose and Difficult to Treat. *Clinical Infectious Diseases*, 43(8), 968-973.
- [6] Reichhardt, C., & Parsek, M. R. (2019). Confocal Laser Scanning Microscopy for Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Architecture and Matrix Localization. *Frontiers in Microbiology*, 10, 677.
- [7] Kamnev, A. A., et al. (2023). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Biofilms. *Molecules*, 28(4), 1949.
- [8] Khatib, O., et al. (2018). Far Infrared Synchrotron Near-Field Nanoimaging and Nanospectroscopy. *ACS Photonics*, 5(7), 2773-2779.
- [9] Rodriguez, A., et al. (2025). Nano-Infrared Detection and Identification of Bacteria at the Single-Cell Level. *Analytical Chemistry*, 97(17), 9535-9539.