

## O USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI TOF NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Thalita Chaves Moreira<sup>1</sup>, Mario Rene S. M. Souza<sup>2</sup>

### Resumo

Com o avanço da tecnologia novos métodos diagnósticos têm sido desenvolvidos. Um destes métodos é o MALDI- TOF que significa *Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time of Flight* (Dissociação Ionização a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo) o qual consiste em um sistema de espectrometria de massa (MS), que realiza uma identificação microbiológica em minutos, com baixos custos de reagentes e uma técnica altamente precisa. Analisando a coleta de um material e liberação de seu laudo o tempo é de grande importância para um resultado satisfatório. Os métodos de culturas convencionais em um laboratório de microbiologia clínica são dependentes de tempo de incubação para o crescimento e isolamento dos patógenos e de testes fenotípicos que possuem limitações. Desta forma, o MALDI- TOF fornece ao analista e ao médico informações rápidas para iniciar o tratamento adequado, contribuindo para o atendimento do paciente. Desse modo, se há uma rápida identificação da etiologia de uma bacteremia, por exemplo, há uma redução do tempo de hospitalização e dos custos de uma internação. A técnica consiste em um método de automação bastante rápido e preciso na identificação de bactérias e fungos, a qual detecta moléculas de proteínas, identificando assim a estirpe. Desenvolvido especificamente para o fluxo de trabalho aprimorado no laboratório de microbiologia clínica, sendo de fácil manuseio, apresentando menos tempo de mão de obra, com alta produção e, resultados no mesmo dia. Este artigo tem por objetivo apresentar uma revisão de literatura sobre o uso da espectrometria de massa MALDI TOF na identificação de bactérias e fungos no diagnóstico laboratorial na microbiologia clínica.

**Palavras-chave:** Identificação. Bactérias. Espectrometria de massa. Desorção. Ionização.

### Abstract

With the advancement of technology new diagnostic methods have been developed. One of these methods is the MALDI-TOF which stands for *Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time of Flight* (Matrix Assisted Laser Ionization - Flight Time) which consists of a mass spectrometry (MS) system that performs an identification microbiological in minutes, with low reagent costs and a highly accurate technique. Analyzing the collection of a material and releasing its report time is of great importance to a satisfactory result. Conventional culture methods in a clinical microbiology laboratory are time-dependent incubation for growth and isolation of pathogens and phenotypic tests which have limitations. In this way, MALDI-TOF provides the analyst and the physician with quick information to start the appropriate treatment, contributing to the patient's care. Thus, if there is a rapid identification of the etiology of a bacteremia, for example, there is a reduction in hospitalization time and the costs of hospitalization. The technique consists of a very fast and precise automation method in the identification of bacteria and fungi, which detects molecules of proteins, thus identifying the strain. Developed specifically for the improved workflow in the clinical microbiology laboratory, it is easy to handle, with less labor time, high production and same-day results. This paper aims to present a literature review on the use of MALDI TOF mass spectrometry in the identification of bacteria and fungi in laboratory diagnosis in clinical microbiology.

**Keywords:** Identification. Bacteria. Mass spectrometry. Desorption. Ionization.

1 Acadêmica do Curso de Bacharelado de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba/PR). Endereço eletrônico para correspondência: Thalita Chaves Moreira, thatychaves\_09@hotmail.com

2 Biólogo, Professor Mestre da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba/PR). Endereço eletrônico para correspondência: Mario Rene S. M. Souza, mario.rene@utp.br

## Introdução

A identificação de bactérias, fungos e micobactérias dentro de um laboratório de microbiologia clínica têm sido realizados por métodos tradicionais, que envolvem técnicas de pré-enriquecimento, para a multiplicação de microrganismos, meios de culturas seletivas, que permite o crescimento e inibição de certos microrganismos, e a semeadura para depois testes fenotípicos. A cultura, portanto demora, dependendo do patógeno podem demorar de quatro a seis horas, como semanas delongando assim a realização de testes fenotípicos (PASTERNAK, 2012).

Desta forma estes métodos dependem das diferenças metabólicas que existem entre as espécies, o crescimento de colônias isoladas em meios de cultura e amplo período de incubação tardando o resultado dos mesmos (ASSIS, JULIANO e JULIANO, 2011).

Em alguns casos como sepse, a identificação e o tratamento são primordiais para um rápido e eficiente diagnóstico. É visível ao profissional da saúde que o tempo é crucial, pois a cada hora de demora na identificação microbiológica, o tempo de mortalidade aumenta como mostra estudos como o de Kumar *et al* (2006), de 10 a 20%. Logo se há uma rápida identificação da etiologia de uma bacteremia, há uma redução do tempo de hospitalização e dos custos de uma internação possibilitando assim a liberação de um leito para outro paciente (BENAGLI *et al.*, 2011).

Com o avanço da tecnologia novos métodos diagnósticos têm sido desenvolvidos. Um destes métodos é o MALDI- TOF que significa *Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time of Flight* (Dissociação Ionização a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo) o qual consiste em um sistema de espectrometria de massa (MS), que realiza uma identificação microbiológica em minutos, com baixos custos de reagentes e uma técnica altamente precisa (PASTERNAK, 2012; GILBERT GREUB, 2013).

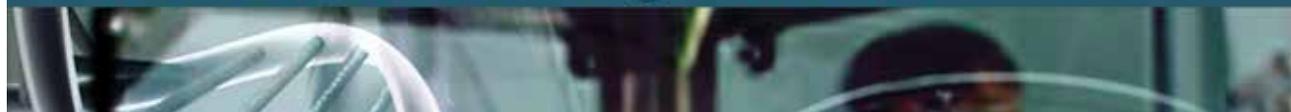
Este artigo tem por finalidade apresentar uma revisão de literatura sobre o uso da espectrometria de massa MALDI TOF na identificação de bactérias e fungos no diagnóstico laboratorial na microbiologia clínica.

## Metodologia

O estudo realizado é um artigo de revisão sobre o uso do MALDI TOF no laboratório de microbiologia clínica, onde se utilizou as seguintes bases de dados: *Scielo*, *PubMed*, *Science Direct*, Portal de Periódicos Capes e *Bireme*. Para a escolha dos textos e dos artigos foram utilizados os seguintes conceitos-chave: MALDI TOF, espectrometria de massa, identificação de microrganismos, bactérias. A pesquisa foi realizada entre julho de 2018 a novembro de 2018 e a revisão abordou trabalhos dos últimos 7-8 anos.

## Discussão

Em 1975 foi proposto por Anhalt e Fenselau, um estudo baseado em identificar bactérias através da detecção de biomarcadores combinado com métodos de pirólise e espectrometria



de massa para definição de espécies bacterianas patogênicas. Ao estudar as micromoléculas derivadas da liofilização, os pesquisadores conseguiram diferenciar alguns organismos.. Mais tarde nos anos oitenta a inclusão do método de ionização em espectrometria de massa propiciou a análise de macromoléculas biológicas (TANAKA *et al.*, 1988). Esse estudo recebeu o Prêmio Nobel de Química em 2002, que foi compartilhado com o engenheiro químico japonês Koichi Tanaka e o químico e professor americano John B. Fenn.

Alguns anos depois se entendeu que a espectrometria de massa aplicada em células bacterianas produzia espectros de proteínas características, e que conseguiria identificar a bactéria em gênero e espécie. Portanto foram desenvolvidos base de dados de espectros integrada a *softwares*, a qual permitiria a aplicação da espectrometria de massa no reconhecimento de proteínas de microrganismos (MALDONADO, ROBLEDO e ROBLEDO, 2018).

A introdução de novas tecnologias no laboratório de microbiologia clínica, como o MALDI TOF, tem como expectativa a automação do procedimento, a facilidade de uso e a complementação de testes existentes melhorando assim os resultados. O método permite analisar um grande número de isolados simultaneamente, e quando carregados no equipamento, às identificações podem ser feitas em um minuto, aumentando o rendimento e representando uma vantagem aos cuidados do paciente (GE MC *et al.*, 2016; TAN KE *et al.*, 2012).

A sigla MALDI-TOF significa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*, traduzido em Dissociação - Ionização a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo. Consiste em um método de automação bastante rápido e preciso na identificação de bactérias e fungos, que utiliza a técnica de espectrometria de massa (MS) a qual detecta moléculas de proteínas, identificando assim a estirpe (PASTERNAK, 2012).

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que determina a composição de cada componente de uma amostra, onde cada composto químico são ionizados, ou seja, são convertidos em íons e separados no espectrômetro de massas gerando moléculas carregadas e medindo sua relação massa-carga ( $m/z$ ), permitindo assim separar massas de proteínas, identificando e classificando microrganismos através de proteínas específicas (CUNHA *et al.*, 2006; ASSIS *et al.*, 2011).

Conforme a *Biomérieux*, 2017, empresa multinacional francesa de biotecnologia, a técnica consiste em pegar a colônia a ser examinada, com o auxílio de uma alça ou palito e fazer o *spot*, ou seja, inocular um pouco da colônia no *slide*, uma placa específica contendo poços numerados de 1 a 4, e de A a L. Se a amostra for bacteriana adiciona-se em cima do inóculo 1 uL de matriz  $\alpha$ -ciano-4- hidroxicinâmico ( $\alpha$  CHCA). Caso seja amostra de levedura, adiciona-se 0,5 uL de ácido fórmico, e após a secagem adiciona-se a matriz para a cristalização e, para então ser carregada no sistema *VITEK MS*, como é mostrado na figura 1.

O slide então é irradiado com um laser de nitrogênio que vaporiza a amostra ionizando as moléculas que serão aspiradas num tubo a vácuo e levadas a um detector. Dependendo da molécula, o tempo de chegada ao detector será diferente, por isso Tempo de Voo. Os dados obtidos irão gerar

picos diferentes resultando em um gráfico, onde cada espécie bacteriana ou leveduriforme tem seu gráfico específico. As leituras dos gráficos serão comparadas a uma base de dados computadorizada interpretando e fornecendo o nome do microrganismo em minutos (BENAGLI *et al.*, 2011).

O princípio básico do MALDI TOF MS consiste na mistura da colônia bacteriana com a matriz em uma lâmina específica, uma placa de metal condutora de energia, onde as moléculas da amostra são bombardeadas por feixes de energia e então ionizadas através da energia emitida, que se dá pela transferência de prótons da matriz, ou seja, é a matriz que fornece um próton para o processo de ionização. Ao mesmo tempo há a formação de um campo eletromagnético o qual irá desencadear um processo de dessorção, possibilitando desta forma a conversão da amostra do estado sólido para o estado gasoso (ASSIS, JULIANO e JULIANO, 2011).

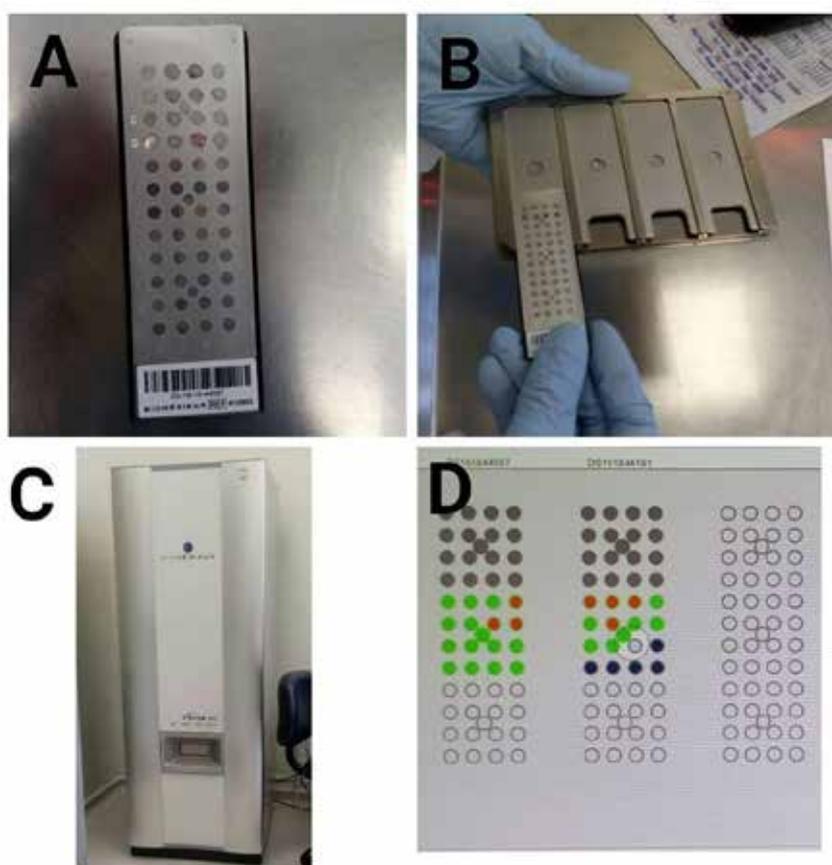


Figura 1: IMAGEM DO SLIDE SENDO CARREGADO NO EQUIPAMENTO. No slide acima se observa o inóculo com a bactéria (a) e após sendo carregado no equipamento (b), (c). A última imagem mostra como é visto no *software* no computador (d). Em cinza indica os inóculos sem amostra; em verde representa o inóculo onde o espectro foi adquirido e passou no controle de qualidade; em vermelho o inóculo foi adquirido, porém falhou no controle de qualidade. (Foto: O próprio autor, LACEN PR. BioMérieux, 2017).

A amostra então é acelerada dentro do tubo de vácuo (tubo de voo), e são separadas conforme sua massa molecular e sua carga até atingirem o detector, assim moléculas com tamanhos menores

percorrem mais rápido pelo tubo do que moléculas maiores como são representado na figura 2 (CUNHA, CASTRO e FONTES, 2006). Dessa forma as moléculas separadas formam espectros conforme sua razão massa-carga e picos que informa a quantidade de cada proteína gerando um gráfico de espectro MALDI TOF - MS que é comparado a um banco de dados. O espectro formado é característico de cada espécie microbiológica, desse modo diversos microrganismos exibem diferentes espectros de massa (GOULART e RESENDE, 2013; Biomérieux, 2017).

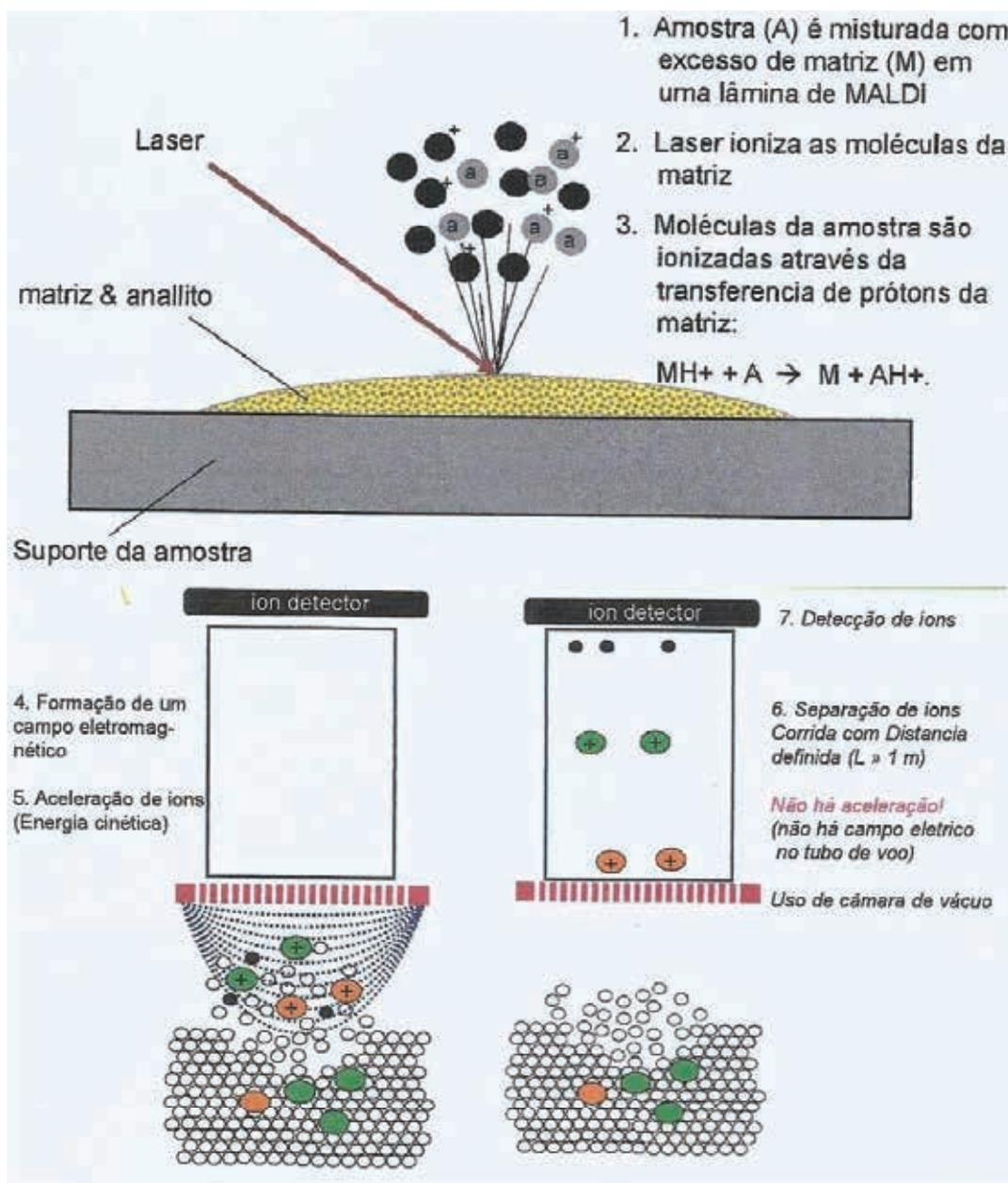


Figura 2: PRINCIPIO BÁSICO MALDI-TOF MS: Depois de inoculada a amostra no *slide* e inserido no equipamento Vitek MS, há a formação de um campo eletromagnético, a qual as moléculas são separadas conforme seu peso e então corridas na câmara de vácuo, para então ser detectadas no detector (BioMérieux, 2017).

Para o controle de qualidade positivo de bactérias utiliza-se cepas de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048<sup>TM</sup>, tendo como identificação esperada *Enterobacter aerogenes*. Já para leveduras usam-se cepas de *Candida glabrata* ATCC MYA-2950<sup>TM</sup>, identificando em *Candida glabrata*. A matriz sozinha é usada para controle negativo, e não deve apresentar identificação. Caso o controle negativo forneça uma identificação, é necessário limpar a superfície do slide e repetir o teste, conforme é declarado no Manual do Usuário Fluxos de Trabalho VITEK MS da BioMérieux, 2017.

Os testes fenotípicos possuem limitações, pois dependem de processos metabólicos dos microrganismos, que necessitam de um crescimento apropriado e tempo de incubação mínimo para conseguir resultados. Assim técnicas moleculares foram estabelecidas como métodos complementares, como sequenciamento de ácido ribonucleico ribossômico (RNA) e reações em cadeia da polimerase (PCR) e a implementação do MALDI-TOF permite a identificação de microrganismos através do estudo de proteínas, principalmente ribossomos em pouco tempo (MALDONADO, ROBLEDO e ROBLEDO, 2018).

A infecção na corrente sanguínea é uma das principais causas de enfermidade e mortalidade em pacientes instáveis, por isso a identificação rápida do microrganismo contribui para a escolha do medicamento apropriado para resultados eficazes. A hemocultura é o método que consiste em diagnosticar bacteremia, causada por uma diversidade de microrganismos, assim o diagnóstico propício é de intensa importância e com a inserção do MALDI-TOF o tempo de identificação reduz consideravelmente (BARBERINO *et al.*, 2017).

Analisando a coleta de um material e liberação de seu laudo o tempo é de grande importância para um resultado satisfatório, com isso novos métodos diagnósticos foram implantados para um melhor desempenho laboratorial, todavia alguns métodos são considerados restrito devido ao alto custo do equipamento. Em razão disto MALDI-TOF é considerado um método inovador na microbiologia clínica, pois identifica bactérias e fungos de forma rápida e precisa, pois em uma hemocultura positiva pode-se obter resultados em menos de duas horas, reduzindo custos e otimizando o uso precoce da medicação (BARBERINO *et al.*, 2017).

## Conclusão

A espectrometria de massa MALDI-TOF demonstrou ser um método rápido e preciso na identificação de microrganismos. O uso inovador desta tecnologia poderá substituir os métodos convencionais e demorados, tendo um melhor desempenho tanto para o biomédico no laboratório quanto para o paciente, o qual depende da liberação dos resultados. Portanto o papel do biomédico junto a um equipamento de automação, onde seus resultados são liberados em minutos, beneficiará o paciente, o laboratório e o médico.

Por ser uma tecnologia recente, ainda não está ao alcance de todos os laboratórios de microbiologia clínica, mas espera-se que logo este recurso possa estar presente na rotina de todos os laboratórios, em benefício dos pacientes.

## Referências

- ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, n. 2, v. 9, p. 344-355, 2011.
- BARBERINO, M. G.; SILVA, M. O.; ARRAES, A. C. P.; CORREIA, L. C.; MENDES, V. Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, n. 3, v. 21, p. 339-342, 2017.
- Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*. n.1, vol. 6, p. 1-7, 2011.
- BioMérieux Brasil S.A. Assessoria Científica. VITEK® MS Fluxos de trabalho Manual do usuário - Uso clínico. 2017.
- CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas – O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. n. 36, vol. 9, p.40-46, 2006.
- Ge MC, Kuo AJ, Liu KL, Wen YH, Chia JH, Chang PY, *et al.* Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Success rate, economic analysis, and clinical outcome. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. p. 1-7, 2016.
- GILBERT GREUB. Uso de MALDI-TOF para Diagnósticos de Infecções Microbianas. *Clinical Chemistry*. p. 1-9, 2013.
- GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. *Nanocell News*, n. 3, v.1, 2013. Disponível em: <<http://sbsc.org.br/nanocell/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>> Acesso em: 27 de agosto de 2018.
- MALDONADO, Natalia; ROBLEDO, Carlos; ROBLEDO, Jaime. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. n. 1, v. 22, p. 35-45, 2018.
- PASTERNAK, Jacyr. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. *Avanços Médicos – Einstein*. n. 1, v. 10, p. 118-119, 2012.
- Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective Evaluation of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System in a Hospital Clinical Microbiology Laboratory for Identification of Bacteria and Yeasts: a Bench-by-Bench Study for Assessing the Impact on Ti. *Journal of Clinical Microbiology*. No.10, vol. 50, p.3301-3308, 2012.
- TANAKA, K.; WAKI, H. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, No. 8, Vol. 2, p. 151-153, 1988.