

# MALDI-TOF: IMPORTÂNCIA E APLICABILIDADE NA MICROBIOLOGIA HOSPITALAR

Ariela Leal P. de Almeida<sup>1</sup>, Gabriela Oliveira Hezer Totola<sup>1</sup>, Jhully Pimentel<sup>1</sup>, Pedro Sousa de Almeida Júnior<sup>2</sup>.

1- Acadêmicos do curso de Biomedicina

2- Doutor em doenças infecciosas – Professor Multivix - Vitória

## RESUMO

Em menos de uma década, a espectrometria de massa por ionização com dessorção à laser assistido por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI-TOF MS) se destacou no diagnóstico clínico em diversos laboratórios nacionais e internacionais como parte integrante do fluxo de trabalho para identificação microbiológica. Visto que, os métodos clássicos requerem diferentes testes bioquímicos, exigindo um longo período de tempo durante o processo, além do fato que a metodologia pode não apresentar alto nível de sensibilidade para certos tipos de amostras. Em contrapartida, o MALDI-TOF MS oferece um sistema automatizado com alto rendimento, rapidez, economia, precisão e sensibilidade. Logo, a aplicação e importância do MALDI-TOF MS na microbiologia hospitalar é descrito nesta revisão partindo da principal funcionalidade dele que é a identificação e classificação de organismos patogênicos a partir de determinadas amostras biológicas, tais informações foram obtidas nas fontes do Scielo e PubMed desde de artigos do ano de 2001 até 2021.

**Palavras Chave:** MALDI-TOF, Clinical Microbiology, Antimicrobial resistance, Bacterial identification.

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios globais é a resistência aos antimicrobianos, que ameaça o sucesso de uma gama cada vez maior de tratamentos contra bactérias e outros patógenos. Logo, identificar esses microrganismos de maneira rápida e eficiente é uma das formas de auxiliar e melhorar o tratamento oferecido aos pacientes (WEIS, 2020).

O método convencional utilizado nos laboratórios de microbiologia para a fenotipagem e teste de sensibilidade desses microrganismos necessitam de, pelo menos, 48h para serem realizados (WEIS, 2020). Considerando pacientes em

estados de emergência hospitalar, esse intervalo pode ser um agravante a mais no quadro do mesmo.

O sistema do MALDI-TOF realiza o processo de identificação de bactérias, leveduras, neoplasias e fungos num curto período de tempo. Sendo assim, uma tecnologia rápida e confiável para a classificação e identificação de microrganismos, podendo ser aplicado em diagnósticos clínicos, pesquisa ambiental e taxonômica e até na qualidade de processamentos de alimentos. (MAIER, et al., 2006; RODRIGO et al., 2014).

Portanto, os conhecimentos proporcionados pelo MALDI-TOF têm se mostrado necessários para o desenvolvimento não somente dos laboratórios de microbiologia, mas especialmente para a saúde pública, pois poderá atuar no enfrentamento de determinadas doenças e, conseqüentemente, na melhora da qualidade e velocidade dos tratamentos, sendo um método que vem sendo adotado por laboratórios mundialmente (PATEL, 2015). Assim, esta revisão tem como objetivo abordar a importância e aplicabilidade da dessorção/ionização de laser assistida por matriz (MALDI) espectrometria de massa de tempo de voo (TOF/MS), nos laboratórios de microbiologia clínica, baseada principalmente em literaturas publicada em 2006-2021.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. HISTÓRICO**

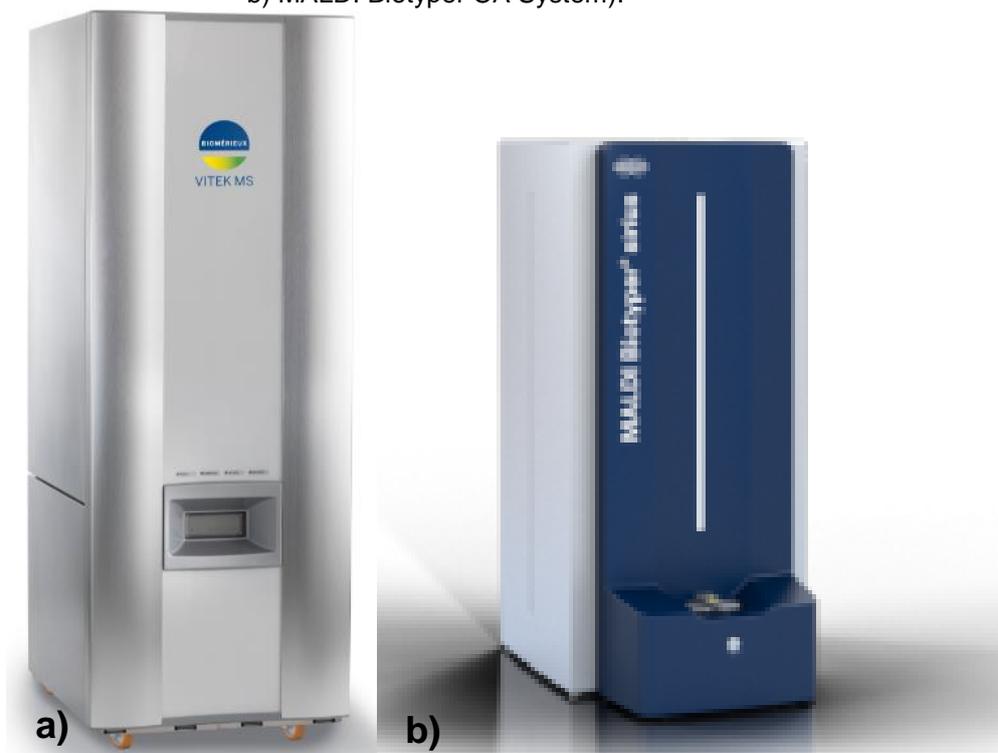
Primordialmente, a espectrometria de massa era usada em forma de pirólise, decomposição de matéria por calor, para caracterização dos microrganismos por Anhalt e Fenselau em 1975. Eles observaram que os espectros de massa foram produzidos a partir de extratos bacterianos de diferentes gêneros e espécies. Com o decorrer do tempo, na década de 80 foi possível analisar biomarcadores de proteínas maiores (BISWAS; ROLAIN, 2013; PATEL, 2015).

O PATEL (2015) relata que o Koichi Tanaka foi o primeiro a descrever a “ionização de método suave de dessorção” a partir de um pó de metal ultrafino e glicerol que permitiu a análise de espectrometria de massa de macromoléculas, fato esse que lhe garantiu o Prêmio Nobel em Química. Posteriormente outros métodos

foram desenvolvidos utilizando a espectrometria de massa utilizando uma matriz de compostos orgânicos, como observado nos estudos do Franz Hillenkamp e Michael Karas. A partir dos estudos deles o termo ionização de dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) foi aplicado (PATEL, 2015). Dessa forma, os avanços tecnológicos permitiram a criação do biobanco, no desenvolvimento de ferramentas de validação, registro de amostras e espectros de massa ofereceram a automação da MALDI-TOF MS associada a uma rotina de laboratório de microbiologia clínica (PATEL, 2015).

Logo, têm-se disponível no mercado, por exemplo, os sistemas VITEK® MS (bioMérieux Inc.) e o MALDI Biotyper CA System (Bruker Daltonics Inc.) (**Imagem 1**), os quais foram elaborados e possuem aprovação regulatória pela Food and Drug Administration (FDA), cada um dispõe de exclusividade, ou seja, existem particularidades como o software ou a escala de pontuação numérica que diferem um do outro, portanto, cabe ao laboratório escolher qual equipamento adequa-se mais a sua necessidade e objetivo, porém ambos são altamente eficientes e seguros (PATEL, 2015).

**Imagem 1.** Equipamentos disponíveis no mercado (a) VITEK® MS; b) MALDI Biotyper CA System).



**Fonte:** BIOMÉRIEUX [s.d.]; BRUKE, [s.d.].

## **2.2. IMPORTÂNCIA**

A espectrometria MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) atua captando impressões digitais espectrais de massa características, que são exclusivas de cada microrganismo, logo, é um método de identificação microbiológica confiável a nível de espécie e potencialmente usado para identificação de cepas (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012). O MALDI-TOF MS é uma tecnologia que apresenta um alto potencial para substituir integral ou parcialmente os testes fenotípicos convencionais para cepas bacterianas em laboratórios de microbiologia clínica (BISWAS; ROLAIN, 2013).

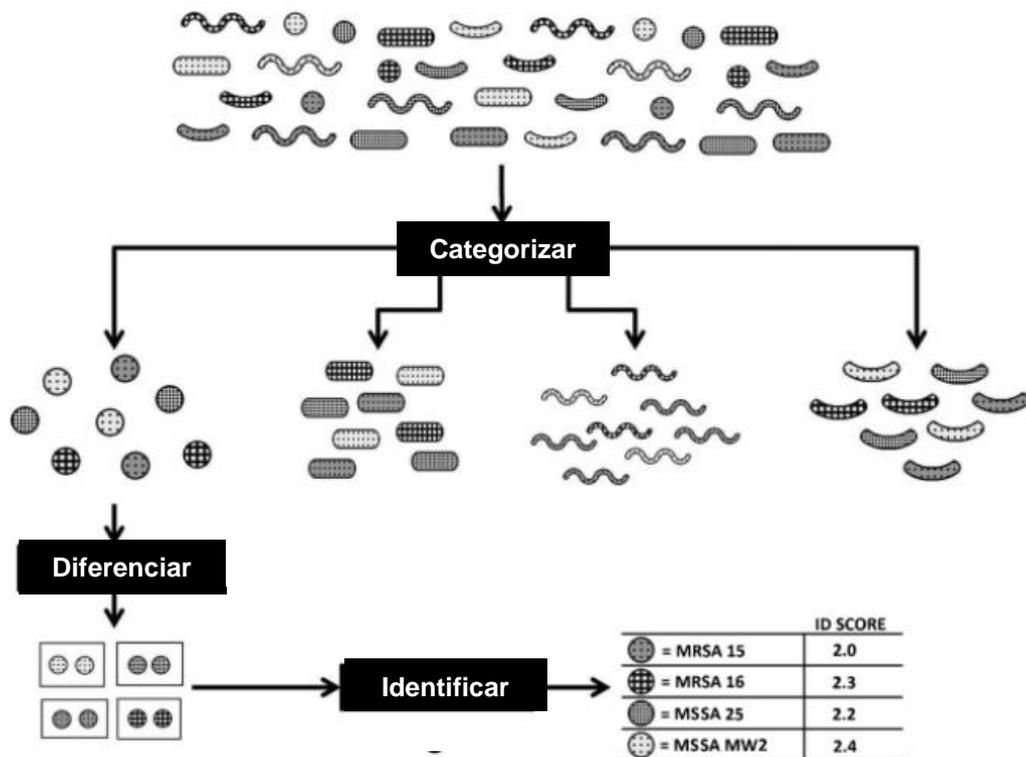
Os testes fenotípicos comumente usados na rotina de identificação bacteriana incluem cultura, coloração de Gram, características de crescimento, morfologia da colônia e testes bioquímicos. A identificação completa, usando esses métodos, requer um longo tempo para obter o diagnóstico, principalmente em casos de microrganismos fastidiosos. Tendo em vista que o processo para lidar com os microrganismos requer duas etapas básicas: crescimento e identificação, o MALDI-TOF pode acelerar a segunda etapa, contudo, se o crescimento da bactéria for lento, como é o caso de espécies de bactérias anaeróbicas presente em hemoculturas, isso afetará no tempo de identificação também. (BISWAS; ROLAIN, 2013; CARBONNELLE et al., 2011).

Segundo BISWAS e ROLAIN apud CHERKAOUI et al. (2013) o tempo médio nos métodos convencionais varia entre 48 e 72 horas, enquanto que o MALDI-TOF fornece o resultado em cerca de 6 minutos. Levando em consideração que, os resultados dependem do tipo de amostra a ser analisada e do objetivo da análise como identificação da espécie, identificação de proteínas e biotipagem (CHERKAOUI et al., 2010 apud BISWAS; ROLAIN, 2013).

O uso do equipamento será crucial para identificação do microrganismo, afinal ele irá determinar informações sobre virulência, resistência potencial a certos antimicrobianos e características do local da infecção. Isso graças ao padrão de sinal de massa algorítmica de análise, aplicando um referencial bacteriano e os padrões de massa de proteína podem ser usados para identificações posteriores para

diferentes cepas ou categorização de demais espécies (BISWAS; ROLAIN, 2013). Ou seja, partindo do princípio básico de categorização, diferenciação e identificação dos microrganismos (**Imagem 2**) (SANDRIN; GOLDSTEIN; SCHUMAKER, 2013).

**Imagem 2.** Representação dos princípios básicos do MALDI-TOF MS diante dos microrganismos.



Fonte: SANDRIN; GOLDSTEIN; SCHUMAKER, 2013.

Segundo TORRES-SANGIAO, LEAL RODRIGUEZ e GARCÍA-RIESTRA (2021), o MALDI-TOF MS já vem sendo usado em laboratórios para uma identificação mais rápida de microrganismos em emergências e pacientes internados, resultando em estadias hospitalares mais curtas, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTI) (TORRES-SANGIAO; LEAL RODRIGUEZ; GARCÍA-RIESTRA, 2021).

Além disso, o MALDI-TOF MS requer mínima preparação da amostra, porque grande quantidade pode interferir na leitura do analito (PAN et al., 2007), resultados rápidos e custos de reagente mínimos, identificação rápida diante de microrganismos de difícil cultivo, como bactérias anaeróbicas, micobactérias e archaea, achados clínicos raros e de difícil diagnóstico (BISWAS; ROLAIN, 2013).

Vale ressaltar que o protocolo diante de um paciente com suspeita de infecção microbiológica, comumente sendo infecção bacteriana, em primeiro plano é identificar o patógeno no local da infecção e posteriormente encontrar a melhor alternativa terapêutica, tendo consciência dos riscos de tal atitude (CARBONNELLE et al., 2011).

### **2.3. APLICABILIDADE**

No que tange a aplicação deste equipamento de forma mais popular, é que os efeitos de supressão entre as moléculas do analito ressurgem frequentemente durante a análise MALDI, especialmente em análise de misturas. Com isso, a possibilidade de supressão de sinal dos efeitos da análise aumenta a complexidade da amostra, nesse caso a preparação da amostra se torna essencial para que durante a leitura no equipamento ocorra observação separada dos componentes. Ademais, a presença de sódio e potássio em maiorias das amostras, elementos comumente encontrados em quaisquer células humanas, podem reduzir a sensibilidade do equipamento e interferir na leitura da amostra, gerando diferentes picos de aglomerados (PAN et al., 2007, TORRES-SANTIAGO, 2021).

No entanto, há maneiras de resolver essas problemáticas, primeiro é buscar matrizes ou aditivos de matriz adequados para melhorar e calibrar a sensibilidade de detecção do MALDI-TOF, a fim de aperfeiçoar a seletividade dos sinais de analitos alvo ou minimizar as alterações. E segundo seria desenvolver métodos de pré-tratamento que removem os contaminantes das amostras e favoreçam a análise de amostras vestigiais, com o objetivo de melhorar o resultado dos espectros de massa dos analitos em alvo (PAN et al., 2007).

Portanto, a principal aplicação de MALDI-TOF MS em laboratórios clínicos é na identificação clínica de microrganismos após o cultivo. A tecnologia permite a incorporação de novas espécies, revisões taxonômicas e expansão dos estudos microbiológicos, com aumento do fluxo de trabalho, desde a preparação da amostra até o gerenciamento de dados, logo terá mais automação no processo (WELKER et al., 2019).

O MALDI-TOF também pode atuar na pesquisa ambiental. Em SANTOS, HILDENBRAND e SCHUG (2016) apontam estudos que aplicaram o MALDI-TOF MS

para caracterização de microrganismos presentes em rizosferas de plantas. Nesse estudo foi possível elaborar um banco de dados com os perfis proteicos de 56 espécies, e partir dessas amostras foi possível isolar e reconhecer, alcançando uma eficácia de 100%. Logo, é notório observar a partir do estudo citado anteriormente e dentre outros realizados no ramo da microbiologia ambiental que o MALDI-TOF é uma ótima ferramenta para estudos envolvendo diversidade ecológica (SANTOS; HILDENBRAND; SCHUG, 2016). Segundo JANG e KIM (2018), foi mostrada a aplicabilidade dessa técnica em casos de biorremediação, ao conseguir isolar duas cepas bacterianas de amostras de lodo e esgoto, e monitoramento de rotina em estação de tratamento de água. No entanto, esta pode se apresentar sendo uma das áreas mais desafiadoras para sua aplicação, já que a quantidade de espécies presentes em amostras ambientais é bem maior do que as encontradas em amostras clínicas. Além de necessitar de um banco de dados de referência bem maior para aumentar a confiabilidade das identificações (JANG; KIM, 2018).

Além dessa aplicação, há estudos que comprovam a utilização do MALDI-TOF MS no estudo histológico, principalmente na detecção de marcadores tumorais e neoplásicos, dentre eles, para o câncer de mama, de próstata, de intestino, de ovário, de cérebro e linfomas. Isso acontece graças à análise direta do tecido, correlacionando os dados de espectrometria de massa com as características morfológicas do tecido (GOULART; REZENDE, 2013 apud FERREIRA, 2019).

Por fim, o mesmo também tem sido aplicado no diagnóstico de algumas doenças inflamatórias, como inflamações intestinais. Pois, há estudos das interações hospedeiro-patógeno visando a observação de novos marcadores de infecção, dentre outras possibilidades microbiológicas (FERREIRA, 2019).

### **2.3.1. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS**

Para a identificação das amostras bacterianas, é necessário que elas sejam cultivadas em meios de cultura sólidos, onde uma colônia é selecionada e espalhada, como um filme, em uma placa-alvo MALDI. É necessário acrescentar um solvente a esse esfregaço, que será capaz de extrair a maioria das proteínas bacterianas para a medição do MALDI-TOF. O tamanho e a sequência dessas proteínas ribossomais são bem específicas nas espécies, o que permite identificar e diferenciar as diferentes

cepas. É importante ressaltar, também, que a sensibilidade da técnica pode depender do tipo de amostra (HOU et al., 2019).

A identificação de fungos progride de forma mais lenta se comparada a identificação de bactérias, por serem organismos mais complexos e com diferentes fenótipos ao longo da vida, além da parede celular composta por quitina e outros polissacarídeos, que dificulta a lise (VRIONI et al., 2018). Além disso, são necessários alguns dias para se obter a maturidade fúngica, sendo esse atraso algo importante a ser levado em consideração, dada a mortalidade e morbidade em infecções causadas por fungos, principalmente em pacientes neutropênicos. Contudo, nos últimos anos algumas identificações de fungos se mostraram bem-sucedidas, principalmente com as espécies *Penicillium spp.*, *Trychophyton rubrum*, *Scytalidium dimidiatum*, que mostraram impressões espectrais distintas permitindo uma boa diferenciação entre as espécies. No entanto, até 2012, o MALDI-TOF era usado amplamente para identificação de leveduras (CROXATTO et al., 2012).

O uso do MALDI-TOF em vírus ainda é pouco explorado por conta do baixo nível de proteínas virais, alto peso molecular dessas proteínas e uma provável contaminação em células cultivadas in vitro por meio do transporte dos sedimentos do substrato celular. Entretanto, ainda é possível provar, segundo SINGHAL et al. (2015), a utilidade do equipamento para vírus como os da influenza, vírus do papiloma humano (HPV), vírus da herpes, vírus da hepatite e enterovírus. Sendo que, em sua maioria, os estudos que embasam essa informação, utilizaram o material genético viral amplificado por meio da PCR (Polymerase Chain Reaction). Além disso, o MALDI-TOF se provou um eficiente método de detecção múltipla para o vírus da herpes em diferentes amostras biológicas (SINGHAL et al., 2015).

Há também aplicação do MALDI-TOF MS como uma ferramenta na identificação de poliovírus humanos e biomarcador de proteínas virais em células afetadas. E os resultados demonstraram uma ferramenta eficaz, específica, sensível e barata para identificação dos três sorotipos de poliovírus do que quando comparado ao padrão-ouro da sorologia padrão que inclui a ELISA e técnica de vírus-neutralização (CALDERARO et al., 2014).

Outra aplicação interessante do MALDI-TOF MS está no diagnóstico de helmintos causados por nematódeos, cestódeos e trematódeos, infecções mais comuns em populações de baixa renda nas regiões dos trópicos e subtropicais (FERREIRA, 2019). Estudos de FEUCHEROLLES et al. (2019) mostram que esse método pode apresentar ótimos resultados para uma identificação rápida e direta de helmintos patogênicos em amostras biológicas humanas e animais (FEUCHEROLLES et al., 2019).

## **2.4. EQUIPAMENTO**

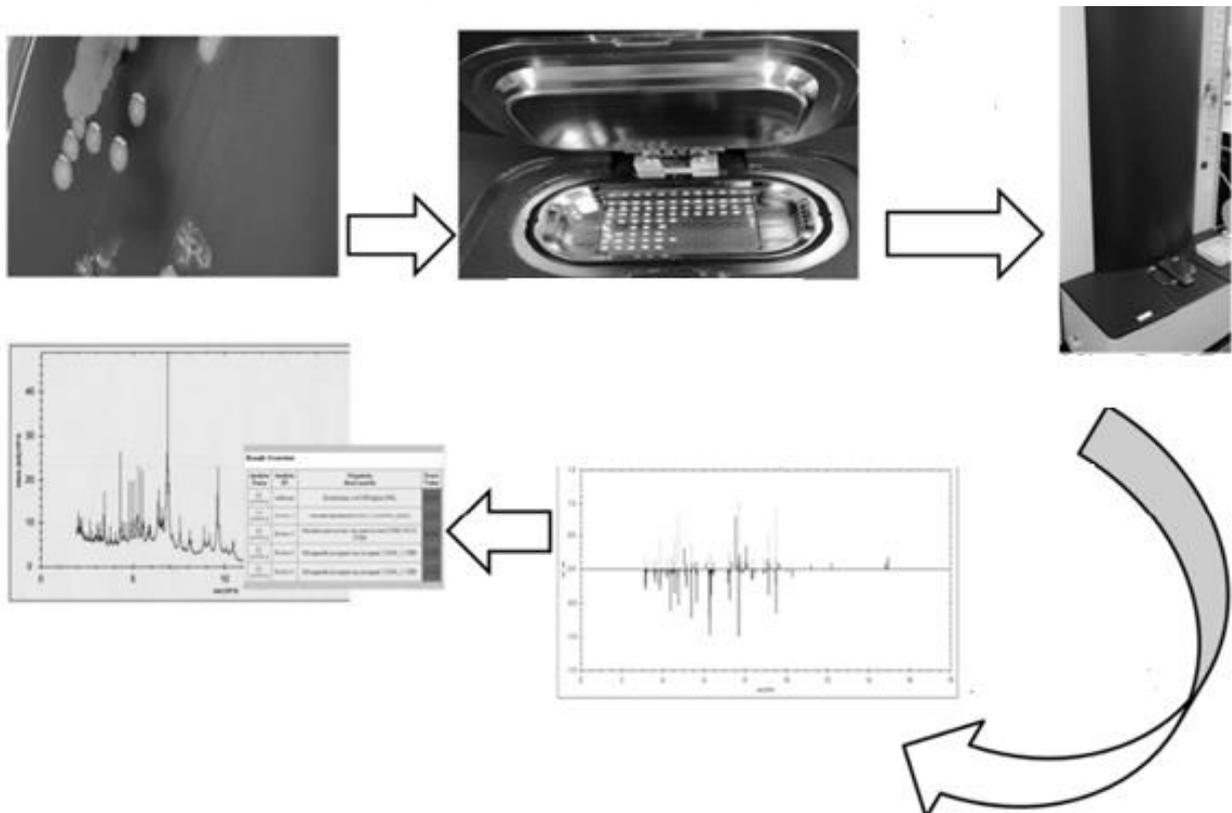
Um espectrômetro de massa é composto por três partes: uma fonte de íons para ionizar e transmitir as moléculas de íons da amostra numa fase gasosa, um analisador de massa que separa os íons de acordo com sua razão de massa-carga e um dispositivo de detecção para monitorar íons separados (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

Na análise MALDI, as amostras para serem analisadas são preparadas a partir de amostras misturadas com uma determinada matriz, dessa forma ocorre a cristalização das mesmas dentro desta matriz. A matriz é composta de pequenas moléculas de ácido que têm uma alta absorção óptica na faixa do comprimento de onda do laser utilizado. Já a composição da matriz varia de acordo com a biomolécula a ser analisada e o tipo de laser, sendo os mais frequentemente usados são ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido alpha-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), ácido sinapínico (SA), ácido ferúlico (FA) e ácido 2,4-hidroxifenilbenzóico. Sendo que, os FA, SA e CHCA têm se apresentado eficientes para a detecção de biomarcadores de proteínas, enquanto o DHB detectar melhor glicopeptídeos e glicoproteínas. Na parte de intensidade e tamanho dos picos moleculares detectados são relativos da matriz selecionada, o DHB e CHCA são ideias para quantificação de íons de massa menores, com até 10 kDa se for usado com o solvente adequado. Enquanto que o SA e FA mostraram serem melhores aplicados para quantificar íons de massa maiores, até 15 kDa, porém apresenta sensibilidade menor que CHCA (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

Considerando o MALDI Biotyper, para exemplificar seu funcionamento no dia a dia, seria o seguinte: (1) põem-se uma colônia na placa de amostra, a qual logo

após será exposta à radiação laser. Quando a matriz é adicionada e seca, a placa é inserida no equipamento. (2) A placa é então irradiada usando o laser, e as proteínas nas bactérias (principalmente proteínas ribossomais) são ionizadas; o tempo necessário para que essas proteínas ionizadas voem para o detector determina a razão massa-carga ( $m/z$ ) das proteínas componentes, e a intensidade do sinal fornece o espectro de massa (padrão). (3) O espectro de massa obtido é observado e comparado com os demais em um banco de dados de referência para identificar determinado microrganismo (**Imagem 3**) (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

**Imagem 3.** Processo de identificação por MALDI-TOF MS no MALDI Biotyper, a partir da técnica de coleta direta da colônia e transferida imediatamente para a placa alvo do MALDI, onde será adicionado 1  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico a 70% para identificar.



Fonte: TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020

No que diz respeito à identificação após a placa ser irradiada pelo laser, dentro de alguns minutos obtém-se um espectro característico denominada impressão digital de massa de peptídeo (PMF), de modo que cabe ao software MALDI-TOF MS comparar o padrão do PMF obtido com os demais PMFs armazenados em uma biblioteca extensa de referência (SINGHAL et al., 2015).

Ademais, a reprodutibilidade do espectro do MALDI-TOF, podem-se obter algumas variações de espectros referente a uma espécie, por causa das condições de cultura e parâmetros instrumentais, ao lidar com bactérias a título de exemplo, que estão em estágios diferentes de crescimento ou quando não é realizada a lise apropriada das cápsulas das mesmas, concernente terá uma liberação menor ou maior de proteínas, fato que influenciará na identificação daquela amostra (SANTOS; HILDENBRAND; SCHUG, 2016).

Ao obter e analisar um espectro diferente, deve-se atentar aos fatores externos os quais podem interferir no resultado, como, a calibração do equipamento, amostra insuficiente, a matriz que foi utilizada, as condições de crescimento, um adendo antes as micro placas precisavam serem higienizadas mecanicamente, mas agora os equipamentos já possuem as micro placas descartáveis, assim como também um ambiente empoeirado ou com temperaturas extremas influenciará na ação do laser, entre outras, após descartar tais possibilidades (CROXOATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

Faz-se necessário, portanto, não apenas a padronização tanto da fase pré-analítica quanto da fase analítica, mas também seguir corretamente as instruções e recomendações do fabricante, conseqüentemente respaldará os profissionais envolvidos e o resultado previsto será obtido com segurança (CROXOATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

## **2.5. VANTAGENS E DESVANTAGENS**

Como dito anteriormente, os métodos tradicionais microbiológicos, quando realizados adequadamente, apresentam resultados confiáveis. No entanto, esses tipos de métodos dependem dos metabolismos dos microrganismos durante o cultivo, podendo exigir longos períodos de incubação, sendo necessário para compensar o atraso dos testes uma liberação dos resultados rápido. Sendo que, na maioria das vezes os resultados podem ser inconclusivos (DE MELO, 2014). BARBOSA (2015) relata que o MALDI-TOF MS quando comparado aos métodos fenotípicos automatizados apresenta especificidade um pouco superior, com taxas de reconhecimento, na maioria das vezes acima de 95%. Tal fato é possível graças a metodologia do equipamento em detectar proteínas ribossomais, que são conservadas durante o procedimento e sofrem poucas modificações decorrente de

fatores externos. Todavia, o MALDI-TOF MS apresenta certa desvantagem em constatar espécies de perfil proteico semelhantes, como é o caso da *Escherichia coli* e *Shigella sp.*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus viridans*. Dessa forma, o MALDI-TOF MS não deve ser considerado como única metodologia de diagnosticar diante de espécies com caráter proteico semelhante, sendo importante um conhecimento prévio para possível situação à parte (BARBOSA, 2015).

Em contrapartida, os métodos microbiológicos atuais possuem diversas vantagens como redução do tempo para liberação do resultado, testes microbiológicos com qualidade melhor, risco de contaminação reduzido e processos de fabricação aperfeiçoados (DE MELO, 2014).

Vale destacar que, os métodos genotípicos detectam polimorfismo a nível de DNA ou enzimática, utilizando produtos de expressão dos genes para diferenciar os microrganismos. No que tange à identificação, ainda que automatizada, baseia-se nos mesmos princípios dos testes tradicionais de identificação e características fenotípicas (DE MELO, 2014).

Enquanto que, os métodos fenotípicos tradicionais determinam análises subjetivas, pois contempla a morfologia celular, coloração de Gram, reações bioquímicas como catalase, coagulase e oxidases, e padrões de fontes de carbono, sendo um processo de obtenção dos resultados demorado (DE MELO, 2014).

Em segundo plano a evolução na microbiologia destaca-se o uso de sistemas automatizados aplicados para tipagem ou sub-tipagem de microrganismos, a partir de aspectos fenotípicos e genotípicos. O MALDI-TOF produz resultados em menor tempo, pelo fato de estar associado com analisadores TOF com instrumentos que promovem a formação de íons por pulsos que é o MALDI (DE MELO, 2014).

Dado que, os sistemas automatizados usados de forma alternativa podem reduzir custos, aumentar a produtividade, eficiência e reduzir os riscos de contaminação. Porque esse tipo de equipamento, teoricamente, não apresenta limite de massa que será analisada, mantendo sempre a elevada resolução. Por esse motivo, principalmente, esta técnica vem sendo aplicada nas análises de materiais poliméricos de elevado peso molecular, derivado tanto de origem biomolecular como de origem sintética (DE MELO, 2014).

Na área da saúde humana, a aplicação de biotecnologia com o objetivo de agilizar a identificação de espécies patogênicas ou não patogênicas de microrganismos é de extrema importância para garantir a qualidade da saúde numa sociedade. Assim, o MALDI-TOF fornece um método rápido e sensível para a classificação microbiológica, apesar dos estudos sobre tal equipamento ainda serem limitados. Porém, tem se mostrado relevante e confiável diante do desenvolvimento laboratorial, além de apresentar resultados confiáveis para diferenciar uma diversidade de amostras de bactérias Gram negativas e positivas, cianobactérias, fungos e protozoários de distintos níveis taxonômicos (DE MELO, 2014).

No reconhecimento do microrganismo, a quantificação de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos são reconhecimentos de forma simultânea, gerando assim um espectro característico de cada espécie, gerando assim uma atualização constante do banco de dados, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados (DE MELO, 2014). Já foi comprovado que a exatidão obtida pelo MALDI-TOF foi superior quando comparado com testes bioquímicos automatizados ou outros métodos, cerca de 98 a 99% para as espécies analisada (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

Dessa forma, essa técnica é considerada um dos principais mecanismos analíticos na quantificação de proteínas, por causa da sua alta sensibilidade, exatidão e precisão. Tal princípio é baseado na “impressão digital do mapa peptídico”, relatado anteriormente, sendo bastante útil na identificação de espécies com genomas curtos e sequenciados completos. Todavia, a possibilidade de fracasso na identificação a partir desse método aumenta à medida que o número de registros banco de dados utilizado na busca se eleva. Pois, para proteínas isoladas de espécies cujo genoma não está sequenciado, necessita usar um banco de dados genéticos maior (DE MELO,2014).

O MALDI-TOF oferece a possibilidade de identificar patógenos de forma direta, como urina ou frascos de hemocultura positiva, sem a necessidade de crescimento de colônia, no entanto, a elevada concentração de proteínas presentes nessas amostras interferem na detecção de proteínas bacterianas e fúngicas específicas, sendo um obstáculo gerado nesse método. Além disso, quando há uma baixa concentração de microrganismo presente também dificulta a identificação. Sendo

necessário então a criação de protocolos de preparação das amostras para a extração de proteínas e remoção de substâncias que possam interferir na leitura, tornando o processo mais trabalhoso, com a inclusão de fases como centrifugação, lavagem, separação em gel e extração proteica (FERREIRA, 2019).

Apesar da desvantagem citada anteriormente, estudos comprovam bons resultados sobre identificação bacteriana em amostras de hemocultura e urina por meio do MALDI-TOF. MOUSSAOUI et al. (2010) desenvolveu a identificação bacteriana direta de frascos de hemocultura e obteve melhores resultados (91,1%) de microrganismos Gram negativos quando se comparado aos testes convencionais de coloração de Gram (89%) (MOUSSAOUI et al., 2010). Já BUCHAN, RIEBE e LEDEBOER (2012) o MALDI-TOF identificou corretamente 85,5% dos isolados diretamente presente nas hemoculturas, sendo 97,6% de compatibilidade ao nível de gênero e 94,1% a nível de espécie, quando se comparado aos testes convencionais (BUCHAN; RIEBE; LEDEBOER, 2012). Enquanto que no estudo de FERREIRA et al. (2010) o MALDI-TOF MS obteve da taxa de exatidão de 94,2% das amostras de urinas analisadas diretamente, onde a principalmente bactéria isolada foi *Escherichia Coli*, com a identificação correta de 92% a nível de espécie e 93% a nível de gênero.

Portanto, é notório que os resultados presentes nesses casos evidenciaram que a aplicabilidade do MALDI-TOF MS para identificação bacteriana pode ser utilizada de forma eficiente, com menor tempo, baixo custo de insumos e com acurácia elevada do que os métodos convencionais, principalmente em amostras de Gram negativas com UFC maior que  $10^5$ , mas também de leveduras e fungos filamentosos (FERREIRA et al., 2010; FERREIRA, 2019).

## **2.6. PERSPECTIVAS DO MALDI-TOF**

Segundo JANG e KIM (2018), o MALDI-TOF MS tem mudado a compreensão dentro da microbiologia clínica, por ter como perspectiva a atuação em crises de vigilância epidemiológica, auxiliando no reconhecimento precoce de surtos, programas de tratamento e análise de transmissão cruzada (JANG; KIM, 2018). Já que se torna claro dizer que o MALDI-TOF diminui consideravelmente o tempo que seria necessário para a identificação de agentes patogênicos. Além disso, demonstra alta eficácia em determinar a sensibilidade de antibióticos, assim como possui,

também, a vantagem de se conseguir testar isso de forma conjunta com a identificação do microrganismo, não sendo necessário testes separados (VRIONI et al., 2018).

Já a perspectiva gerada por PSAROULAKI (2018), em relação ao MALDI-TOF, é de que além da utilização em diagnósticos clínicos, sua aplicação poderá ser expandida dentro da área da agricultura também, auxiliando nos processos de segurança alimentar, ecologia e testes de qualidade. Contudo, ainda segundo PSAROULAKI (2018), é fundamental continuar aprimorando os softwares utilizados combinadamente com o MALDI-TOF, como já vem ocorrendo. Em 2018, alguns programas já estavam sendo utilizados para melhorar a tipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA, conseguindo diferenciar expressões de proteínas não ribossomais (PSAROULAKI, 2018).

É possível deduzir também que, logo consiga se realizar rotineiramente a identificação diretamente das amostras, já que em 2017, conseguiu-se identificar bactérias a partir de amostras de leite, sem que fosse necessário a realização de cultivo em meio de cultura, sendo a identificação realizada através da análise de proteínas ribossomais extraídas do leite a partir de um kit MALDI Sepsityper (JANG; KIM, 2018).

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O MALDI-TOF MS tem se apresentado como uma tecnologia emergente e muito promissora na identificação de microrganismos, pois é um método preciso, rápido, de custo baixo e rendimento alto. Dentro da microbiologia clínica hospitalar seria particularmente importante a implementação do mesmo na rotina, pois garantiria uma maior agilidade nas análises das amostras de pacientes internados, maior exatidão na prescrição de antimicrobianos e, conseqüentemente, diminuição do tempo de internação ou óbito, em alguns casos. Contudo, é importante ressaltar a contínua necessidade de atualização do banco de dados de referência no sistema do MALDI-TOF, para aumentar a precisão e confiabilidade na identificação dos microrganismos e suas características de resistência. É possível afirmar o alto potencial para a implementação dessa tecnologia na rotina laboratorial em um futuro próximo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, Diego Magno; JULIANO, Luiz; JULIANO, Maria Aparecida. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 344-355, 2011.

BARBOSA, Marcelo Pires. Vantagens e desvantagens de maldi-tof ms em relação aos métodos microbiológicos tradicionais, 2015.

BIOMÉRIEUX (Estados Unidos). **VITEK® MS: Saúde**. [S. l.]. [s.d.]. Disponível em: <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-ms-healthcare>. Acesso em: 9 nov. 2021.

BISWAS, Silpak; ROLAIN, Jean-Marc. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of microbiological methods*, v. 92, n. 1, p. 14-24, 2013.

BRUKER. **MALDI Biotyper® sirius CA System**. [S. l.]. [s.d.]. Disponível em: <https://www.bruker.com/pt/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification-for-clinical-laboratories-us-ivd/maldi-biotyper-sirius-ca-system-us-ivd.html>. Acesso em: 9 nov. 2021.

BUCHAN, B.; RIEBE, K.; LEDEBOER, A. 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*, v. 50, n. 2, p. 346-52, 2012.

CALDERARO, Adriana et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2014.

CARBONNELLE, Etienne et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 104-109, 2011.

CROXATTO, Antony; PROD'HOM, Guy; GREUB, Gilbert. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

DE MELO, Livia Freitas. A utilização da espectrometria de massa MALDI-TOF na identificação de microrganismos no controle de qualidade farmacêutico. 2014.

FERREIRA, Laura et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2110-2115, 2010.

FERREIRA, Marcio Martins Casaes. Espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) aplicada ao laboratório de microbiologia clínica: uma revisão bibliográfica, 2019.

FEUCHEROLLES, Maureen et al. MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2019.

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.

HOU, Tsung-Yun *et al.* Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. **Journal of food and drug analysis**, v. 27, n. 2, p. 404-414, 2019.

JANG, Kyoung-Soon; KIM, Young Hwan. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 209-216, 2018.

MAIER, Thomas et al. Fast and reliable maldi-tof ms–based microorganism identification. **Nature Methods**, v. 3, n. 4, p. i-ii, 2006.

MOUSSAOUI, W. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 11, p. 1631-1638, 2010.

PAN, Chensong et al. Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 387, n. 1, p. 193-204, 2007.

PATEL, Robin. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical chemistry*, v. 61, n. 1, p. 100-111, 2015.

PSAROULAKI, Anna; CHOCHLAKIS, Dimosthenis. Use of MALDI-TOF mass spectrometry in the battle against bacterial infectious diseases: recent achievements and future perspectives. **Expert review of proteomics**, v. 15, n. 7, p. 537-539, 2018.

RODRIGO, Miguel Angel Merlos et al. MALDI-TOF MS como ferramenta de diagnóstico de câncer em evolução: uma revisão. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** , v. 95, p. 245-255, 2014.

SANDRIN, Todd R.; GOLDSTEIN, Jason E.; SCHUMAKER, Stephanie. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. **Mass spectrometry reviews**, v. 32, n. 3, p. 188-217, 2013.

SANTOS, Inês C.; HILDENBRAND, Zacariah L.; SCHUG, Kevin A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, v. 141, n. 10, p. 2827-2837, 2016.

SINGHAL, Neelja et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 791, 2015.

TORRES-SANGIAO, Eva; LEAL RODRIGUEZ, Cristina; GARCÍA-RIESTRA, Carlos. Application and Perspectives of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1539, 2021.

TSUCHIDA S, UMEMURA H, NAKAYAMA T. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules*. 2020 Oct 17;25(20):4775. doi: 10.3390/molecules25204775. PMID: 33080897; PMCID: PMC7587594.

VRIONI, Georgia et al. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 12, 2018.

WEIS, Caroline V.; JUTZELER, Catherine R.; BORGWARDT, Karsten. Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, 2020.

WELKER, Martin et al. Uma atualização sobre a aplicação de rotina de MALDI-TOF MS em microbiologia clínica. **Revisão especializada de Proteomics** , v. 16, n. 8, pág. 695-710, 2019.