

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA
HABILITAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

MARCIO MARTINS CASAES FERREIRA

**ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF MS) APLICADA AO
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA:
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

NITERÓI, RJ

2019

MARCIO MARTINS CASAES FERREIRA

**ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF MS) APLICADA AO
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA:
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Biomedicina da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina com habilitação em Análises Clínicas.

Campo de confluência: Análises clínicas.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Claudia Rezende Vieira de Mendonça Souza

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Rachel Leite Ribeiro

Niterói, RJ
2019

MARCIO MARTINS CASAES FERREIRA

**ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF MS) APLICADA AO
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA:
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Biomedicina da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina com habilitação em Análises Clínicas.

Campo de confluência: Análises clínicas.

Aprovada em 11 de Julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Claudia Rezende Vieira de Mendonça Souza – UFF
Orientadora

Dr^a. Larissa Alvarenga Batista Botelho – UFRJ (titular)

Prof. Dr. Thiago Pavoni Gomes Chagas – UFF (titular)

Prof^a. Dr^a. Rosana Rocha Barros – UFF (suplente)

Dedicatória:

Dedico este trabalho aos meus pais Marcia e Joaquim, grandes incentivadores. Aos meus irmãos, que nunca negaram apoio. Aos amigos queridos, que foram compreensivos com os diversos momentos de ausência. Por fim, à minha orientadora Cláudia, que sempre teve muita paciência ao compartilhar a sua sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Fluminense que foi uma casa longe de casa, que me acolheu com todo o carinho e foi um lugar onde eu pude aprender muita coisa, e quando eu digo que aprendi muito, é porque o aprendizado foi além das disciplinas do curso. A UFF me ensinou a ser uma pessoa melhor.

À Professora Claudia Rezende Vieira De Mendonça Souza que acreditou em mim e me deu a oportunidade de realizar este trabalho de monografia, e finalmente fechar este ciclo como universitário. O apoio dela é o que fez este trabalho andar, e a forma gentil e carinhosa dela como orientadora contribuiu em grande parte para que eu não desistisse deste trabalho.

À Professora Rachel Leite Ribeiro que revisou este trabalho com muito carinho, tendo sanado diversas dúvidas e ajudado sempre que possível. Seu apoio e ajuda, foram essenciais na elaboração final desse trabalho.

À Todos os professores, pois a minha trajetória foi sempre guiada por eles. Os professores são a base de qualquer sociedade, são os mestres que ensinam todas as profissões, e numa época em que a educação é tão atacada e precarizada, eles merecem ser exaltados. Gostaria de agradecer especialmente à professora Luciana Malheiros, que me ajudou muito em toda a minha trajetória acadêmica e também à professora Rita Fucs pelos anos que me orientou na imunologia. Essa conquista não seria possível se não fosse pela paciência e dedicação de cada docente.

À minha família que sempre foi e sempre será o meu porto seguro. Durante a vida, nós passamos por diversas situações que nos deixam pra baixo, mas quando temos uma família acolhedora, que transforma nossa casa num verdadeiro lar, podemos superar qualquer situação.

Aos meus amigos, que são a família que eu escolhi pra mim. Não tenho como não agradecer a Daiana e o Gabriel, que desde 2006 fazem da minha vida mais alegre. À Rhayanna, que foi a melhor colega de turma de toda a Biomed. E à Joyle e Thaís, que foram as melhores companheiras de laboratório, e até hoje servem de padrão para amizades em ambientes de trabalho.

A todos os colegas da UFF que me abraçaram e compartilharam comigo esta jornada, aos colegas que me ensinaram a respeitar e conviver com as diferenças e aos colegas que dividiram seus conhecimentos comigo.

RESUMO

No Laboratório de Microbiologia Clínica, os métodos clássicos para identificação de microrganismos patogênicos isolados a partir de um espécime clínico em geral envolvem a coleta do material clínico, o isolamento do microrganismo a partir da semeadura primária do material clínico em um meio de cultura, e posteriormente ao crescimento de colônias, o exame de suas características morfológicas e fisiológicas. Geralmente, a identificação definitiva do microrganismo é realizada através de diferentes provas bioquímicas, que requerem um período de incubação, que pode ser de 24 a 48 horas. Além disso, nem todos os microrganismos podem ser prontamente identificados usando esses métodos e outros métodos de diagnóstico, como os métodos moleculares, podem ser necessários. Os métodos moleculares são rápidos e apresentam a vantagem de poderem ser utilizados na identificação de organismos incomuns ou fastidiosos. No entanto, o custo e as demandas técnicas associadas a esses métodos atualmente os tornam mais adequados ao ambiente de laboratórios de pesquisa do que ao uso para diagnóstico na rotina laboratorial. Recentemente, a Espectrometria de Massa por Ionização com Dessorção à Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF MS, do inglês “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry”), uma metodologia extremamente rápida e eficaz, vem sendo utilizada em laboratórios de microbiologia em todo o mundo, inclusive no Brasil, para identificação bacteriana, apresentando também outras aplicações, tais como verificação de alguns mecanismos de resistência e tipagem de amostras. O presente trabalho tem como objetivo geral elaborar uma revisão bibliográfica sobre a utilização da tecnologia MALDI-TOF MS no laboratório de Microbiologia Clínica a partir de um levantamento bibliográfico de publicações científicas no período de 2010 a 2019 relacionadas ao tema “Espectrometria de Massa por Ionização com Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Microbiologia Clínica”. Os trabalhos foram pesquisados na base de dados das bibliotecas eletrônicas Pubmed e Scielo, incluindo aqueles publicados nas línguas inglesa e portuguesa. Para tanto os seguintes descritores foram utilizados: MALDI-TOF, espectrometria de massa, identificação de microrganismos, microbiologia clínica. A tecnologia MALDI-TOF MS tem sido apontada como sendo revolucionária para a Microbiologia Clínica, particularmente na identificação de microrganismos, apresentando alta acurácia, rapidez, reprodutibilidade e facilidade técnica. Entretanto, esses sistemas ainda apresentam um alto custo inicial e sua acurácia é altamente dependente de atualizações e expansões constantes dos seus bancos de dados.

Palavras chave: MALDI-TOF MS, espectrometria de massa, identificação de microrganismos, microbiologia clínica.

ABSTRACT

In the Clinical Microbiology Laboratory, classical methods for identifying pathogenic microorganisms isolated from a clinical sample generally involve collecting the clinical material, isolating the microorganism from the primary sowing of the clinical material in a culture medium, and subsequently to the growth of colonies, the examination of their morphological and physiological characteristics. Generally, the definitive identification of the microorganism is carried out through different biochemical tests, which require an incubation period, which can be from 24 to 48 hours. In addition, not all microorganisms can be readily identified using these methods and other diagnostic methods, such as molecular methods, may be required. Molecular methods are rapid and have the advantage that they can be used to identify unusual or fastidious organisms. However, the cost and technical demands associated with these methods currently make them more suitable to the research laboratory environment than to the diagnostic use in the laboratory routine. Recently, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), an extremely fast method has been used in microbiology laboratories all over the world, including in Brazil, for bacterial identification, as well as other applications, such as verification of some resistance mechanisms and sample typing. The present work had as general objective to prepare a bibliographical review on the use of MALDI-TOF MS technology in the Clinical Microbiology laboratory based on a bibliographical survey of scientific publications from 2010 to 2019 related to the theme "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Clinical Microbiology. " The works were searched in the database of the electronic libraries Pubmed and Scielo, including those published in the English and Portuguese languages. For this purpose, the following descriptors were used: MALDI-TOF, mass spectrometry, identification of microorganisms, clinical microbiology. MALDI-TOF MS technology has been identified as being revolutionary for Clinical Microbiology, particularly in the identification of microorganisms, presenting high accuracy, rapidity, reproducibility and technical easiness. However, these systems still have a high initial cost and their accuracy depends on constant updates and expansions of their databases.

Key words: MALDI-TOF MS, mass spectrometry, identification of microorganisms, clinical microbiology.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACHC	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ECN	Estafilococos coagulase-negativa
ESI	Ionização por spray eletrostático, do inglês, “Electron Spray Ionization”
ICM	Método da célula intacta, do inglês “Intact Cell Method”
MALDI-IMS	Espectrometria de massa de imagem por Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz, do inglês, “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry”
MALDI-TOF MS	Espectrometria de Massa por Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo, do inglês, “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry”
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, do inglês “Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ”
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina, do inglês “Methicillin-Susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> ”
MS	Espectrometria de massa, do inglês, “Mass Spectrometry”
m/z	Relação Massa/Carga
PEM	Método de extração de proteínas, do inglês “Protein Extraction Method”
TFA	Ácido Trifluoroacético
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por Mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. METODOLOGIA.....	13
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
4.1. Histórico e Descrição da Técnica.....	14
4.2. Aplicações.....	20
4.2.1. Identificação Bacteriana.....	20
4.2.1.1. <i>Staphylococcus</i> spp.....	20
4.2.1.2. <i>Streptococcus</i> spp.....	22
4.2.1.3. Complexo <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
4.2.2. Identificação Direta.....	25
4.2.3. Detecção de Mecanismos de Resistência.....	28
4.2.4. Tipagem Microbiana.....	30
4.2.5. Outras Aplicações.....	31
4.2.6. Vantagens e Limitações.....	32
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

A Microbiologia Clínica tem um papel crucial no atendimento ao paciente, visando disponibilizar aos profissionais de saúde a identificação do agente causador da infecção bem como, o seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

A identificação de microrganismos patogênicos tem sido classicamente realizada através de métodos que envolvem cultura em diversos meios artificiais e, posteriormente, testes fenotípicos, que exploram as diferenças metabólicas entre as diversas espécies. A semeadura de materiais clínicos em meios de cultura para o isolamento de bactérias e fungos é um método sensível e eficaz para recuperação de patógenos. Em teoria, um único microrganismo vivo, em um meio apropriado, é capaz de se multiplicar em escala logarítmica, amplificando assim a quantidade de microrganismos, a partir de uma amostra com poucas células. Entretanto, as culturas podem levar muito tempo dependendo do patógeno. Uma cultura de microrganismos em laboratório pode ser positiva em até quatro a seis horas, ou, levar até algumas semanas para que o crescimento de colônias se torne visível. Além disso, a realização de testes fenotípicos geralmente requer um período de incubação de 24 a 48 horas (Beekmann e Diekema, 2003). Em algumas situações de infecções graves, como em casos de sepse, a identificação correta do patógeno e o tratamento apropriado e precoce são críticos, e estão interligados, já que o tratamento adequado é o resultado da identificação correta do agente causador, bem como da verificação do seu perfil de sensibilidade (Kumar et al, 2006).

Sendo assim, métodos de diagnósticos mais rápidos auxiliam na melhora do prognóstico dos pacientes, já que a identificação bacteriana é um passo crítico no manejo apropriado das infecções e o início tardio da administração eficaz de antibióticos em pacientes graves se correlaciona diretamente com o aumento das taxas de mortalidade (Dingle e Butler-Wu, 2013).

O uso da proteômica e sua aplicação no diagnóstico rápido da etiologia de infecções é

um grande avanço tecnológico, e é primariamente representado na utilização recente da metodologia de espectrometria de massa, MALDI-TOF MS (do inglês, “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry”) na identificação microbiológica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Realizar um levantamento bibliográfico a partir de artigos científicos nacionais e internacionais, resumos e anais de congresso e analisar a bibliografia no que se refere à utilização da metodologia de MALDI-TOF MS na identificação microbiológica;

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relatar as diferentes aplicações dessa metodologia na Microbiologia Clínica;
- Rever as vantagens e limitações da metodologia de MALDI-TOF MS em comparação a outros métodos utilizados na Microbiologia Clínica.

3. METODOLOGIA

A metodologia empregada neste estudo foi baseada em um levantamento bibliográfico abordando publicações científicas entre o ano de 2010 a 2019, relacionados ao tema “Espectrometria de Massa por Ionização com Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Microbiologia Clínica”. Os trabalhos foram pesquisados na base de dados das bibliotecas eletrônicas Pubmed e Scielo, publicados nas línguas inglesa e portuguesa. Para tanto se utilizou os seguintes descritores: MALDI-TOF, espectrometria de massa, identificação de microrganismos, microbiologia clínica (em português e inglês). E como critérios de exclusão utilizamos artigos que não estavam nos idiomas selecionados, artigos publicados anteriormente à 2010 (quando não foram utilizados na histórico da técnica) e artigos de acesso restrito. Resumos e anais de congressos científicos publicados no período de 2010 a 2019 também foram consultados e alguns artigos de importância histórica para o desenvolvimento dessa metodologia foram incluídos no estudo.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. HISTÓRICO E DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

A espectrometria de massa (MS, do inglês “Mass Spectrometry”) é uma técnica na qual os compostos químicos são ionizados a moléculas carregadas e a razão entre sua massa e carga (m/z) é medida. Embora a MS tenha sido descoberta no início de 1900, seu escopo inicialmente estava limitado à química.

Muito utilizada em análises químicas e na química clínica, o primeiro relato do uso de espectrometria de massa para caracterização de bactérias foi realizado em 1975, por Anhalt e Fenselau. Esses pesquisadores conseguiram, pela primeira vez, analisar pequenas moléculas derivadas de bactérias liofilizadas, diferenciando organismos taxonomicamente distintos, embora a metodologia utilizada não tenha sido capaz de discriminar entre organismos mais intimamente relacionados (por exemplo, espécies de *Escherichia* e de *Enterobacter* ainda não são identificadas por MALDI-TOF MS). Apenas a partir da década de 80, a tecnologia MALDI-TOF MS foi desenvolvida, e a partir daí, a caracterização de macromoléculas pela MS tornou-se possível (Hillenkamp e Karas, 1990).

O desenvolvimento da ionização por *spray* eletrostático (ESI, do inglês, “Electron Spray Ionization”) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês, “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization”) no final dos anos 80, aumentou bastante a aplicabilidade da espectrometria de massa a grandes moléculas biológicas como as proteínas. Tanto na ESI quanto na MALDI, os peptídeos são convertidos em íons por adição ou perda de um ou mais de um próton (Singhal et al, 2015). Ambos os métodos são baseados em métodos de “ionização suave” através de um laser, nos quais a formação de íons não leva a uma perda significativa da integridade da amostra (Ekström et al, 2000).

Entretanto, a metodologia MALDI-TOF MS tem certas vantagens sobre a técnica da ESI-MS, uma vez que a primeira ioniza as moléculas individualmente (não há um

agrupamento de moléculas), fazendo com que a interpretação dos dados seja mais fácil comparativamente com a ESI-MS. Para a análise por ESI-MS é necessária a separação prévia por cromatografia, algo que não é necessário na análise por MALDI-TOF MS. Consequentemente, o alto rendimento e a velocidade associados à automação completa fizeram da espectrometria de massa MALDI-TOF uma escolha melhor para o trabalho de proteômica em larga escala (Everley et al, 2008).

No final dos anos 90, descobriu-se que a aplicação do método às células bacterianas inteiras produzia espectros característicos e reprodutíveis, que poderiam ser usados para identificar bactérias aos níveis de gênero e espécie.

Koichi Tanaka, vencedor do Premio Nobel de química em 2002, juntamente com John B. Fenn, foram os responsáveis pelo desenvolvimento da metodologia de preparação de amostras e as tecnologias de ionização. Tanaka e Fenn foram premiados por terem contribuído para o desenvolvimento da tecnologia da espectrometria de massas. Fenn criou o método conhecido como ionização por *electrospray* (ESI-MS) e Tanaka, a metodologia da dessorção por laser suave (MALDI-TOF MS) (Tanaka, 2003).

Para realização da espectrometria de massa, é necessário o uso de uma metodologia para separação dos íons de acordo com sua massa, com a detecção dos íons, posteriormente. Um desses métodos é chamado de espectrometria de massa por tempo de voo, que envolve a separação iônica pela mensuração dos respectivos tempos de voo dos íons (Tanaka et al, 1987).

Uma das melhorias realizadas por Tanaka à espectrometria de massa por tempo de voo, foi a implementação de uma ferramenta chamada de “reflectron” que garante que íons de mesma massa e carga cheguem ao detector ao mesmo tempo, mesmo que a sua energia cinética inicial seja diferente.

Para melhorar a ionização foi necessário o desenvolvimento de um meio, uma matriz,

onde a amostra pudesse ser depositada e na qual a amostra pudesse ser aquecida e ionizada, através do uso de um feixe de laser. Durante o desenvolvimento do processo de ionização da amostra na matriz, Tanaka iniciou o uso de pó metálico ultrafino (contendo principalmente cobalto), que permitiu o aquecimento das moléculas da amostra sem a perda de calor por dispersão. Por fim, a matriz usada para a tecnologia MALDI-TOF MS como conhecemos hoje foi desenvolvida quando Tanaka misturou glicerina à matriz contendo pó metálico ultrafino e observou a ionização rápida das moléculas da amostra, sem perda de calor do laser por dispersão e sem decomposição da amostra, já que a glicerina consegue atuar na liberação da amostra de sua forma cristalizada para sua forma ionizada (Tanaka et al, 1987).

Atualmente, vários compostos orgânicos têm sido utilizados como matrizes para MALDI-TOF MS, porém, para aplicações microbiológicas os compostos com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (ACHC), o ácido gentístico (ácido 2,5-di-hidroxi-benzoico) e o ácido sinápico (ácido 3-(4-hidróxi-3,5-dimetóxi-fenil)prop-2-enóico) foram considerados os mais úteis. A solução da matriz consiste em água e uma mistura de solventes orgânicos contendo etanol/metanol ou acetonitrila e um ácido forte como ácido trifluoroacético (TFA), que dissolve a matriz. Os solventes penetram na parede celular dos microrganismos e extraem as proteínas intracelulares. Quando o solvente evapora, ocorre a "co-cristalização" de moléculas de proteína e outros compostos celulares aprisionados na solução da matriz. Quando a matriz cristaliza, ao secar, a amostra, retida na matriz, também co-cristaliza (Horneffer et al, 2001). A amostra dentro da matriz é ionizada de maneira automatizada por um feixe de laser. A desorção a partir da matriz e a ionização da amostra com o feixe de laser geram íons individualmente protonados dos analitos da amostra (Figura 1).

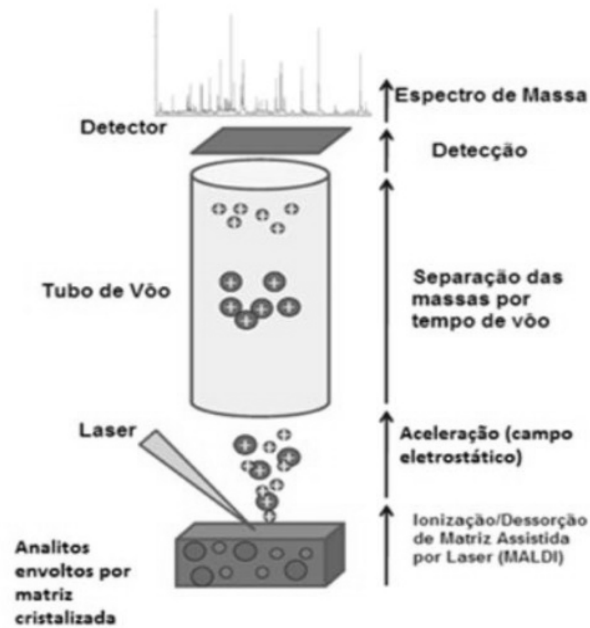


Figura 1: Funcionamento da metodologia MALDI-TOF MS

Fonte: Almeida Júnior et al. 2014 - Revista SBM vol.23.

A literatura relata que uma etapa preparatória com a extração de proteínas intracelulares é necessária para a identificação de bactérias Gram-positivas por MALDI-TOF MS, mas não para bactérias Gram-negativas (Saffert et al, 2011). Em adição, uma extração preparatória com ácido fórmico também é opcional na preparação de amostras de espécies bacterianas não fermentadoras (Mellmann et al, 2008) e de *Staphylococcus* spp. (Dubois et al, 2010).

Devido à natureza complexa das suas paredes celulares, as actinobactérias e as bactérias dos gêneros *Nocardia* e *Mycobacterium* requerem procedimentos de processamento específicos antes da análise por MALDI-TOF (Verroken et al, 2010). Em adição, em um estudo conduzido por Hettick e colaboradores (2008) relatou-se um método baseado em lise mecânica para preparação de amostras de hifas e esporos fúngicos.

A identificação de microrganismos por MALDI-TOF MS é realizada através da

comparação da “impressão digital” gerada pelo espectro de massa dos peptídeos de um microrganismo desconhecido com os padrões contidos na base de dados, ou combinando as massas de biomarcadores de organismos desconhecidos com a base de dados proteoma (Murray, 2012). Embora as condições de cultura possam afetar profundamente a morfologia e a fisiologia microbiana e também o perfil de expressão proteica, elas não influenciam a identificação microbiana pela MALDI-TOF MS (Bille et al, 2012).

Conforme o uso da metodologia se amplia, os bancos de dados se tornam mais completos e a identificação microbiana é melhorada (Pasternak, 2012). O *feedback* resultante do envio de estatísticas dos laboratórios para o fabricante é um ponto positivo para a metodologia, que mantém suas bases de dados atualizadas.

Apenas recentemente, equipamentos para a realização da tecnologia MALDI-TOF MS, foram disponibilizados comercialmente (Microflex LT™, da Bruker Daltonics/BD Diagnostics e VITEK MS™, da BioMérieux). Sendo assim, atualmente a utilização dos mesmos passou a ser mais difundida, reduzindo o tempo de liberação de resultados, custos e o trabalho na rotina laboratorial. Isto é prontamente evidenciado pelo número cada vez maior de publicações descrevendo o uso deste método para identificar isolados clínicos de microrganismos (Sloan, Wang e Cheng, 2017).

Atualmente, dois equipamentos (Microflex LT™ e VITEK MS™) estão disponíveis no mercado nacional para uso em laboratórios clínicos, sendo que o VITEK MS já dispõe de registro na ANVISA para utilização em laboratórios de Microbiologia Clínica (Almeida Júnior et al, 2014) (Figura 2 A/B).



A: Microflex, Bruker Daltonics/BD



B: VITEK MS, BioMérieux

Figura 2. Equipamentos MALDI-TOF disponibilizados comercialmente

Em um estudo conduzido por Porte e colaboradores (2017), no Chile, comparou-se a eficiência na identificação microbiana e a funcionalidade das duas plataformas MALDI-TOF comerciais, utilizando-se 804 microrganismos (incluindo cocos e bacilos Gram positivos, bacilos Gram negativos dos grupos das enterobactérias e Não Fermentadores, anaeróbios e leveduras). Os resultados obtidos nas duas plataformas foram comparados com aqueles obtidos por métodos convencionais, incluindo análises moleculares. Verificou-se que os dois sistemas identificaram a grande maioria das amostras corretamente (98%) ao nível de gênero, sendo que uma taxa ligeiramente maior de identificação ao nível de espécies e de espécies dentro de um mesmo complexo foi observada nos resultados do VITEK MS. Os dois equipamentos apresentaram alta funcionalidade e facilidade de uso, embora os autores tenham considerado o VITEK MS ligeiramente mais adaptável para a rotina do laboratório onde o estudo foi realizado.

4.2. APLICAÇÕES

4.2.1. Identificação Bacteriana

O processo de isolamento e identificação microbiológica a partir de amostras clínicas é um passo crítico para a confirmação e o uso da terapêutica adequada em casos de infecções bacterianas.

A espectrometria MALDI-TOF tornou-se uma grande revolução na prática da bacteriologia em laboratórios de microbiologia clínica. Essa metodologia pode realizar uma identificação precisa de bactérias usando uma pequena porção de uma colônia, em um período de tempo extremamente curto e com baixo custo operacional e de insumos se comparado ao método convencional (análise morfológica e testes bioquímicos) (Van Belkum et al, 2015).

Além disso, já existem alguns protocolos para se realizar identificações diretamente de urina e de frascos de hemocultura positivos (através de lavagens e remoção de proteínas contaminantes), o que pode melhorar ainda mais a qualidade do tratamento ofertado ao paciente (Altun et al, 2015).

Além dessas vantagens, alguns gêneros e espécies bacterianos apresentam dificuldades na sua identificação laboratorial, através dos métodos convencionais ou mesmo de sistemas automatizados. Entre exemplos de aplicação do MALDI-TOF MS na identificação de gêneros bacterianos que apresentam dificuldades no diagnóstico podemos citar *Staphylococcus* (especialmente do grupo dos coagulase-negativos), *Streptococcus* (especialmente do grupo *S. mitis*, que inclui várias espécies alfa-hemolíticas, entre elas *S. pneumoniae* e *S. mitis*) e *Acinetobacter* spp (especialmente do complexo *A. baumannii*).

4.2.1.1. *Staphylococcus* spp.

Muitas espécies de estafilococos colonizam a pele e membranas mucosas de seres humanos e outros organismos. Entretanto, em inúmeras situações, as espécies de estafilococos podem causar uma grande variedade de doenças em humanos e outros animais.

Staphylococcus aureus, é a principal espécie de importância clínica desse gênero e é um dos principais patógenos relacionados com as infecções em seres humanos. Várias outras espécies de *Staphylococcus* também foram implicadas em diversos tipos de infecções humanas, notadamente *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus* e *S. schleiferi*. Cabe ressaltar que, recentemente, os estafilococos coagulase-negativos (ECN) surgiram como patógenos importantes em pacientes imunodeprimidos e em uso de dispositivos plásticos, sendo particularmente associados às infecções da corrente sanguínea (Loonen et al, 2012).

Em estudo conduzido por Loonen e colaboradores (2012), com amostras tanto clínicas quanto amostras padrão de ECN, observou-se uma identificação correta de ECN de 99,3% (quando confrontados com resultados da técnica de sequenciamento parcial do gene *tuf* – considerada *padrão ouro*), pela tecnologia MALDI-TOF MS. Os resultados obtidos mostraram que a identificação das amostras de ECN pelo método MALDI-TOF MS apresentou maior acurácia, em comparação com os outros quatro métodos utilizados (sistema automatizado Vitek 2, ID 32 Staph strip (bioMérieux), sequenciamento do gene 16S rRNA e sequenciamento parcial do gene *tuf*).

Dubois e colaboradores (2010) analisaram um total de 152 cepas de estafilococos e desse total, 151 (99,3%) foram identificadas corretamente em nível de espécie pelo MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). Uma cepa de *S. saprophyticus* foi identificada erroneamente como *S. xylosus*. Cabe ressaltar, que a base de dados MALDI Biotyper continha 36 espécies estafilocócicas e, naquele momento, o gênero *Staphylococcus* compreendia 39 espécies descritas validamente.

Em sua revisão sobre estafilococos coagulase-negativos, Becker e colaboradores (2014) citam a metodologia MALDI-TOF MS, afirmando que a maioria dos estudos relatou especificidade maior que 97% para a identificação de estafilococos, incluindo estafilococos

coagulase-negativos, em nível de espécie. Esses autores ressaltaram que para alcançar essa alta especificidade, a qualidade do banco de dados e a padronização de parâmetros variáveis, como as condições de cultura, são cruciais (Becket et al, 2014).

Trevisoli e colaboradores (2018) mostraram em seu estudo que, na comparação entre os métodos disponíveis (fenotipagem convencional, automatização pelo sistema Vitek 2 e MALDI-TOF) com o sequenciamento do gene *tuf*, considerado o método de referência para a identificação de estafilococos coagulase-negativos, os resultados da metodologia MALDI-TOF MS apresentaram 100% de concordância com sequenciamento do gene *tuf*, indicando que MALDI-TOF MS é uma alternativa diagnóstica promissora e econômica para a identificação de estafilococos coagulase- negativos em laboratórios de microbiologia clínica.

4.2.1.2. *Streptococcus spp.*

Atualmente, existem mais de 100 espécies descritas de estreptococos e muitas dessas são membros da microbiota comensal; bactérias que estão presentes nas superfícies mucosas dos seres humanos ou animais e geralmente não causam danos a indivíduos saudáveis (Nobbs, Jenkinson e Everett, 2015). No entanto, estas espécies podem causar uma série de infecções que podem variar da cárie dentária e faringite, até as doenças capazes de causar risco de vida, tais como meningite e fasciíte necrosante, que são responsáveis por taxas elevadas de morbidade e mortalidade, e também são associadas a altos custos em cuidados de saúde. Um dos agentes clinicamente relevantes do gênero *Streptococcus* é a espécie alfa-hemolítica *S. pneumoniae*, cujo controle permanece um desafio (Andam e Hanage, 2015; Nobbs Jenkinson e Everett, 2015).

De acordo com Fan e colaboradores (2017), em seu trabalho de revisão, a metodologia MALDI-TOF MS identificou corretamente 99% das amostras pertencentes à espécie *S. pneumoniae*, 100% de *S. pyogenes* e 100% de *S. agalactiae*. Além disso, também apresentou alta acurácia em relação a outras espécies de *Streptococcus*, porém observou-se que a precisão

da técnica para *S. bovis* precisava ser melhorada (já que obteve uma acurácia de 88% nas identificações). Entretanto, o desempenho das análises por MALDI-TOF MS apresentou diferenças, dependendo da plataforma utilizada (Fan et al, 2017). Nesse estudo de revisão os autores verificaram que o sistema VITEK MS apresentou maior acurácia (98%) em comparação com o sistema MALDI Biotyper (94%). Essa discrepância estava relacionada com a identificação incorreta de amostras de *S. mitis/oralis*, do grupo “viridans” (de estreptococos alfa-hemolíticos), como sendo *S. pneumoniae* pelo sistema MALDI biotyper.

A discriminação de *S. pneumoniae* de outros estreptococos relacionados, do grupo *S. mitis*, é muito importante devido às diferenças de patogenicidade entre os microrganismos dessas espécies, porém essa diferenciação continua sendo um desafio de diagnóstico laboratorial, mesmo quando se utiliza métodos mais modernos como a tecnologia MALDI-TOF MS (Harju et al, 2017).

No seu trabalho, Harju e colaboradores (2017) aperfeiçoaram as análises de identificação de amostras de estreptococos alfa-hemolíticos através da MALDI-TOF MS, a partir do uso de um novo algoritmo combinado com o uso de um banco de dados aprimorado e atualizado, para a melhor diferenciação dessas espécies a partir da sua “assinatura de peptídeos”. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que quando a nova versão do banco de dados foi utilizada, apenas uma das 101 amostras do grupo de espécies de *S. mitis* foi identificada erroneamente como sendo *S. pneumoniae*, enquanto 66 delas (65%) foram erroneamente identificadas como pertencentes à espécie *S. pneumoniae*, quando a versão mais antiga da base de dados foi usada. O banco de dados atualizado combinado com o novo algoritmo não produziu erros de identificação das cepas do grupo de espécies de *S. mitis* como sendo *S. pneumoniae*. E todas as cepas de *S. pneumoniae* foram corretamente identificadas, tanto com o banco de dados padrão quanto com o banco de dados combinado com o novo algoritmo (MALDI Biotyper) (Harju et al, 2017).

4.2.1.3. Complexo *Acinetobacter baumannii*

O gênero *Acinetobacter* é composto por mais de 40 espécies e subespécies (Kishii et al, 2014). Entre estas espécies de *Acinetobacter*, *A. baumannii* é considerada a espécie clinicamente mais importante, sendo causa de diferentes infecções relacionadas com a assistência à saúde, frequentemente exibindo resistência a múltiplos fármacos, particularmente aos carbapenêmicos (Kempf e Rolain, 2012). As características clínicas e as susceptibilidades aos antimicrobianos de *A. baumannii* são diferentes das espécies de *Acinetobacter* não-*baumannii*, sendo que *A. baumannii* tem um impacto clínico maior, estando associado com quadros mais graves, e exibe maiores taxas de resistência antimicrobiana do que as outras espécies (Molina et al, 2010; Mari-Almirall et al, 2017). Portanto, a identificação correta das espécies de *Acinetobacter* é clinicamente importante (Jeong et al, 2016). Entretanto a discriminação entre as espécies de *Acinetobacter*, especialmente as pertencentes ao complexo *A. baumannii*, também conhecido como complexo *A. calcoaceticus-A. baumannii* (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. calcoaceticus*, *A. seifertii* e *A. dijkschoorniae*) não é possível de ser realizada por métodos fenotípicos. O sequenciamento do gene *rpoB* tem sido recomendado como um método com maior acurácia para identificação de espécies de *Acinetobacter*, entretanto essa técnica molecular apresenta uma série de desvantagens para ser utilizada na rotina laboratorial, tais como ser laboriosa, de custo elevado, demorada e exigir pessoal técnico especializado (Jeong et al, 2016).

Jeong e colaboradores (2016) utilizaram um total de 729 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. que incluía 447 amostras de *A. baumannii*, 146 amostras de *A. nosocomialis*, 78 amostras de *A. pittii*, 18 amostras de *A. ursingii*, 9 amostras de *A. bereziniae*, 9 amostras de *A. soli*, 4 amostras de *A. johnsonii*, 4 amostras de *A. radioresistens*, 3 amostras de *A. gyllenbergii*, 3 amostras de *A. haemolyticus*, 2 amostras de *A. lwoffii*, 2 amostras de *A. junii*, 2 amostras de *A. venetianus* e 2 amostras de *A. genomospecies*. Todas as amostras

tiveram sua identificação confirmada pelo sequenciamento do gene *rpoB*. Inicialmente 212 isolados clínicos foram testados com o banco de dados padrão (Bruker Daltonics GmbH). Em seguida, adicionaram-se os perfis de outras 63 amostras clínicas de *Acinetobacter*, ao banco de dados padrão e testou-se 517 isolados clínicos. Foi observado que a adição dos 63 perfis de espécies de *Acinetobacter* à base de dados padrão aumentou a taxa de acerto da MALDI-TOF MS em relação ao sequenciamento de gene *rpoB* de 69,8% (148/212) para 100,0% (517/517). Ou seja, após a atualização do banco de dados, todas as cepas de *Acinetobacter* previamente testadas e identificadas erroneamente foram corretamente identificadas.

Marí-Almirall e colaboradores (2017) em seu estudo utilizaram 78 isolados de *Acinetobacter*, representativos do complexo *A. baumannii* para calcular os espectros das espécies componentes do complexo e gerar novos modelos de reconhecimento, uma vez que as novas espécies *A. seifertii* e *A. dijkschoorniae* não são identificadas com o banco de dados padrão. Picos específicos de cada uma das espécies foram identificados para cada uma das espécies. O uso de um banco de dados atualizado permitiu a identificação de todos os isolados a partir de colônias crescidas em meio sólido, resultando em um valor preditivo positivo de 99,6%.

4.2.2. Identificação Direta

Na microbiologia, a possibilidade de identificar patógenos diretamente de espécimes clínicos pela metodologia MALDI-TOF, como urina ou a partir de frascos de hemocultura positiva, sem a necessidade da colônia crescida em meio sólido, sempre despertou grande interesse, entretanto, a alta concentração de proteínas presentes no sangue e na urina interferem na detecção de proteínas bacterianas e fúngicas específicas, sendo um grande obstáculo no uso desse método (La Scola, 2011). Além disso, a baixa concentração de microrganismos presentes nessas amostras também dificulta a identificação dos espectros de massa. Assim, vários grupos de pesquisa têm desenvolvido e avaliado diferentes protocolos

para a extração de proteínas de microrganismos e remoção de substâncias que possam interferir na análise por MALDI-TOF MS (Stevenson, Drake e Murray, 2010; Ferreira et al, 2011; Buchan, Riebe e Ledebøer, 2012). Estes métodos podem ser trabalhosos e incluem várias fases tais como centrifugação, lavagem, separação em gel e extração de proteínas (La Scola, 2011; Buchan, Riebe e Ledebøer, 2012).

Moussaoui e colaboradores (2010), em seu estudo sobre identificação bacteriana por MALDI-TOF MS, utilizando amostras provenientes diretamente de frascos de hemocultura positiva, obtiveram melhores resultados na identificação de organismos Gram-negativos (91,1%) em comparação com aqueles obtidos na identificação de Gram-positivos (89%).

Buchan e colaboradores (2012) avaliaram 164 amostras positivas de hemocultura com um *kit* para extração bacteriana (MALDI Sepsityper kit - Bruker Daltonics). Segundo esses autores, essa metodologia foi capaz de identificar corretamente 85,5% dos isolados diretamente de amostras de hemocultura, com 97,6% de consistência ao nível de gênero e 94,1% de consistência ao nível de espécie, quando em comparação com outros métodos de identificação convencionais.

Ferreira e colaboradores (2010) analisaram 260 amostras de urina por cultura e MALDI-TOF MS. As 260 amostras foram inicialmente processadas através de um equipamento automatizado para triagem, baseado em citometria de fluxo (UF-1000i) e detectadas como sendo positivas. Das amostras de urina verdadeiramente positivas, *E. coli* foi a bactéria mais frequentemente isolada e o MALDI-TOF MS identificou *E. coli* corretamente em 94,2% das amostras de urina analisadas diretamente. Entre as amostras de urina positivas na cultura e com crescimento $> 10^5$ UFC/mL, o MALDI-TOF MS identificou corretamente 92% ao nível de espécie e 93%, ao nível de gênero. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que essa metodologia pode ser utilizada para identificação bacteriana diretamente de amostras de urina com acurácia elevada e em menor tempo que os métodos convencionais,

especialmente quando bactérias Gram negativas e contagens $> 10^5$ estão envolvidas.

Em outro estudo, comparou-se o método de deposição direta da colônia ou material biológico (ICM, do inglês “intact cell method”) com o método de extração de proteínas (PEM, do inglês “protein extraction method”) para aplicação do material a ser analisado na placa de MALDI-TOF MS, de 238 amostras positivas de urina e 68 frascos de hemocultura positivos. Todas as amostras também foram processadas por métodos convencionais, envolvendo Gram (para hemoculturas positivas), culturas e meios sólidos e testes bioquímicos. O método ICM apresentou excelentes resultados para urina e bons resultados para hemoculturas. A identificação a partir de frascos de hemoculturas positivas pode ser melhorada se o método PEM for utilizado. De uma forma geral, os autores desse estudo publicaram que a metodologia MALDI-TOF MS é adequada para ser utilizada na rotina laboratorial, para a identificação direta de amostras de urina ou de frascos de hemocultura (Ferreira et al., 2011).

Em adição a tecnologia MALDI-TOF MS tem sido considerada eficaz não apenas na identificação de bactérias Gram positivas (cocos e bacilos fastidiosos) e Gram negativas (enterobactérias e não fermentadores), mas também de leveduras e fungos filamentosos e diversos estudos têm mostrado que, por suas características de rapidez, acurácia e baixo custo de insumos, seu uso é muito conveniente na rotina do laboratório de microbiologia clínica (Carbonelle et al, 2011; Dingle e Butler-Wu, 2013; Hou, Chiang-Ni e Teng, 2109).

No Brasil, em 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou um comunicado de risco envolvendo *Candida auris*, um fungo multirresistente emergente. Neste documento, a ANVISA recomenda a utilização da técnica MALDI-TOF e/ou por sequenciamento da região D1-D2 ou ITS, para a identificação dessa levedura, já que outros métodos de diagnóstico de rotina podem identificar *C. auris* erroneamente. Desta forma, observa-se que aos poucos, o método vem sendo empregado no nosso meio, e sendo inclusive,

indicado como método de referência em alguns casos.

Além da identificação microbiana, a tecnologia MALDI-TOF MS também tem sido aplicada em outras duas áreas da Microbiologia: testes para verificação de alguns mecanismos de resistência microbiana e tipagem microbiana (Murray, 2010).

4.2.3. Detecção de Mecanismos de Resistência

O uso de MALDI-TOF MS para testes referentes à susceptibilidade antimicrobiana é uma área de pesquisa de possibilidades interessantes. O número de publicações com o tema vem aumentando nos últimos anos, mostrando uma tendência no uso da técnica MALDI-TOF MS para essa finalidade.

Na bacteriologia, Wolters e colaboradores (2011) relataram perfis espectrais distintos que poderiam ser usados para diferenciar *S. aureus* sensíveis à meticilina de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Com os resultados obtidos, eles concluíram que a expressão da resistência à meticilina pode ser confirmada de forma significativamente mais rápida do que com os métodos de testes convencionais.

Sparbier e colaboradores (2012) relataram a detecção da produção de β -lactamases em enterobactérias, principal mecanismo de resistência a carbapenêmicos e outros antibióticos β -lactâmicos. O princípio de detecção baseia-se na hidrólise do anel β -lactâmico na presença de enzimas bacterianas. A técnica de MALDI-TOF MS é capaz de detectar alterações na massa de antibióticos devido à modificação química na molécula antimicrobiana. Para este teste, é necessário incubar o extrato de proteína bacteriana com o antibiótico por um período de 1 a 4 horas para que seja possível detectar a presença de β -lactamase com atividade hidrolítica em penicilinas, cefalosporinas ou carbapenêmicos.

Pela importância clínica das carbapenemases, vários estudos têm demonstrado que o método baseado em hidrólise associado com MALDI-TOF MS é um método eficaz na detecção de várias dessas enzimas, incluindo NDM-1, KPC, VIM-1, OXA-48, entre outras,

com sensibilidade próxima a 100% e com resultados liberados em 1-2,5 horas. Entretanto, para a implementação dessa técnica na rotina laboratorial ainda será necessária a disponibilização de procedimentos e softwares para a interpretação dos resultados (Dingle e Blutter-Wu, 2013).

Hrabak e colaboradores (2011) usaram o MALDI-TOF MS para avaliar a degradação do meropenem pelas carbapenemases. Embora este método não substitua os métodos atuais, ele pode ser utilizado para verificação da expressão da atividade de carbapenemase, além de ser uma metodologia rápida, comparada aos testes convencionais, que requerem 18-24h para liberação dos resultados.

Outra resistência que tem trazido grande preocupação é a resistência às polimixinas, especialmente em bactérias gram negativas produtoras de carbapenemases. Essa resistência pode ser devido a dois diferentes mecanismos: mutações cromossômicas ou aquisição do gene plasmidial *mcr-1*, sendo esse último de maior importância clínica e epidemiológica pela maior facilidade de disseminação. Entretanto, o método de referência para a detecção de cepas resistentes a esses fármacos é o método da microdiluição em caldo, o qual é laborioso e demorado, não sendo muito adequado para a rotina laboratorial (Dordet et al, 2018).

Recentemente, Dordet e colaboradores (2018) desenvolveram um método baseado na tecnologia MALDI-TOF MS, denominado por esses pesquisadores de “MALDIxin test”, para a detecção de resistência às polimixinas. Os resultados obtidos mostraram que o método MALDIxin foi capaz de identificar as cepas resistentes, bem como discriminar o mecanismo de resistência como sendo devido às mutações cromossomiais ou à aquisição de plasmídeo.

Na micologia, Whaley e Rogers (2016) demonstraram que a resistência a azóis em *Candida glabrata* estava associada à expressão diferencial de 25 proteínas. Já Wickes e Wiederhold (2018) compararam o proteoma de cepas de *C. albicans* com sensibilidade ao fluconazol bem como de cepas resistentes ao fluconazol e demonstraram discretas mudanças

dos perfis, que correspondiam a valores de concentração inibitória mínima (CIM), determinados pelo método de referência de microdiluição do *Clinical Laboratory Standards Institute*.

Na virologia, a aplicação da técnica MALDI-TOF MS também se mostrou útil para detectar resistência contra alguns antivirais. Zürcher e colaboradores (2012) desenvolveram um método sensível e rápido para a detecção da resistência ao ganciclovir num experimento PCR baseada em um protocolo prévio com MALDI-TOF.

4.2.4. Tipagem Microbiana

A técnica de MALDI-TOF MS que tem sido recentemente muito utilizada, e com sucesso, na investigação e na identificação de proteínas e peptídeos, também tem sido aplicada na genotipagem, na investigação de polimorfismos no DNA e na análise de modificações pós-transcricionais no RNA (Croxatto, Prod'hom e Greub, 2012).

Como a tecnologia MALDI-TOF MS detecta um amplo espectro de proteínas, a técnica também pode ser utilizada na discriminação entre espécies intimamente relacionadas e na classificação de organismos no nível de subespécies.

Vários estudos têm verificado o uso do MALDI-TOF MS como método de tipagem para cepas MRSA e amostras de *Listeria monocytogenes*, bem como *Enterococcus faecium* VRE, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros microrganismos (Dingle e Blutter-Wu, 2013; Culebras et al, 2016).

De acordo com Murray (2010), o MALDI-TOF MS mostrou-se como uma abordagem viável para a diferenciação de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) de cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA). Quando comparada ao padrão ouro (PCR para o gene *mecA*) eles conseguiram identificar corretamente cepas de MRSA de cepas MSSA e outras espécies de estafilococos não-*aureus*.

Stephan e colaboradores (2011) desenvolveram um banco de dados para uso em

MALDI-TOF MS para a identificação de espécies de *Yersinia enterocolitica*. Cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* geralmente são identificadas por biotipagem e serotipagem, técnicas laboriosas e que requerem tempo prolongado. Com o uso desta base de dados, esses pesquisadores conseguiram diferenciar corretamente as 19 cepas de *Y. enterocolitica*, dentre cepas patogênicas e não patogênicas.

4.2.5. Outras Aplicações

Feucherolles e colaboradores (2019), em sua revisão, afirmam que infecções por helmintos causadas por nematoides, cestóides e trematódeos estão entre as infecções mais comuns em populações marginalizadas nas regiões dos trópicos e subtropicais. O uso do MALDI-TOF MS poderia ser empregado no contexto do diagnóstico de helmintos. Resultados mostram que essa metodologia pode ser promissora como uma ferramenta diagnóstica para a identificação rápida e direta de helmintos patogênicos em amostras clínicas humanas e veterinárias, com acurácia diagnóstica adequada.

As técnicas laboratoriais tradicionais mais comuns na detecção de vírus incluem a análise de anticorpos como no ensaio imunoenzimático, técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), e, a hibridização *Dot Blot*. No entanto, a tecnologia MALDI-TOF MS já foi usada para investigar uma ampla variedade de vírus clinicamente relevantes, existindo várias abordagens desta tecnologia com aplicação no campo da virologia (Cobo, 2013).

Calderaro e colaboradores (2014) testaram a MALDI-TOF MS como uma ferramenta para identificar poliovírus humanos e identificar biomarcadores específicos de proteínas virais em células infectadas. Seus resultados revelaram que a MALDI-TOF MS é uma ferramenta eficaz e barata para a identificação dos três sorotipos do poliovírus. Seu método foi inicialmente aplicado a cepas de referência Sabin e, em seguida, a isolados de diferentes amostras clínicas, destacando seu valor como técnica rápida, específica e sensível quando

comparada ao padrão-ouro que incluem a técnica de ELISA e técnica de vírus-neutralização.

De acordo com Goulart e Rezende (2013) em sua revisão, uma nova tecnologia baseada em MALDI-TOF MS, que tem sido desenvolvida, é a IMS (do inglês, “Imaging mass spectrometry”). Essa técnica permite a análise direta de um tecido qualquer, viabilizando a correlação direta dos dados de espectrometria de massa com as características morfológicas do tecido, através da aquisição de imagens pelo MALDI-IMS. Na análise por MALDI-IMS, uma matriz é aplicada sobre um corte histológico do tecido e disparos do laser são realizados. Os íons resultantes são separados pelo analisador de Tempo de Voo, de acordo com suas massas e cargas (m/z) e as imagens são geradas pelo conjunto de íons captados, sendo possível selecionar um único íon de interesse e localizar em qual região do tecido ele está presente. Desta forma, a técnica MALDI-IMS tem se destacado na detecção de marcadores tumorais e pesquisa clínica na área de uma variedade de tipos de neoplasias, dentre eles, para o câncer de mama, de próstata, de intestino, de ovário, de cérebro e linfomas.

Além da utilização dessa técnica para diagnóstico de câncer, a mesma também tem sido aplicada no diagnóstico de algumas doenças inflamatórias, como a doença inflamatória intestinal. Em adição, perspectivas de novas aplicações dessa metodologia incluem o estudo das interações patógeno-hospedeiro visando a investigação de novos marcadores de infecção, entre outras possibilidades (Schubert e Kostrzewa, 2017).

4.2.6. Vantagens e Limitações

Resumidamente, entre as principais vantagens que a metodologia MALDI-TOF MS apresenta, podemos citar: o rápido tempo de liberação do resultado, confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados, uma grande capacidade de identificar diversas espécies microbianas em uma mesma plataforma, facilidade de preparação, operação, leitura e interpretação dos resultados, além do baixo custo por amostra. Entretanto, a dificuldade de identificação de algumas espécies intimamente relacionadas (ex.: *Escherichia coli* e *Shigella*

sp.), a dependência do fabricante para a ampliação do banco de dados, a capacidade limitada de identificação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a necessidade de cultura pura e o alto custo inicial para aquisição do equipamento estão entre as principais limitações que essa metodologia ainda apresenta na sua utilização nos laboratórios de microbiologia clínica (Dingle e Butler-Wu, 2013).

A Tabela 1 resume as principais vantagens e desvantagens das diversas metodologias já disponíveis para utilização na identificação microbiana, incluindo a tecnologia MALDI-TOF MS.

Método de identificação	Vantagens	Desvantagens
Métodos clássicos: Cultura em meio de crescimento e identificação por provas bioquímicas	Sensibilidade Baixo custo	Laborioso e demorado Pode levar de 24h à 48h para a entrega do resultado
Métodos imunológicos	Mais rápidos que os métodos clássicos Podem detectar tanto o patógeno quanto suas toxinas	Menos específicos, sensíveis e rápidos que os métodos de identificação microbiana baseados em ácidos nucleicos Requerem grandes quantidades de antígenos Disponíveis apenas para uma pequena quantidade de microrganismos
Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	Identificação rápida e direta a partir do esfregaço Uso rápido e prático de métodos de coloração combinados à especificidade dos métodos moleculares	Limitado pela disponibilidade de antígenos específicos para a detecção
Métodos moleculares: PCR em tempo real e PCR Multiplex	Não é necessária a cultura da amostra Específico, rápido e preciso Risco reduzido de contaminação entre as amostras Capaz de detectar diversos patógenos ao mesmo tempo	Um termociclador de alta precisão é necessário Somente pessoal treinado é capaz de realizar a metodologia
Sequenciamento de DNA	O sequenciamento de 16S rDNA e de 18S rDNA é o padrão ouro Consegue identificar microrganismos fastidiosos e difíceis de obter em cultura	Precisa de pessoal altamente treinado e de softwares poderosos para a análise dos dados Método caro Não é apropriado para a rotina do laboratório clínico
Microarrays	<i>Screening</i> em larga escala para a detecção e o diagnóstico simultâneos de diversos patógenos	Método caro Somente pessoal treinado é capaz de realizar a metodologia
Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP)	Replica grandes quantidades de DNA em menos de uma hora Fácil de usar Não necessita de equipamentos sofisticados	Desenvolvido para um pequeno número de microrganismos
Metagenômica	Útil para a detecção aleatória de patógenos	Aquisição e análise de dados é demorada Somente pessoal treinado é capaz de realizar a metodologia
MALDI-TOF MS	Rápido Preciso Insumos mais baratos que os utilizados em métodos moleculares e imunológicos Não necessita de pessoal altamente treinado	Custo inicial elevado com a compra do equipamento de Espectrometria MALDI-TOF Dificuldade de identificação de algumas espécies intimamente relacionadas

Fonte: Singhal e colaboradores, 2015.

Comparando-se com as outras metodologias, apesar do custo inicial elevado com a

compra do equipamento, a técnica da MALDI-TOF MS é altamente adequada ao diagnóstico microbiológico e se mostra muito promissora na rotina laboratorial. A velocidade para a obtenção de resultados se mostra o maior atrativo da metodologia, sendo acompanhada pela precisão nas análises e baixo custo dos insumos.

Um desafio encontrado no uso de MALDI-TOF MS é a necessidade da manutenção do seu banco de dados de espécies atualizado. A taxonomia microbiológica é muito dinâmica, sofrendo constantes modificações. Sendo assim, o número de espécies a serem identificadas está sempre se alterando. É de crucial importância que os bancos de dados possam ser atualizados com frequência, a fim de se acompanhar as mudanças taxonômicas.

5. CONCLUSÕES

A microbiologia clínica tem se desenvolvido continuamente, sempre promovendo uma busca constante por novas técnicas e métodos diagnósticos, com o objetivo de otimizar a identificação de patógenos.

Sendo uma técnica relativamente nova, a espectrometria de massa MALDI-TOF oferece a possibilidade de identificação precisa, rápida e barata de diversos microrganismos, apesar da desvantagem de apresentar um alto custo de investimento inicial, na compra do aparelho. A rapidez e a versatilidade da técnica também são admiráveis, já que através de diferentes bancos de dados é possível identificar diversas proteínas presentes não apenas em microrganismos bacterianos e fúngicos, mas também em partículas virais, parasitos como helmintos e em células tumorais.

Os procedimentos de pré-processamento dos microrganismos e a análise por MALDI-TOF MS são tecnicamente simples e reprodutíveis, e bancos de dados comerciais e algoritmos interpretativos estão disponíveis para a identificação de um amplo espectro de bactérias e fungos.

Sendo assim, espera-se que essa tecnologia venha a ser rapidamente difundida e aprimorada, e cada vez mais utilizada nos laboratórios de análises clínicas nacionais, uma vez que a mesma já vem se tornando uma técnica de referência na identificação de microrganismos em laboratórios de microbiologia clínica de vários países do mundo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida Júnior J N, Di Gioia T S R, Doi A M, Rossi F (2014). Aplicação da tecnologia de espectrometria de massa MALDI-TOF em laboratórios de microbiologia clínica. *Microbiologia in foco (Informativo SBM)*(23), pp.10-16.

Altun O, Botero-Kleiven S, Carlsson S, Ullberg M, Özenci V (2015). Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. *J Med Microbiol* 64, pp. 1346–1352.

Andam C P, Hanage W P (2015). Mechanisms of genome evolution of *Streptococcus*. *Infect Genet Evol* 33, pp. 334–342.

Anhalt J P, Fenselau C (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 47, pp.219–225.

Anvisa: Comunicado de risco Nº 01/2017 – GVIMS/GGTES/ANVISA. Relatos de surtos de *Candida auris* em serviços de saúde da América Latina. [Acesso em 13/03/2019]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/458700/Comunicado+de+Risco+n%C2%BA+01+2017+GVIMS-GGTES-Anvisa/1d23b200-5640-4aa3-a8e8-5239c8d2e000>

Becker K, Heilmann C, Peters G (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 27(4) pp.870-926.

Beekmann S E, Diekema D J, Chapin K C, Doern G V (2013). Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J Clin Microbiol.* 41(7), pp. 3119-3125.

Bille E, Dauphin B, Leto J, Bougnoux M E, Beretti J L, Lotz A, Suarez S, Meyer J, Join-Lambert O, Descamps P, Grall N, Mory F, Dubreuil L, Berche P, Nassif X, Ferroni A (2012). MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect* 18, pp. 1117–1125.

Buchan B W, Riebe K M, Ledebner N A (2012). Blood culture bottles identification of bacteria

from positive routine microbiological methods for using sepsityper specimen processing to comparison of the MALDI biotyper system. *J Clin Microbiol* 50(2), pp. 346-52.

Calderaro A, Arcangeletti M C, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, Germini D, Medici M C, Chezzi C, De Conto F (2014). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci Rep.* 30(4), pp.6803-13.

Carbonelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Berettib JL, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 44, p.104-109

Cobo F (2013). Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical virology: a review. *Open Virol J.* 27(7), pp.84-90.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 36(2), pp.380-407.

Culebras E, Álvarez-Buyllab A, Reinosoc M J A, Lepe J A(2016). Estudios de tipificación con MALDI-TOF. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 34(Supl 2):42-46.

Dingle T C, Butler-Wu S M, (2013). MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clin Lab Med* 33, pp.589–609.

Dortet L, Bonnin R A, Pennisi, Gauthier L, Jousset A B, Dabos L, Furniss R C D, Mavridou D A I, Bogaerts P, Glupczynski Y, Potron A, Plesiat P, Beyrouthy R, Robin F, Bonnet R, Naas T, Filloux A, Larrouy-Maumus G. 2018. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: the MALDIxin test. *J Antimicrob Chemother.* 1;73(12):3359-3367.

Dubois D, Leyssene D, Chacornac J P, Kostrzewa M, Schmit P O, Talon R, Bonnet R, Delmas J (2010). Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48, pp.941–945.

Ekström S, Onnerfjord P, Nilsson J, Bengtsson M, Laurell T, Marko-Varga G (2000). Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification. *Anal. Chem.* 72, pp.286–293.

Everley R A, Mott T, Wyatt S, Toney D, and Croley T (2008). Liquid chromatography/mass spectrometry characterization of *Escherichia coli* and *Shigella* species. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, pp.1621–1628.

Fan W T, Qin T T, Bi R R, Kang H Q, Ma P, Gu B (2017). Performance of the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for rapid identification of streptococci: a review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 36 (6), pp. 1005–1012.

Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, González-Buitrago J M, Muñoz-Bellido J L (2010). Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 48(6), p. 2110–2115.

Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido J L, González-Buitrago J M, (2011). Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect* 17, pp. 1007-1012.

Feucherolles M, Poppert S, Utzinger J, Becker S L (2019). MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review. *Parasit Vectors* 12(1), pp.245-58.

Goulart V A M, Resende R R (2013). MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. *Nanocell News* 1(3), pp.23-28.

Harju I, Lange C, Kostrzewa M, Maier T, Rantakokko-Jalava K, Haanperä M (2017). Improved Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* and Other *S. mitis* Group Streptococci by MALDI Biotyper Using an Improved MALDI Biotyper Database Content and a Novel Result Interpretation Algorithm. *J Clin Microbiol.* 55(3), pp.914-922.

Hettick J M, Green B J, Buskirk A D, Kashon M L, Slaven J E, Janotka E, Blachere F M, Schmechel D, Beezhold D H (2008). Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, pp.2555–2560.

Hillenkamp F, Karas M (1990). Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* 193, pp.280–95.

Horneffer V, Forsmann A, Strupat K, Hillenkamp F, Kubitscheck U (2001). Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy. *Anal. Chem.* 73, pp.1016–1022.

Hou T-Y, Chiang-Ni C, Teng S-H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Analysis.* 47, pp.404-414.

Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T (2011). Carbapenemase activity detection by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 49, pp. 3222–3227.

Jeong S, Hong J S, Kim J O, Kim K H, Lee W, Bae I K, Lee K, Jeong S H (2016). Identification of *Acinetobacter* Species Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Ann Lab Med.* 36(4), pp. 325-34.

La Scola B (2011). Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry-based approaches for the diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 11 (3), pp. 287-98.

Loonen A J M, Jansz A R, Bergland J N B, Valkenburg M, Wolffs P F G, Van den Brule A J C (2012). Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 50(4), pp.1437-1439.

Kempf M, Rolain JM (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 39(2), pp.105-14.

Kishii K, Kikuchi K, Matsuda N, Yoshida A, Okuzumi K, Uetera Y, Yasuhara H, Moriya K (2014). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for species identification of *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures. *Clin Microbiol Infect* 20(5), pp.424-30.

Kumar A, Roberts D, Wood K E, Light B, Parrillo J E, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.*34(6), pp.1589-1596.

Marí-Almirall M, Cosgaya C, Higgins P G, Van Assche A, Telli M, Huys G, Lievens B, Seifert H, Dijkshoorn L, Roca I, Vila J (2017). MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. *Clin Microbiol Infect.* 23(3), pp.210e1-210e9.

Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Dunn J, Hall G, Wilson D, Lasala P, Kostrzewa M, Harmsen D (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 46, pp.1946–1954.

Molina J, Cisneros J M, Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Baño J, Ribera A, Beceiro A, Martínez-Martínez L, Pascual Á, Bou G, Vila J, Pachón J (2010). Clinical features of infections and colonization by *Acinetobacter* genospecies 3. *J Clin Microbiol* 48(12), pp.4623-6.

Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, Prévost G (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vial. *Clin. Microbiol. Infect.* 16(11), pp. 1631-8.

Murray P R (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 16, pp.1626–1630.

Murray P R (2012). What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Mol. Diagn.* 14, pp.419–423.

Nobbs A H, Jenkinson H F, Everett D B (2015). Generic determinants of *Streptococcus* colonization and infection. *Infect Genet Evol* 33, pp. 361–370.

Pasternak J (2012). New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Medical Developments* (10-1), pp. 118-119.

Porte L, García P, Braun S, Ulloa M T, Lafourcade M, Montaña A, Miranda C, Acosta-Jamett G, Weitzel T.(2017). Head-to-head comparison of Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry in Chile. *PLoS One*, pp1-23.

Saffert R T, Cunningham S A, Ihde S M, Jobe K E, Mandrekar J, Patel R (2011). Comparison of bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometer to BD phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 49, pp.887–892.

Signor L, Erba E B (2013). Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometric Analysis of Intact Proteins Larger than 100 kDa. *Journal of Visualized Experiments* (79), pp. 47-54.

Singhal N, Kumar M, Kanaujia P K, Viridi J S (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* 6, pp.791.

Sloan A, Wang G, Cheng K. (2017) Traditional approaches versus mass spectrometry in bacterial identification and typing. *Clin. Chim. Acta* 473, pp. 180-185.

Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M (2012). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* 50(3), pp. 927-37.

Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pflüger V, Tonola M, Ravasi D, Fredricksson-Ahomaa M, Hächler H (2011). Rapid species-specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 87, pp. 150-153.

Stevenson L G, Drake S K, Murray P R (2010). Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48(2), pp. 444-447.

Schubert S e Kostrzewa M (2017). MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. *Curr. Issues Mol. Biol.* 23: 17-20.

Tanaka K, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T (1987). Detection of High Mass Molecules by Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry 1987*, pp.185–188

Tanaka K (2003). The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int.* (42), pp. 3860-3870.

Trevisoli L E, Bail L, Rodrigues L S, Conte D, Palmeiro J K, Dalla-Costa L M (2018). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight: a promising alternative method of identifying the major coagulase-negative Staphylococci species. *Rev Soc Bras Med Trop.*51(1):85-87.

Van Belkum A, Chatellier S, Girard V, Pincus D, Deol P, & Dunne V M Jr (2015). Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert Review of Proteomics* 12 (6), pp.595-605.

Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T D, Wauters G, Glupczynski Y (2010). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J. Clin. Microbiol.* 48, pp.4015–4021.

Whaley S G, Rogers P D (2016). Azole Resistance in *Candida glabrata*. *Curr Infect Dis Rep.* 18(12), pp.41

Wickes B L, Wiederhold N P (2018). Molecular diagnostics in medical mycology. *Nature Communications* 9, pp.5135.

Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M (2011). MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol.* 301(1), pp. 64-68.

Zürcher S, Mooser C, Lüthi A U, Mühlemann K, Barbani M T, Mohacsi P, Garzoni C, Gorgievski-Hrisoho M, Schaller A, Flatz L (2012). Sensitive and rapid detection of ganciclovir resistance by PCR based MALDI-TOF analysis. *J Clin Virol* 54(4), pp.359-63.