

MALDI-TOF MS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS, UM GRANDE DESAFIO

Milaine Martins Santana Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Isis Regina Grenier Capoci (Coorientador), Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador). E-mail: eskioshima@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Área e Subárea: Farmácia / Análise Toxicológica

Palavras-chave: Infecções fúngicas; diagnóstico laboratorial; diagnóstico molecular.

RESUMO

A pandemia de COVID-19 levantou novos desafios nos hospitais em relação a co-infecções fúngicas (candidemia, aspergilose, mucormicose). Na busca de um diagnóstico mais eficaz para as infecções fúngicas, o uso de técnicas moleculares tem proporcionado métodos mais específicos e com maior confiabilidade. A 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. Este método é baseado na detecção de proteínas com peso molecular entre 2 e 20 kDa, como marcadores bio-taxonômicos, sendo as principais vantagens a simplicidade e o curto tempo para o preparo e análise de amostras. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar pela técnica de MALDI-TOF MS, os isolados de fungos filamentosos do laboratório de Micologia Médica (LEPAC/UEM), utilizando a metodologia padrão e a técnica de extração de proteínas utilizando *beads* (pérolas de vidro), para comparar a performance da técnica em fungos dermatófitos e não dermatófitos (FFND). Os resultados da análise dos experimentos com o método de extração das proteínas ribossomais utilizando pérolas de vidro demonstrou não impactar significativamente na detecção dos isolados fúngicos testados, abrindo oportunidades para pesquisas futuras que explorem a eficácia do método MALDI-TOF MS em diferentes contextos e condições experimentais.

INTRODUÇÃO

As doenças fúngicas tornaram-se uma das principais causas globais de morte, totalizando mais de 2 milhões de pessoas a cada ano. A pandemia de COVID-19 levantou novos desafios nos hospitais (Phelan *et al.* 2020). O diagnóstico para as

micoses e o manejo correto das infecções fúngicas invasivas, inclui o aprimoramento das técnicas que permitam confirmar o envolvimento de fungos em processos infecciosos de maneira rápida e precisa para o tratamento adequado. 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 (Da Cunha *et al.* 2018). 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. Assim, o objetivo deste projeto foi identificar fungos filamentosos isolados do laboratório de Micologia Médica (LEPAC/UEM) pela técnica de MALDI-TOF MS, comparando, especificamente, o desempenho da técnica na identificação de dermatófitos e fungos filamentosos não dermatófitos (FFND).

MATERIAIS E MÉTODOS

Identificação por meio da metodologia MALDI-TOF MS

Foram utilizados fungos dermatófitos e FFND isolados de pacientes atendidos no Setor de Micologia Médica do LEPAC/ UEM, armazenados na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica.

Para realização dos testes de identificação dos isolados fúngicos, extraiu-se proteínas ribossomais de colônias fúngicas com raio > 4 cm, cultivadas em PDA (ágar batata), pelo método de extração utilizando *beads* (pérolas de vidro). A técnica transcorreu da seguinte maneira: adicionou-se 300uL de água esterilizada em Eppendorfs identificados. Em seguida, utilizou-se um *swab*, previamente umedecido em um tubo Falcon, contendo água esterilizada, para coleta da amostra. Depois, adicionou-se 900uL de álcool etílico e centrifugou-se a 10.000 rpm por 3 minutos. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 50uL de ácido fórmico 70% e 2 pérolas de vidro, seguido de 60 segundos de agitação em vórtex. Logo depois, adicionou-se 50uL de acetonitrila ao eppendorf, sendo novamente agitado por 60 segundos. Após centrifugação adicional a 3400 rpm por 3 minutos, pipetou-se 1uL da amostra em poços do slide e deixou-se secar a temperatura ambiente.

Logo após o processo de extração, adicionou-se 1 µL de solução matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (bioMérieux), aguardando a secagem em temperatura ambiente. Em seguida, registrou-se o slide na Base de Dados VITEK MS e enviou-se em embalagem para processamento no espectrômetro de massas (MALDI-TOF MS) presente no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) em São José dos Pinhais-PR. Por fim, avaliou-se os resultados por meio do *software* Mylla®, no laboratório de micologia médica no LEPAC-UEM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação da *performance* da técnica de extração de proteínas utilizando *beads* testou-se cepas dos fungos dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporium gypseum*. Em cada amostra realizou-se experimentos de identificação com e sem a utilização das pérolas de vidro, a fim de comparar a eficácia da técnica. Para as amostras de *Trichophyton rubrum*, a presença de pérola resultou em 6 poços com 99,9% de confiança, enquanto a amostra sem pérola apresentou 8 poços com a mesma confiabilidade, indicando que a adição das pérolas não melhorou a detecção. Para *Microsporium canis* e *Trichophyton mentagrophytes*, tanto com pérola quanto sem, obteve-se resultados com alta confiabilidade em todos os poços analisados, sugerindo que a presença das pérolas não alterou a eficácia da detecção desses fungos. Em *Microsporium gypseum*, a adição das pérolas resultou em alta confiabilidade apenas em 2 poços, sendo que a amostra sem pérola apresentou resultados mais confiáveis em 6 poços. Dessa forma, para os fungos dermatófitos, os resultados mostraram que houve melhor detecção sem adição das pérolas de vidro nos diferentes fungos testados (Tabela 1).

Tabela 1 Resultados obtidos na identificação de fungos dermatófitos por MALDI-TOF MS pela utilização do método de extração de proteínas com e sem pérolas de vidro.

FUNGOS	COM PÉROLA	SEM PÉROLA	RESULTADO
<i>T. rubrum</i>	6 poços (99.9%)	8 poços (99.9%)	melhor detecção sem pérolas
<i>M. canis</i>	8 poços (99.9%)	8 poços (99.9%)	sem efeito significativo
<i>T. mentagrophytes</i>	1 poço (99.9%)	8 poços (99.9%)	melhor detecção sem pérolas
<i>M. gypseum</i>	2 poços (99.9%)	6 poços (99.9%)	melhor detecção sem pérolas

Entre os fungos filamentosos não dermatófitos, foram testadas cepas de *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus flavus*. Para as duas amostras analisadas, as pérolas não tiveram efeito significativo, uma vez que a confiabilidade dos resultados foi idêntica em ambos os métodos, com 8 poços apresentando 99,9% de confiança, mantendo um desempenho consistente com e sem o aditivo (Tabela 2). Ning *et al.* (2021) utilizou o método com pérolas de vidro e também não teve um resultado tão mais significativo do que o método de extração rotineiro.

Tabela 2 Resultados obtidos na identificação de fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) por MALDI-TOF MS pela utilização do método de extração de proteínas com e sem pérolas de vidro.

FUNGOS	COM PÉROLA	SEM PÉROLA	RESULTADO
<i>F. oxysporum</i>	8 poços (99.9%)	8 poços (99.9%)	sem efeito significativo
<i>A. flavus</i>	8 poços (99.9%)	8 poços (99.9%)	sem efeito significativo

CONCLUSÕES

A presença de pérolas de vidro não demonstra um impacto significativo na detecção de dermatófitos e FFND. É importante reconhecer as limitações inerentes a este estudo, com a realização de testes com uma gama mais ampla de espécies fúngicas para confirmar a generalização desses resultados, abrindo oportunidades para pesquisas futuras.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e às agências de fomento à educação - CNPq e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

DA CUNHA, K. C. *et al.* Fast identification of dermatophytes by MALDI-TOF/MS using direct transfer of fungal cells on ground steel target plates. **Mycoses**, v. 61, n. 9, p. 691–697, 2018. doi:10.1111/myc.12793. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29762871/>. Acesso em: 04 set. 2024.

NING, Y.-T. *et al.* Developing Two Rapid Protein Extraction Methods Using Focused-Ultrasonication and Zirconia-Silica Beads for Filamentous Fungi Identification by MALDI-TOF MS. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 6 Jul. 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.687240. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34295837/>. Acesso em: 05 set. 2024.

PHELAN, A. L.; KATZ, R.; GOSTIN, L. O. The Novel Coronavirus Originating in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 8, 30 jan. 2020. doi: 10.1001/jama.2020.1097. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31999307/>. Acesso em: 04 set. 2024.