

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR MALDI-TOF MS

Laura Fernanda Ferri de Andrade (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ana Paula Ribeiro Rosa, Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça (Co-orientador), Erika Seki Kioshima (Orientador). E-mail: eskcotica@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia / Análises Toxicológicas

Palavras-chave: Espectrometria de massas; diagnóstico; fungos filamentosos

RESUMO

As doenças fúngicas estão cada vez mais inseridas na nossa realidade, estimativas dizem que mais de 3,8 milhões de brasileiros já sofreram com uma micose séria. O diagnóstico das doenças fúngicas necessitam de agilidade para dar início aos tratamentos, e atualmente as técnicas para identificação de fungos filamentosos ainda são morosas. Nesse sentido, técnicas que diminuam esse processo estão em destaque, incluindo o método MALDI-TOF MS que se baseia na identificação de microrganismos a partir da constituição proteica dos mesmos. Dessa forma, esse trabalho objetivou padronizar uma técnica para adequada extração de proteínas, para utilização na metodologia MALDI-TOF. Para isso, primeiramente foi realizado uma vasta identificação de protocolos na literatura, e escolheu-se extrair as proteínas através da utilização de ácido fórmico associado ou não à pérolas de vidro. Os testes foram realizados com dois isolados fúngicos frequentes na rotina laboratorial, sendo eles *Fusarium oxysporum* e *Trichophyton mentagrophytes*, pertencentes a micoteca do laboratório de Micologia Médica. Os resultados mostraram que o protocolo com a utilização de pérolas de vidro foi substancialmente capaz de extrair as proteínas dos isolados fúngicos, tendo resultado com identidade superior à 99% para ambos isolados testados. Assim, conclui-se que a qualidade da extração de proteínas é essencial para identificação pela metodologia MALDI-TOF, e a utilização de um agente físico para ruptura da parede e membrana celular parece ser essencial para o sucesso e identificação das proteínas.

INTRODUÇÃO

As doenças fúngicas tornaram-se uma das principais causas globais de morte, totalizando mais de 2 milhões de pessoas a cada ano, superando as vítimas da tuberculose e da malária. Nos últimos anos, infecções fúngicas invasivas graves (IFIs) vem ganhando espaço entre os pacientes críticos, especialmente as infecções da corrente sanguínea (ICS) em unidades de terapia intensiva (UTI) (Zeng et al. 2021). Por falta de diagnóstico seguro e precoce, o tratamento empírico tem sido instituído apesar do risco de não ser efetivo, tem sido responsável pela emergência de espécies resistentes às drogas usadas rotineiramente. Além disso, esses autores

mostraram que o retardamento na instituição do tratamento antifúngico adequado tem sido responsável pelo aumento da taxa de mortalidade dos pacientes. Assim, a identificação rápida e precisa destes agentes infecciosos é importante para o tratamento adequado, bem como para resguardar os dados epidemiológicos.

Entretanto, os métodos clássicos baseados em características fenotípicas apresentam várias limitações, incluindo inespecificidade e morosidade. O uso de técnicas moleculares tem proporcionado métodos mais específicos para identificar diferentes tipos de microrganismos, como fungos patogênicos com maior confiabilidade (Sarvestani et al., 2022). Entre os métodos disponíveis, o sequenciamento é padrão-ouro para identificação precisa das espécies dos fungos, apesar do custo elevado. Recentemente, o uso da espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) tem sido empregada para identificação rápida e precisa de fungos. O MALDI-TOF MS tem se apresentado como um substituto para métodos convencionais e dependentes de DNA para a identificação de fungos e bactérias (Bader et al., 2013).

Este método é baseado na detecção de proteínas com peso molecular entre 2 e 20 kDa, como marcadores bio-taxonômicos. As notáveis vantagens do método MALDI-TOF MS sobre os métodos genéticos e morfológicos são a simplicidade e o curto tempo para o preparo e análise de amostras. Além disso, meios rápidos e confiáveis de identificação do microrganismo são pré-requisitos para um tratamento eficaz. A identificação de organismos pela MALDI-TOF é baseada em padrões de proteínas característicos de um microrganismo em comparação a biblioteca de bancos de dados de espectros que aliás é o ponto crítico para o sucesso do sistema MALDI-TOF MS para identificar os organismos até o nível da espécie. Portanto este projeto visou a identificação de metodologia para eficaz extração de proteínas para utilização na metodologia de MALDI-TOF MS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Revisão da literatura

Para avaliação do melhor método para realização da técnica de MALDI-TOF, a coleta de dados foi realizada uma pesquisa online de artigos científicos nas bases de dados da – Scientific and Electronic Library Online (SciELO) e National Center for Biotechnology Information - NCBI, U.S. National Library of Medicine (PubMed).

Micro-organismos

Foi utilizado fungos armazenados no Setor de Micologia Médica do LEPAC, UEM, sendo a espécie *Trychopyton interdigitale* e *Fusarium oxysporum*, aprovados pelo comitê permanente de ética em pesquisa envolvendo seres humanos (COPEP), com parecer nº 615.643. Para os experimentos os fungos foram reativados em ágar batata.

Extração e Análise das proteínas por MALDI-TOF

Para cada fungo analisado foi utilizado dois eppendorfs com 300 microlitros de água MilliQ estéril e coletado o micélio fúngico por meio de swab. Em seguida foi realizada

o iniciado o protocolo de extração com 500µL de álcool etílico 100% e centrifugado por 3 minutos a 10.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 50 µL de ácido fórmico 70% e as pérolas de vidro, com ação do vórtex por 30 segundos. Por fim, foi adicionado a 100 µL de acetonitrila, centrifugado mais uma vez por 3 minutos a 3.400 rpm. Este foi denominado de protocolo 1, compilado após revisão de literatura. De forma comparativa, foi realizado o protocolo 2, que teve passos semelhantes com exceção à ausência de pérolas de vidro. Em *slide* próprio foi colocado 1 µL do sobrenadante da extração para cada fungo analisado, em no mínimo 6 poços. Após, foi adicionado matriz e enviado para análise no aparelho MALDI TOF, com resultados obtidos após análise no sistema de identificação microbiana de espectrometria de massa, Vitek® MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação na literatura mostrou que há uma variabilidade pequena entre os protocolos de extração de proteínas, utilizados para aplicação na metodologia de MALDI TOF. Entre os métodos para fungos filamentosos a maior diferença encontrada foi na utilização ou não de pérolas de vidro, como um agente físico para rompimento da membrana e parede celular fúngica. Os testes realizados neste estudo mostraram que a presença das pérolas de vidro parece ser essencial para a qualidade da extração de proteínas.

A							
Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)	
D1	8/17/23 7:00 PM	<i>Fusarium oxysporum</i> complex		99.9	Green		
C1	8/17/23 7:00 PM	<i>Fusarium oxysporum</i> complex		99.9	Green		
D2	8/17/23 7:00 PM	<i>Fusarium oxysporum</i> complex		99.9	Green		
B							
Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)	
C1	8/17/23 7:22 PM				Red	• [Q.301] Calibration spot: Incomplete identification for internal check or low discrimination	
D3	8/17/23 7:22 PM				Red	• [P.201] Sample spot: Bad spectrum during acquisition • [Q.301] Calibration spot: Incomplete identification for internal check or low discrimination	
C2	8/17/23 7:22 PM				Red	• [Q.301] Calibration spot: Incomplete identification for internal check or low discrimination	
C							
Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)	
A1	8/17/23 7:00 PM				Red	• [P.150] Sample spot: No identification	
A4	8/17/23 7:00 PM	<i>Trichophyton interdigitale</i>		99.9	Green		
A3	8/17/23 7:00 PM	<i>Trichophyton interdigitale</i>		99.9	Green		
D							
Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)	
B3	8/17/23 7:22 PM				Red	• [Q.301] Calibration spot: Incomplete identification for internal check or low discrimination	
B4	8/17/23 7:22 PM				Red	• [Q.301] Calibration spot: Incomplete identification for internal check or low discrimination	
B2	8/17/23 7:22 PM				Red	• [Q.301] Calibration spot: Incomplete identification for internal check or low discrimination	

Figura 1. Demonstração dos resultados da identificação dos isolados fúngicos obtidos após análise no sistema Vitek® MS. A e C representam o protocolo 1 e B e D o protocolo 2. A e B) Identificação de *Fusarium oxysporum* C e D) Identificação de *Trichophyton mentagrophytes* (*T. interdigitale*). Símbolos verdes: identificação com 99.9% de identidade. Símbolos vermelhos: não foi possível identificar por incompleta discriminação.

A figura 1, mostra de forma representativa os resultados obtidos após diversas análises por meio da análise no Vitek® MS. Esse sistema possui um banco de dados de proteínas que consegue identificar isolados microbianos, incluindo alguns agentes fúngicos. As espécies *Fusarium oxysporum* e *Trichophyton mentagrophytes* fazem parte desse banco de identificação. É preciso destacar que a espécie *T. mentagrophytes* faz parte de um complexo fúngico que inclui a espécie *T. interdigitale*, conforme identificado pelo MALDI TOF. De fato, somente por metodologias moleculares é possível fazer essa distinção. A análise micromorfológica somente identifica *T. mentagrophytes*.

A figura A e B mostram o resumo dos resultados para *F. oxysporum*. É possível observar que para o protocolo 1 (Figura 1A) houve completa identificação desta espécie, com 99.9% de identidade das proteínas em todos os poços analisados, enquanto no protocolo 2, (Figura 1B), não houve identificação. Para a espécie *T. mentagrophytes*, observamos comportamento semelhante, onde a figura 1C mostra que o protocolo 1 foi capaz de identificar esta espécie na maioria dos poços analisados, enquanto na figura 1B, foi possível observar que o protocolo 2 não foi eficiente.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a qualidade da extração de proteínas é essencial para identificação pela metodologia MALDI-TOF, e a utilização de um agente físico para ruptura da parede e membrana celular parece ser essencial para o sucesso e identificação das proteínas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq e ao laboratório de Micologia Médica da UEM.

REFERÊNCIAS

Zeng et al. **Strain Distribution and Drug Susceptibility of Invasive Fungal Infection in Clinical Patients with Systemic Internal Diseases.** Front Bioeng Biotechnol. 11;8: 625024. 2021.

Sarvestani et al. **Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of *staphylococcus aureus*.** Science Direct. Volume 68, 15, 149-155. 2022

Bader et al. **MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology.** Proteomics and Systems Biology. 2013