

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

LÍVIA FREITAS DE MELO

**A UTILIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA
MALDI-TOF NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS
NO CONTROLE DE QUALIDADE FARMACÊUTICO**

BELO HORIZONTE – MG

2014

LÍVIA FREITAS DE MELO

**A UTILIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA
MALDI-TOF NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS
NO CONTROLE DE QUALIDADE FARMACÊUTICO**

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de Minas
Gerais, como pré-requisito para obtenção do
título de Especialista em Microbiologia Industrial
e Ambiental.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Regina Maria Nardi
Drummond

BELO HORIZONTE – MG

2014

LÍVIA FREITAS DE MELO

**A UTILIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS
MALDI-TOF NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS
NO CONTROLE DE QUALIDADE FARMACÊUTICO**

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito
para obtenção do título de Especialista em Microbiologia
Industrial e Ambiental pela Universidade Federal de Minas
Gerais- MG.

Orientadora: Regina Maria Nardi Drummond

Data de aprovação: ____ de _____ de 20__.

Profa. Dra. Regina Maria Nardi Drummond

UFMG-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos

UFMG-MG

Assinatura:

Belo Horizonte – MG

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Elenici Freitas Gomes de Melo e Maurício Teodoro de Melo, que sempre me apoiaram e aos quais devo tudo que sou.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, por ter me dado força, coragem e determinação durante esta caminhada.

Aos meus pais, Elenici Freitas Gomes de Melo e Maurício Teodoro de Melo, pela educação que me deram e por me apoiarem nas minhas escolhas, sempre me desejando o melhor. A vocês que nunca deixaram de acreditar no meu sucesso, muito obrigada.

À professora Dra. Regina Maria Nardi Drummond, pela orientação e conhecimento transmitido durante a concretização deste trabalho.

Aos professores do curso de Especialização em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, que contribuíram para a minha formação, aperfeiçoaram meu conhecimento na área e que também acrescentaram informações importantes ao longo do ano.

Ao Gilberto, pela paciência, compreensão e palavras de carinho.

Aos meus amigos do curso de Especialização em Microbiologia, pela rica troca de experiências e pela valiosa amizade que surgiu entre nós.

Aos meus colegas de trabalho, pelas palavras sempre incentivadoras.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

RESUMO

No processo de fabricação de medicamentos é uma exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a qualidade de produtos para garantir sua eficiência e segurança. A implantação das normas de boas práticas de fabricação (BPF) e o controle de qualidade são requeridos para manutenção da integridade do produto e proteção do usuário. Métodos analíticos confiáveis, rápidos e exatos são importantes para garantir um resultado seguro, atender a demanda de análises microbiológicas e também à pressão constante de aperfeiçoamento de técnicas que diminuem os custos e o tempo para conclusão das etapas de produção de uma indústria farmacêutica. A espectrometria de massa está se tornando, cada vez mais, uma importante ferramenta analítica dentro da microbiologia. Nos últimos anos, essa ferramenta tem sido utilizada na identificação e classificação de microrganismos, aperfeiçoando o processo de monitoramento do nível de contaminação e a diversidade microbiana nas áreas de produção, na matéria-prima e no produto final. Neste trabalho, foi realizada uma revisão bibliográfica que demonstrou como a espectrometria de massa MALDI-TOF é aplicada na identificação de microrganismos na indústria farmacêutica por meio dos princípios teóricos, da metodologia e as vantagens e desvantagens da técnica, e também a comparação com resultados já obtidos com isolados ambientais e clínicos.

Palavras chave: identificação de microrganismos, espectrometria de massa, controle de qualidade.

ABSTRACT

In drug manufacturing process is a requirement of the National Health Vigilance Agency (ANVISA) the quality of products to ensure their effectiveness and safety. The implementation of standards of good manufacturing practices (GMP) and quality control of products are required to maintain the integrity of the product and user protection. Fast reliable analytical methods, accurate and are important to ensure a safe outcome, meet demand for microbiological analysis and also the constant pressure to improve techniques that reduce costs and time to completion of stages of production of a pharmaceutical industry. Mass spectrometry has increasingly become an important analytical tool in microbiology. In recent years, this tool has been used to identify and classify of microorganisms, improving the process of monitoring the level of contamination and microbial diversity in the areas of production, raw material and final product. In this work , was demonstrated how mass spectrometry MALDI - TOF is applied in the identification of microorganisms in the pharmaceutical industry through the theoretical principles, methodology and the advantages and disadvantages of the technique, and also compared to results obtained with environmental and clinical isolates.

Keywords: identification of microorganisms, mass spectrometry, quality control

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	JUSTIFICATIVA.....	12
3.	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivos gerais.....	14
3.2	Objetivos específicos.....	14
4.	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
4.1	Controle de Qualidade Microbiológico na Indústria Farmacêutica.....	15
4.2	Métodos Convencionais e Alternativos de Identificação Microbiana.....	18
4.3	Espectrometria de Massa.....	20
4.4	MALDI- TOF MS	22
4.5	Analisador de massa TOF	26
5.	DISCUSSÃO.....	28
6.	CONCLUSÃO	36
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos constitui um dos atributos essenciais para o seu desempenho adequado, pois falhas neste aspecto podem comprometer a estabilidade, inativação de princípios ativos e excipientes da formulação, ocasionando graves consequências em relação à segurança, eficácia terapêutica e aceitabilidade (YAMAMOTO et al., 2004).

Para garantir um resultado seguro e atender toda a demanda de análises microbiológicas de uma indústria farmacêutica, o microbiologista deve dispor de métodos analíticos confiáveis e exatos, que permitam a enumeração e identificação de microrganismos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Os métodos microbiológicos tradicionais, quando corretamente implementados, são capazes de fornecer as informações exigidas para garantir a manutenção das boas práticas de fabricação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). No entanto, como estes métodos dependem de processos metabólicos dos microrganismos cujos resultados podem exigir longos períodos de incubação dos testes microbiológicos escolhidos, acabam sendo limitantes na liberação rápida dos resultados. Além disso, muitas vezes estes resultados podem ser inconclusivos (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

Os avanços em meios de cultivo e miniaturização permitiram evolução na análise de bactérias e fungos isolados de produtos, excipientes e monitoramento ambiental. Novos métodos de identificação apresentam como vantagens a redução do tempo total para liberação do produto, melhoria da qualidade dos testes microbiológicos, potencial redução do risco de contaminação microbiana dos produtos e melhorias nos processos de fabricação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Existem muitos sistemas automatizados destinados à tipagem ou sub-tipagem de microrganismos, envolvendo métodos classificados em fenotípicos e genotípicos. As características fenotípicas clássicas de identificação compreendem características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (VANDAMME et al., 1996). Os métodos genotípicos detectam polimorfismos ao nível dos ácidos nucleicos, ou variação alélica ao nível de enzimas. Utilizam os produtos de expressão dos genes para distinguir os

diversos microrganismos (PACHECO, 2009). Os métodos de identificação, ainda que miniaturizados e automatizados, baseiam-se em princípios similares as provas de identificação tradicionais e características fenotípicas (FERREIRA et al., 2010).

Métodos fenotípicos tradicionais envolvem meios de determinação mais subjetivos como morfologia celular, coloração de Gram, reações bioquímicas como catalase, coagulase, oxidase, e também, padrões de utilização de fontes de carbono, possuindo algumas desvantagens na identificação precisa e rápida dos microrganismos. A tabela 1 mostra algumas características fenotípicas usadas na identificação de microrganismos.

Tabela 1. Características fenotípicas que podem ser empregadas na identificação microbiana

Categorias	Características
Cultura	Morfologia da colônia, cor e tamanho da colônia, produção de pigmentos
Morfológicas	Morfologia celular, tamanho das células, tipo de flagelos, material de reserva, coloração de Gram, de esporos e de bacilos álcool-ácido resistentes
Fisiológicas	Tolerância ao oxigênio, faixa de pH, temperatura ótima de crescimento e halófilas
Bioquímicas	Utilização de fontes de carbono, oxidação ou fermentação de carboidratos, padrões de enzimas
Sorológicas	Aglutinação
Inibição	Biletolerância, resistência a antibióticos
Quimiotaxonômica	Perfis de ácidos graxos, toxinas e toda composição celular

Fonte: Adaptado de SUTTON; CUNDELL, 2004.

Tecnologias baseadas na identificação por métodos fenotípicos são comercializadas por várias empresas como kits pré-embalados com procedimentos de controle de qualidade bem estabelecidos e instrumentação madura com extensas bases de dados para identificar a maioria dos microrganismos normalmente encontrados na indústria farmacêutica. Além disso, suas tecnologias subjacentes são familiares para microbiologistas em grandes e pequenas empresas farmacêuticas (SUTTON; CUNDELL, 2004).

Entre os sistemas miniaturizados e automatizados de identificação fenotípica destacam-se as Galerias API[®], Vitek[®] e Omnilog ID[®] que possuem como base reações bioquímicas. Métodos quimiotaxômicos como a cromatografia gasosa de ácidos graxos celulares e a espectrometria de massa (*Mass Spectrometry* - MS) têm sido usados na identificação de microrganismos. A primeira metodologia detecta e quantifica os ácidos graxos totais do microrganismo como ésteres metílicos de ácidos graxos

(FAME), sigla do inglês *fatty acid methyl ester*, um sistema analítico automatizado de cromatografia gasosa para análise de perfil de ácidos graxos. Os perfis cromatográficos são comparados àqueles contidos no *software* de identificação microbiana Sherlock® (LAY, 2001; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). Perfis de ácidos graxos microbianos são únicos de uma espécie para outra, e isto permitiu a criação de extensas bibliotecas microbianas. As atuais bibliotecas Sherlock® têm mais de 1.500 espécies de bactérias, além de 200 espécies de fungos. Uma combinação de características torna o sistema atrativo para uso no controle de qualidade farmacêutica. Esses recursos incluem identificações precisas, grandes bibliotecas ambientais e um alto rendimento (KUNITSKY; OSTERHOUT; SASSER, 2006).

A segunda metodologia (MS), especificamente aquela baseada na Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser – MALDI-TOF, sigla do inglês *Matrix-Assited LaserDesorption Ionization-Time of Flight*), utiliza células bacterianas inteiras, lisados celulares ou extratos bacterianos nos quais biomarcadores moleculares, geralmente peptídeos ou proteínas ribossômicas são detectados (LAY, 2001; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). Além de produzirem resultados em menor tempo, esses sistemas alternativos podem reduzir custos e aumentar a produtividade e eficiência, demonstrando seus benefícios para indústria a farmacêutica.

Em contraste, as tecnologias envolvendo métodos genotípicos não estão bem estabelecidas e são mais adequados para um ambiente de pesquisa (CARBONELLE et al., 2011). A tecnologia baseada em DNA para a identificação de bactérias normalmente utiliza apenas o gene de rRNA 16S como base para identificação. Esta técnica tem a vantagem de ser capaz de identificar linhagens de difícil cultivo. Alguns problemas com a tecnologia de rRNA 16S são requerer um elevado nível de competência técnica, custos de equipamentos e materiais elevados. Como resultado, a tecnologia não é adequada para análise de rotina no laboratório de controle de qualidade (KUNITSKY; OSTERHOUT; SASSER, 2006). Além disso, a tecnologia é desconhecida para a maioria dos laboratórios farmacêuticos, e os testes podem estar sujeitos à contaminação do ácido nucleico, se não forem executados em um ambiente com controle adequado (CARBONELLE et al., 2011).

A identificação rápida das espécies patogênicas e não patogênicas de microrganismos é de grande importância para a área da saúde humana, aplicações em biotecnologia e a

indústria farmacêutica. A MS é um método rápido e sensível para identificação e tipificação de microrganismos. Embora o número de estudos ainda seja limitado, a MS tem se mostrado confiável para diferenciar uma enorme variedade de bactérias Gram negativas e Gram positivas, cianobactérias, fungos e protozoários em diferentes níveis taxonômicos (BARREIRO, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Na indústria farmacêutica, a qualidade do produto final é influenciada, principalmente, pela carga microbiana original ou adquirida durante o processo. Microrganismos encontrados em insumos farmacêuticos, na água ou no ambiente, devem ser identificados, especialmente se os números excederem os níveis de alerta e/ou ação, ou quando encontrados em produtos estéreis.

A maioria dos microrganismos contaminantes de um produto farmacêutico pode representar uma preocupação para a indústria, principalmente se este for um agente etiológico de doenças contagiosas, ou se a sua presença comprometer a estabilidade e eficácia do produto (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011). Além disso, há uma pressão do mercado e exigências regulatórias mais rígidas para que a indústria farmacêutica reavalie seus processos e aplique novos métodos microbiológicos mais rápidos e automatizados (PACHECO, 2009).

Devido ao longo período de duração e fatores que influenciam o crescimento do microrganismo, os métodos microbiológicos tradicionais foram substituídos gradualmente por novas técnicas de identificação, na tentativa de agilizar os resultados, diminuir os custos e chegar a identificações mais detalhadas que os obtidos pelos métodos convencionais ainda não respondem (PACHECO, 2009).

Existem vários métodos de identificação, todos eles apresentando vantagens e desvantagens. Um sistema ideal é aquele que contém um número mínimo de características, como por exemplo, ter uma capacidade de identificação universal, um baixo custo, propiciar o compartilhamento das informações através de bancos de dados que devem ser acessíveis e passíveis de atualizações regularmente e possibilitar a identificação de diferentes fontes (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

As tecnologias baseadas em componentes celulares proporcionam um alto grau de especificidade que pode conduzir a resultados rápidos. Porém esses métodos podem apresentar algumas desvantagens como a possível necessidade de elevado número de células para alguns tipos de testes, necessidade de grandes bases de dados e mudança ao tratar microrganismos (entidades bioquímicas) como substâncias químicas (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). Um problema com a maioria dos sistemas de ensaios

bioquímicos, no entanto, é que estes sistemas são voltados para o mercado clínico, e, como resultado, são limitados no número de espécies ambientais que podem identificar (KUNITSKY; OSTERHOUT; SASSER, 2006).

A implementação dos métodos alternativos ainda é restrita, pois a indústria farmacêutica é um ambiente altamente regulado. Portanto, para auxiliar nos processos de validação de sistemas e equipamentos, é importante o estudo das implicações e princípios dos métodos alternativos para assegurar sua confiabilidade (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

A credibilidade de uma empresa é diretamente proporcional à qualidade agregada ao seu produto final. Tendo em vista os benefícios na agilidade para liberação de resultados, redução de custos, aumento da produtividade e eficiência, a aplicação de novas metodologias rápidas e automatizadas se apresenta como grande aliada na indústria farmacêutica, atendendo as demandas do mercado e as exigências regulatórias, após serem validadas.

Devido à exigência atual de adoção de testes rápidos na identificação de microrganismos, o objetivo deste trabalho é demonstrar a importância da utilização dos métodos microbiológicos fenotípicos rápidos e automatizados em indústrias farmacêuticas, em destaque a técnica de análise por espectrometria de massa MALDI-TOF, de forma a subsidiar o desenvolvimento de trabalhos experimentais futuros e sua implementação na indústria.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Realizar revisão bibliográfica dos métodos fenotípicos rápidos automatizados, com ênfase em espectrometria de massa MALDI-TOF.

3.2 Objetivos específicos

Pesquisar sobre as aplicações e princípios dos métodos de identificação fenotípicos rápidos e automatizados;

Apresentar as vantagens e desvantagens do método de análise por espectrometria de massa MALDI-TOF em relação aos métodos tradicionais de identificação de microrganismos;

Descrever a aplicabilidade desse método no controle de qualidade da indústria farmacêutica.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Controle de Qualidade Microbiológico na Indústria Farmacêutica

A indústria farmacêutica vem acompanhando a evolução tecnológica do século atual, e busca desenvolver e aperfeiçoar sua atividade produtiva de modo que a eficácia terapêutica, funcional e cosmética, além da segurança, atenda às exigências da sociedade consumidora (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige altos padrões de qualidade dos medicamentos produzidos em escala industrial. Uma ferramenta indispensável na qualidade de medicamentos é o controle de qualidade, que apresenta um alto custo, treinamento contínuo dos técnicos, necessidade de adequação da área física e aquisição de equipamentos eficientes (BONFILIOA et al., 2010).

A qualidade de um medicamento se mede pela sua capacidade de exercer o efeito terapêutico que dele se espera. Essa capacidade é determinada pelas propriedades que tenham influência nesses resultados, como sua identidade, sua pureza, seu teor ou potência, as propriedades químicas, físicas e biológicas ou do seu processo de fabricação. A qualidade e segurança do medicamento fabricado são imprescindíveis, visto que este será consumido por um indivíduo debilitado. O controle contínuo do medicamento no processo de fabricação implica a análise das características dos medicamentos ao longo de um determinado período (RUIZ; CASTRO, 2008).

Para assegurar que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos e diminuir os riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, devem ser implantadas as Boas Práticas de Fabricação e um rigoroso Controle de Qualidade. As Boas Práticas de Fabricação, normalmente conhecidas com BPF, são um conjunto de procedimentos estabelecidos que relacionam práticas produtivas, cuidadosamente criadas e revisadas, que estendem desde o desenvolvimento dos produtos, compra de insumos e componentes, passando pelo processo produtivo e armazenamento até a comercialização dos produtos e posterior acompanhamento dos mesmos no mercado. O cumprimento das BPF está orientado primeiramente à diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, os quais não podem ser detectados somente pela realização de

ensaios nos produtos terminados. Os riscos são constituídos essencialmente por contaminação-cruzada, contaminação por partículas, troca ou mistura de produto (BRASIL, 2010).

A análise de medicamentos é realizada rotineiramente pelos laboratórios da indústria farmacêutica por ser crucial para garantir a qualidade do produto e para maior segurança aos seus usuários (BONFILIOA et al., 2010). O controle de qualidade é uma área fundamental na indústria farmacêutica, sendo responsável pelas atividades referentes à amostragem, às especificações e realização dos ensaios necessários e essenciais. Somente após resultados satisfatórios, as matérias-primas e produtos terminados serão liberados para fornecimento, venda e uso. Além de ser responsável pelas análises laboratoriais, o controle de qualidade também participa e está envolvido em todas as decisões que possam estar relacionadas à qualidade do produto (BRASIL, 2010).

O laboratório do controle de qualidade microbiológico na indústria realiza testes para constatar a esterilidade de um produto no caso de produtos estéreis, e a ausência de bactérias patogênicas ou carga microbiana abaixo do valor permitido pela legislação em produtos não estéreis. A atenção no controle dos produtos não estéreis assegura que a carga microbiana presente, seja no aspecto qualitativo ou quantitativo, não comprometa a sua qualidade final ou a segurança do paciente. A presença de microrganismos patogênicos é proibitiva, pois representa potencial risco de aquisição de quadro clínico infeccioso, ou de transferência de toxinas igualmente indesejáveis, acarretando riscos à saúde do paciente (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

O controle microbiológico é efetuado ao longo da cadeia de produção, desde a matéria prima ao produto final, bem como ao ambiente do local de produção, e é essencial para auxiliar nas investigações de produtos quando são ultrapassados os limites de alerta e de ação. O limite de alerta é um nível de contaminação significativamente superior às condições normais de operação, quando excedido requer uma investigação das condições de operação. Já o limite de ação é o nível de contaminação que quando excedido requer acompanhamento imediato e ação corretiva (ANVISA, 2010). Para atingir bom nível de qualidade microbiana nos produtos farmacêuticos é fundamental que se conheçam as fontes e os mecanismos responsáveis por esta contaminação. A qualidade microbiana dos produtos farmacêuticos é afetada não apenas pelos tipos e grandeza de organismos introduzidos durante a fabricação, estocagem e uso, mas

também depende de sua interação com a formulação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Ao avaliar os resultados dos testes microbiológicos, o número e os tipos de microrganismos presentes devem ser considerados no contexto do uso do produto proposto, a qualidade microbiana dos medicamentos deve ser definida frente a diferentes fatores, como a via de administração, o fato de ser consumido por pessoas debilitadas, às vezes até imunodeprimidas, o uso de agentes imunossupressores e corticosteróides. Cargas microbianas elevadas podem também facilmente comprometer a estabilidade do produto (ANVISA, 2010).

É importante encontrar a provável origem de contaminação de um produto quando os limites de ação são excedidos, ou um teste de esterilidade seja positivo e também quando há contaminação de produtos em fase intermediária ou final, para ter um perfil dos microrganismos identificados e determinar se o contaminante faz parte da microbiota do ambiente ou se foi introduzido por outras vias (PACHECO, 2009).

Apesar da maioria dos contaminantes ser proveniente de matérias-primas, a contaminação oriunda de operadores envolvidos, materiais de embalagem, equipamentos e ambientes produtivos também deve ser controlada. (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010) O monitoramento ambiental e o controle microbiológico em salas limpas e demais áreas críticas do processo de produção de medicamentos fazem parte da rotina da garantia da qualidade nas indústrias farmacêuticas e têm como objetivo medir e identificar os microrganismos vivos presentes nesses ambientes e também orientar medidas preventivas e corretivas para eliminar possíveis focos de contaminação (COUTO, 2012).

No controle de qualidade microbiológico da indústria farmacêutica, os patógenos pesquisados exigidos pela Farmacopéia Brasileira no produto acabado e matéria- prima são bactérias Gram-negativas bile tolerantes como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* e *Candida albicans*. Além disso, *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*, *Aspergillus* sp., entre outros, podem ser encontrados contaminando a área de produção ou produtos que deveriam ser estéreis (BRASIL, 2010).

A identificação dos microrganismos é fundamental para a manutenção de um plano de controle eficiente, para determinação dos métodos de desinfecção adequados para eliminar a microbiota encontrada nas salas de manipulação ou envase, para elaboração de documentos e acompanhamento do histórico de contaminação, confirmação dos microrganismos a serem utilizados em validação e na promoção de crescimento de meios de cultura destinados ao monitoramento ambiental (PACHECO, 2009). Estas informações são essenciais para a obediência às Boas Práticas de Produção (BPF), como a adoção de medidas preventivas e corretivas relacionadas aos procedimentos operacionais, validação dos processos de limpeza e sanitização das instalações e treinamento do pessoal (COUTO, 2012).

4.2 Métodos Convencionais e Alternativos de Identificação Microbiana

Métodos de identificação rápidos e confiáveis sem uma manipulação intensiva por parte do técnico é o maior objetivo da microbiologia clínica e ambiental. A detecção precoce e caracterização de microrganismos podem ajudar a minimizar riscos para a saúde e evitar a propagação de doenças (HO; REDDY, 2010).

Os sistemas de identificação são baseados em diferentes técnicas analíticas, e cada um possui restrições inerentes ao método, limitações do banco de dados, reprodutibilidade técnica, deficiências em termos de precisão, complexidade, rapidez e custo. A escolha do método deve ser feita analisando a tecnologia adequada para a rotina do laboratório com todos esses limites em mente, e também a necessidade do nível de identificação (gênero, espécie, estirpe) necessário para a situação em particular (SUTTON; CUNDELL, 2004).

Como a capacidade de discriminar com sensibilidade uma determinada espécie é essencial para o monitoramento de fontes de contaminação microbiana específicas, o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam, com precisão, caracterizar e identificar microrganismos, é necessário para melhorar a qualidade de produtos e garantir a segurança (WIEDMANN et al., 2000).

Para esclarecer algum fato ou aplicação na qual ocorra o envolvimento de microrganismos, primeiro é necessário conhecê-lo ou pelo menos classificá-lo. Em princípio, as técnicas para a classificação e identificação de microrganismos devem seguir alguns aspectos gerais tais como uma capacidade de identificação universal, ter

um baixo custo de operação, apresentar um rápido processo de transferência de informações, propiciar o compartilhamento das informações através de bancos de dados que devem ser acessíveis e passíveis de atualizações regularmente e possibilitar a identificação de diferentes fontes (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

Um esquema de identificação é baseado em um padrão de características, que seja capaz de diferenciar um determinado microrganismo de outros e identificá-lo exclusivamente dentro do grupo a que pertence. Os métodos clássicos de identificação microbiana são ainda os mais utilizados em indústrias farmacêuticas e inclui a caracterização morfológica da colônia, morfologia celular, coloração de Gram, condições de crescimento em meios seletivos, potencial para assimilação também de certos açúcares, reações bioquímicas específicas, susceptibilidade a antibióticos, entre outras (SUTTON; CUNDELL, 2004). Esses métodos são comprovados, confiáveis, capazes de fornecer as informações exigidas para garantir a manutenção das BPF e aceitos pelas autoridades regulatórias, no entanto, são procedimentos extremamente laboriosos. (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Várias alternativas de investigação que sejam mais rápidas e precisas têm sido propostas, e podem ser necessárias para identificar o gênero e espécie do microrganismo (PACHECO, 2009). Para contornar esses problemas em análises de amostras ambientais, os métodos mais utilizados são baseados em análises dos perfis fisiológicos, perfis de ácidos graxos obtidos a partir de lipídios extraídos da microbiota ambiental e análise de peptídeos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Além da redução do tempo de análise, podemos citar como vantagens na implementação de métodos microbiológicos rápidos a redução do tempo total para liberação do produto, redução do estoque de matéria-prima, produtos acabados e trabalho em processo, melhoria da qualidade e automatização dos testes microbiológicos, capacidade de iniciar as investigações precocemente em resposta a resultados fora de especificação, redução do risco de contaminação microbiana dos produtos e melhoria nos processos de fabricação, atualização e enriquecimento do nível profissional dos microbiologistas (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Apesar destas vantagens, a implementação desses métodos é lenta ou nem sempre adotada devido à posição regulatória conservadora tomada pelas empresas farmacêuticas, elevado custo de aquisição dos equipamentos, custos dos testes e falta de

mão de obra especializada nos laboratórios microbiológicos. Elementos da área regulatória, gerentes e pessoal técnico estão habituados aos métodos convencionais, havendo necessidade de treiná-los de forma que seja demonstrada a base científica que os sustenta e sua confiabilidade (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Os métodos microbiológicos rápidos passaram a ser considerados e implementados na indústria após a publicação nos capítulos USP<1223> *Validation of Alternative Microbiological Methods e Ph. Eur. 5.1.6 Alternative Methods for Control of Microbiological Quality* (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Métodos microbiológicos alternativos, inclusive os automatizados, podem ser utilizados desde que sua equivalência com o método preconizado pela Farmacopéia vigente tenha sido devidamente validada. Porém, algumas vezes não é possível relacionar o resultado dos métodos rápidos (alternativos) com os obtidos pelo método convencional, no qual os microrganismos são desenvolvidos em meio de cultura. Em geral, o princípio adotado nestes métodos não é baseado na capacidade de os microrganismos crescerem em um meio de cultura, mas sim na análise da atividade ou do conteúdo das células, demonstrando dessa maneira resultados em termos de unidades viáveis e não unidades formadoras de colônias. Outro desafio enfrentado pelos microbiologistas são as dificuldades em avaliar, validar e obter aprovação para implementar as novas tecnologias para testes microbiológicos, devido a falta de conhecimento e domínio das práticas desses métodos, e também equipamentos existentes para realizar as medições (COUTO, 2012).

4.3 Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa (MS - *Mass Spectrometry*) é uma ferramenta física que caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. Inicialmente, ela foi usada como uma ferramenta importante para a determinação de estruturas químicas, principalmente compostos orgânicos pequenos e voláteis. Os primeiros espectrômetros de massa apenas eram capazes de efetuar espectros de varredura de massa e a elucidação da estrutura era baseada na dissociação do íon, dissociação esta que ocorria no interior da fonte de ionização. Estes instrumentos eram muito úteis, mas apenas para uma gama restrita de compostos de baixa massa molecular e compostos voláteis e, não era adequada para a análise de

misturas (GONÇALVES, 2007). Apenas no início da década de 80, com o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais especializados e técnicas mais brandas de ionização, como MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionization*) e ESI (*electrospray ionization*), a espectrometria de massa começou a ser mais aplicada na análise de moléculas de massa molecular elevada e polares como proteínas e peptídeos. (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011) Essas técnicas permitem a transferência dessas biomoléculas para a fase gasosa sem que elas sejam destruídas, passando a ser uma importante ferramenta analítica na identificação e classificação de microrganismos por meio da análise de proteínas específicas (CUNHA, CASTRO, FONTES, 2006).

Uma vez que a espectrometria de massas mede a relação entre massa/carga, um espectrômetro de massas consiste em uma fonte de ionização para a obtenção de íons, um analisador de massas, o qual separa os íons formados, um detector desses íons e um sistema de aquisição dos dados (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

As duas técnicas de ionização mais comumente empregadas são ESI e MALDI e os analisadores são os quadropolos, armadilhas de íons (íon-traps), os do tipo tempo de voo *time-of-flight* (TOF), ressonância em cíclotron de íons e transformada de Fourier (*Fourier-transform ion cyclotron resonance* FT-ICR), *orbitrap*, entre outros (CUNHA, CASTRO, FONTES, 2006). Todos estes métodos diferem notavelmente na sensibilidade, resolução, precisão de massa e possibilidade de fragmentar íons de peptídeos. Vários espectrômetros de massas com diversas combinações de fontes e analisadores são comercializados atualmente, no entanto, na identificação e classificação de microrganismos, o que mais se tem utilizado são espectrômetros do tipo MALDI-TOF (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

Métodos tradicionais exigem um grande número de amostras biológicas e diversas etapas de purificação são necessárias para a identificação de proteínas. Atualmente, a espectrometria de massas é a técnica de escolha para identificação de proteínas e para o estudo de modificações proteicas pós-traducionais em diferentes condições fisiológicas. Além disso, vem sendo utilizada no monitoramento e caracterização de diversos processos industriais como, por exemplo, em processos fermentativos e até mesmo na análise de microrganismos intactos (BARREIRO, 2010).

Essa técnica pode ser considerada a principal ferramenta analítica no campo da proteômica devido a sua elevada sensibilidade, exatidão e precisão (BARREIRO, 2010).

Um dos procedimentos utilizados para identificar proteínas em bancos de sequências sem a necessidade de sequenciar a proteína em estudo é a chamada “impressão digital do mapa peptídico” (*peptide mass fingerprint*). Nesse método, é feita uma digestão enzimática ou química da proteína, *in vitro*, seguida de uma análise espectrométrica dos peptídeos obtidos. As massas molares desses fragmentos peptídicos são então comparadas com massas de peptídeos provenientes de digestões teóricas de proteínas depositadas em bancos de sequências. Geralmente, o equipamento de escolha nesse caso é o MALDI-TOF. Esse método é muito útil na identificação de proteínas de espécies com genomas pequenos e completamente sequenciados. Entretanto, o índice de insucesso na identificação aumenta à medida que se aumenta o número de registros confrontados no banco de dados utilizado na busca. Para proteínas isoladas de espécies cujo genoma não está sequenciado, é necessário usar bancos de dados ampliados. (CUNHA, CASTRO, FONTES, 2006)

4.4 MALDI- TOF MS

A técnica MALDI começou a ser utilizada para análise de proteínas em 2002 por Koichi Tanaka, um dos vencedores do prêmio Nobel de química, pelo “desenvolvimento de métodos de análises espectrométricas de dessorção e ionização de moléculas biológicas” (FERREIRA, 2009). As figuras 1 mostra os componentes do espectrômetro de massa MALDI-TOF e as etapas técnicas empregadas. Inicialmente, a amostra é embebida em uma matriz ácida capaz de fornecer prótons para o processo de ionização dos componentes da amostra. Ocorre uma co-cristalização da amostra com essa matriz e um feixe de laser serve como fonte de dessorção (fenômeno de retirada de substâncias adsorvidas ou absorvidas por outras) e de ionização. O feixe de laser é irradiado sobre a mistura amostra/matriz, e a energia é absorvida pela matriz. Há uma transferência de prótons da matriz para a amostra ionizando as moléculas e ao mesmo tempo é desencadeado o processo de dessorção, possibilitando a passagem da amostra para o estado gasoso (GOULART; RESENDE, 2013; FERREIRA, 2009). Esta forma de transferência de energia é eficiente na obtenção de moléculas intactas, já que elas não sofrem incidência direta da excessiva energia do laser e os íons formados vão possuir baixa energia interna, o que poderia causar sua decomposição (BARREIRO, 2010).

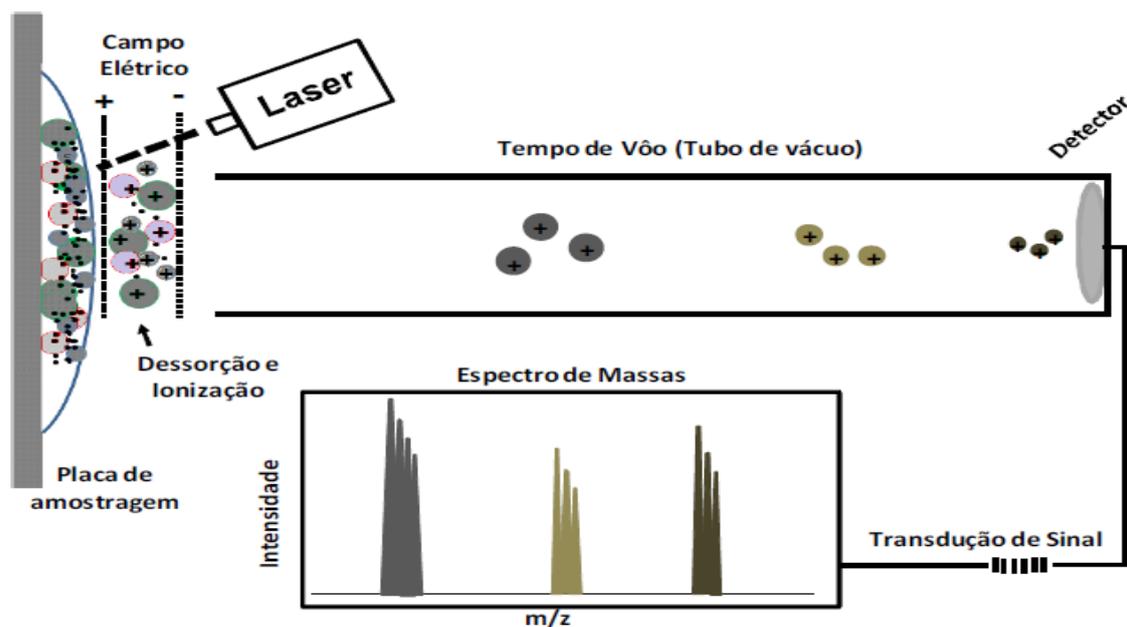


Figura 1: Figura esquemática de um espectrômetro de massas MALDI-TOF. A amostra é misturada com uma matriz sobre uma placa de metal condutora. Ocorrer a cristalização da matriz junto com a amostra e a placa metálica é introduzida no espectrômetro de massas, onde fica alinhada com um tubo de vácuo. O laser dispara breves pulsos de luz que são absorvidos pela matriz provocando o processo de dessorção da mistura matriz/amostra. As moléculas dessorvidas e ionizadas (representada por círculos com o símbolo +) são aceleradas por meio de um campo elétrico e entram em um tubo metálico submetido a vácuo, onde são separadas em função da relação massa/carga. O tempo (tempo de voo) que a amostra leva para percorrer a distância entre a placa e o detector é proporcional à massa molecular, de forma que as moléculas menores chegam mais rápido ao detector. Há uma transdução de sinal e o espectro de massas é gerado de acordo com a massa das moléculas que estão presentes na amostra. Para a identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados, arquivo contendo todas as impressões digitais das moléculas.

Fonte: Adaptado de ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011.

Os íons formados são acelerados por meio de um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo e individualmente analisados, por analisador, geralmente do tipo TOF (tempo-de-voo), e posteriormente, detectados pelo detector (CUNHA; CASTRO; FONTES, 2006; FERREIRA, 2009). Desse modo, os analitos, separados por TOF formam espectros de massa de acordo com sua razão m/z (massa/carga) e com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada. Para a identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados, arquivo contendo as impressões digitais das moléculas (GOULART, RESENDE, 2013). Usualmente, para a identificação de microrganismos, são usados bancos de dados: *Biotyper* software (Brucker Daltonics) e o

Spectral Archive and Microbial Identification System (SARAMIS - AnagnosTec GmbH).

A natureza da matriz é um dos parâmetros mais importantes que afetam a qualidade do espectro. Todos eles requerem propriedades físicas e químicas como: uma absorvância eficiente no comprimento de onda do laser, uma ionização eficiente e uma estabilidade importante para não interferir com o espectro de massa da amostra. A matriz química penetra na parede celular, tornando as proteínas intracelulares acessíveis para análise, e facilita a produção de íons intactos em fase gasosa a partir de compostos como proteínas, oligonucleotídeos, polímeros sintéticos e compostos orgânicos pesados (FERREIRA, 2009).

A escolha das matrizes depende da natureza da amostra estudada. As matrizes mais utilizadas são o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (ácido gentísico), ácido 3,5- dimetoxi - 4 - hidroxicinâmico (ácido sinapínico), e α -ciano-4-hidroxicinâmico (α - CHCA). Ácido gentísico (DHB) permite o estudo de oligossacarídeos, glicopeptídeos, e glicoproteínas. Geralmente, a DHB é mais eficiente para pequenos componentes de massa molecular e ácido sinapínico e CHCA para o estudo de proteínas (GONÇALVES, 2007; CARBONELLE et al., 2011).

MALDI-TOF MS tem sido utilizada com sucesso na investigação e identificação de proteínas e peptídeos, na identificação taxonômica de microrganismos, dentre inúmeras outras aplicações (GOULART, RESENDE, 2013). É considerada uma técnica de ionização branda, porque os íons formados possuem baixa energia interna e não ocorre a fragmentação (FERREIRA, 2009) Na identificação de microrganismos, uma grande quantidade de moléculas é detectada simultaneamente como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, gerando um espectro que é característico de cada espécie (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

Os bancos de dados do perfil de espectro de massa de microrganismos são constantemente atualizados e sua confiabilidade já está comprovada por publicações de alto impacto que têm comparado a espectrometria de massa com outras ferramentas já utilizadas na identificação de microrganismos. Foi demonstrado que quando comparado o MALDI-TOF com provas bioquímicas automatizadas ou outros métodos, a exatidão obtida foi entre 98 e 99% para as espécies analisadas (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

A identificação por MALDI-TOF é baseado nas seguintes constatações de que impressões espectrais são variadas entre microrganismos e entre os compostos detectados no espectro, alguns picos (massas moleculares) são específicos para o gênero, espécie, e por vezes a subespécies, os espectros obtidos são reprodutíveis desde que as bactérias sejam cultivadas nas mesmas condições (CARBONELLE et al., 2011).

A mesma espécie pode dar espectros de massa diferente, devido ao uso de diferentes condições de crescimento ou de diferentes métodos de extração química. Portanto, as condições de crescimento bem controladas e os procedimentos de preparação de amostras padronizadas são cruciais para a obtenção de espectros de massa reprodutíveis. A composição da solução utilizada para solubilizar as bactérias pode modificar o espectro de uma dada estirpe. Por exemplo, o uso de ácido trifluoroacético ou ácido fórmico cria diferentes espectros com diferenças significativas em intensidades relativas dos picos. Os métodos de extração de proteína e a concentração de NaCl também podem influenciar a qualidade dos espectros modificando a cristalização da amostra com a matriz. Essas observações ressaltam a necessidade de uma atenção especial na preparação da amostra para obter um espectro de alta precisão e reprodutibilidade (CARBONELLE et al., 2011).

Amostras ambientais são mais difíceis de serem analisadas por ocorrer naturalmente mudanças no perfil de proteínas. Devido ao interminável desenvolvimento da tecnologia de análise de microrganismos e da natureza instável da taxonomia microbiana, muitas vezes cepas foram atribuídos a espécies que subsequentemente sofrem alterações na nomenclatura, podendo causar eventual confusão. Também deve ser mencionado que o tipo designado de cepas ocasionalmente não é representantes "típicos" de uma espécie e não pode ser apropriado como a única referência para a identificação de isolados desconhecidos. MALDI-TOF MS mostra potencial especial para aplicações em microbiologia ambiental. No entanto, as atuais limitações de espectro de massa para caracterização e identificação em microbiologia ambiental são evidentes. Apenas uma pequena fração desses isolados ambientais é atualmente contida em bases de dados de espectro de massa. No entanto, a análise de células inteiras por MS representa uma ferramenta eficiente para rapidamente caracterizar e comparar isolados que se originam a partir de determinados ecossistemas. Com essa técnica, um grande número de microrganismos pode ser rastreado rapidamente e com relativo baixo custo. As análises dos espectros de massa permitem agrupamentos de indivíduos, que podem ser

analisados posteriormente, por exemplo, por sequenciamento de regiões relacionadas a filogenia. Uma vez que os isolados foram identificados por outros métodos, como abordagens genotípicas, os espectros podem ser adicionados à base de dados para consulta futura. (WELKERA, MOOREC, 2011)

Esses estudos envolvendo isolados ambientais são importantes para a indústria farmacêutica que deve verificar além da contaminação do ambiente de produção ou área limpa, a contaminação do produto final e matéria-prima. A maioria das matérias-primas é de origem vegetal e podem conter microrganismos que são muito distintos dos isolados clínicos, portanto, a utilização de isolados ambientais e microrganismos de referência exigidos pela Farmacopéia também são necessários para elaboração do banco de dados.

4.5 Analisador de massa TOF

O analisador de massa por tempo-de-voo (TOF) é muito utilizado para estudo de biomoléculas grandes como proteínas e polímeros. Todos os íons que entram nesse analisador recebem um pulso de energia igual, mas são acelerados de maneiras diferentes devido à sua relação massa/carga (m/z). Portanto, o tempo de deslocamento até o detector é proporcional à massa dos íons. Através da medida do tempo de voo dos íons é possível deduzir sua m/z , e analisar compostos de massa baixa até macromoléculas. O analisador TOF possui a vantagem de não ter limite máximo de massa, além de ter alta taxa de transmissão de íons, resultando em uma alta sensibilidade (SAWAYA, 2009).

São baseados no princípio de que os íons com a mesma carga têm energias cinéticas iguais, e sua velocidade será inversamente proporcional à raiz quadrada da sua massa. Dessa forma, se dois íons com a mesma carga, mas com massas diferentes, são acelerados através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão dependentes de suas massas, e eles atingirão o detector com tempos de voo diferentes. Assim, o íon de menor valor de m/z atingirá o detector primeiro (BARREIRO, 2010).

Uma vantagem da utilização de analisadores TOF é o seu rápido tempo de resposta e, como tal, ele é geralmente utilizado associado a instrumentos que promovam a formação de íons por pulsos, como por exemplo, associado à MALDI. Outra vantagem

deste tipo de analisador é que, teoricamente, não apresenta limite de massa analisável e apresenta uma elevada resolução. Por esta razão, esta técnica vem sendo utilizada na análise de materiais poliméricos de elevada massa molecular, tanto de origem biomolecular, em especial as proteínas, como de origem sintética (GONÇALVES, 2007).

5. DISCUSSÃO

Na indústria farmacêutica, além de resultados rápidos, é importante a utilização de métodos confiáveis, reprodutíveis e que possam ser validados para comprovar sua eficácia. O uso do MALDI-TOF é uma ferramenta importante para identificação de microrganismos que possam contaminar áreas limpas, água, matéria-prima e o produto final. Com uma fiscalização cada vez mais rigorosa é importante garantir uma identificação confiável, mas que também seja aliada a indústria para obter resultados rápidos e sem altos custos.

Essa técnica possui várias vantagens como a utilização de células intactas de microrganismos (também designada ICM-MS, *intact cell MALDI-TOF*) que podem ser obtidas diretamente do meio de cultivo. A análise produz um espectro de proteínas típicas de cada espécie, o que funciona como uma impressão digital (“*fingerprinting*”), que pode ser comparado aos espectros previamente identificados e depositados em banco de dados. Apresenta um curto tempo de análise (minutos), alto rendimento (o consumo de material biológico é insignificante), baixo custo, pode ser aplicada em larga escala, custo de manutenção relativamente baixo, os dados gerados são de simples interpretação e apresenta uma alta resolução, fornecendo uma análise mais rápida, precisa e altamente sensível às misturas complexas de peptídeos (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

As figuras 3 e 4 mostram exemplos de espectros de massa obtidos para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Aeromonas caviae*. A toxina aerolisina (338,850 Da) é outro exemplo de biomarcador usado para a identificação de *Aeromonas hydrophyla* (MONIATTE et al., 1996).

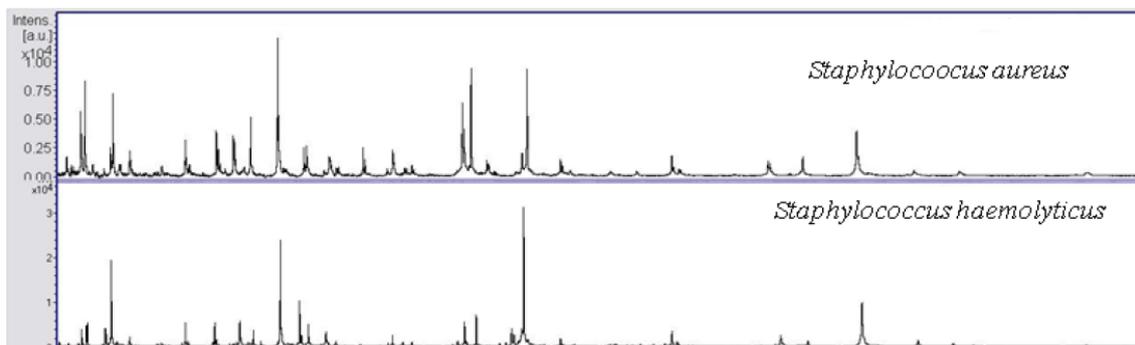


Figura 3: Espectros de MALDI-TOF MS de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus*, na faixa de 3.000 a 12.000 m/z.

Fonte: BARREIRO, 2010.

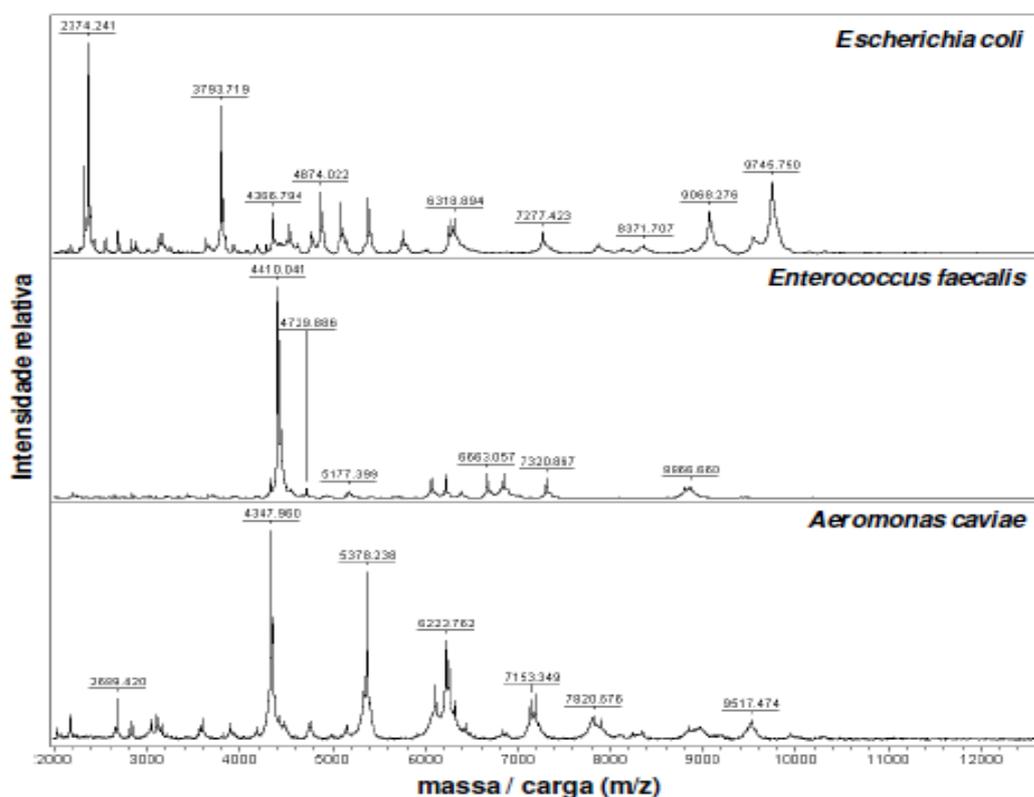


Figura 4: Espectro de massas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Aeromonas caviae*. O eixo x representa a relação massa/carga (daltons) das proteínas encontradas para os diferentes microrganismos e o eixo y representa intensidade relativa. Os números acima de cada pico representam a massa de cada proteína encontrada.

Fonte: ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011.

A utilização de MALDI-TOF-MS para caracterização de microrganismos foi ativamente realizada nos últimos anos por meio de inúmeras estratégias. De acordo com as aplicações tradicionais de espectrometria de massa em microbiologia, um grande

número de estudos de componentes das superfícies das células bacterianas foi analisado e também uma ampla variedade de sistemas de solventes foram utilizados para extrair o material proteico a partir da superfície de células de *E. coli*, a fim de obter uma abordagem analítica para a caracterização rápida de estirpes usando MALDI - TOF MS. De todas as biomoléculas celulares, as proteínas tiveram o impacto mais significativo na análise por espectrometria de massa. (KEYS et al., 2004) Proteínas específicas de bacteriófagos também são utilizadas como biomarcadores. Nesse caso, as amostras contendo as bactérias são infectadas com os bacteriófagos específicos (por exemplo, MS2 e MPSS-1, fagos específicos para *E. coli* e *Salmonella* spp., respectivamente) (REES; VOORHEES, 2005). Proteínas indicativas da progênie dos fagos são então detectadas e utilizadas como biomarcadores para as bactérias alvo. Lipopeptídeos cíclicos, como polimixinas, surfactinas, fengicinas e kurstakina, também constituem uma classe de biomarcadores potenciais que têm sido propostas para diferenciar alguns microrganismos nos níveis de espécies e mesmo subespécies. (DEMIREV; FENSELAU, 2008) Os lipopeptídeos, são biomarcadores usados na identificação de *Bacillus* spp., tanto na célula vegetativa quanto no esporo. Assim, o lipopeptídeo fengicina de m/z 1478 Da, é um biomarcador usado na identificação de *Bacillus globigii* (WILLIAMS et al, 2002). Espécies de *Bacillus* são comumente detectados tanto no ambiente quanto em produtos farmacêuticos e a sua identificação no nível de espécie é complexa e um desafio para os laboratórios (SOUZA, 2011).

Protocolos de métodos de análise utilizando solução de etanol, ácido fórmico e acetonitrila para promover a lise bacteriana também são utilizados para análise por MALDI-TOF MS. O extrato contendo principalmente proteínas ribossomais é utilizado para se obter os espectros utilizados na identificação. Estudos já mostraram que a maioria das proteínas cujo sinal é detectado, é de origem ribossomal, mas podem eventualmente, aparecer proteínas que possivelmente estão presentes em maior quantidade. Essas proteínas são bastante conservadas geneticamente e tem como função, auxiliar na conformação tridimensional do ribossomo de forma que este exerça sua função (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

As células podem ser analisadas diretamente ou após concentração de proteínas como biomarcador. O método mais simples e mais rápido de análise envolve a utilização de células intactas diretamente para a produção de um perfil de impressão digital de peptídeos, e pode ser realizada facilmente, misturando células inteiras com uma solução

de matriz imediatamente antes da análise. Alternativamente, uma fração enriquecida contendo proteína pode ser obtida por processo de extração através de um protocolo que utiliza etanol e ácido fórmico (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011). Essas abordagens são muito semelhantes, e o enriquecimento das amostras exigem poucos passos adicionais (LAY, 2000).

Vários métodos que pretendem aperfeiçoar o perfil de espectro de massa de amostras microbianas têm sido relatados. Devido à enormidade deste estudo, um método que fosse simples, prático e reprodutível torna-se necessário. Keys et al. (2004), investigaram quatro métodos usados para preparação das amostras: (1) a adição da amostra diretamente na placa, seguido pela adição da solução de matriz; (2) emulsificação da amostra na matriz seguido pela aplicação ao alvo placa (3) um método tipo "sanduíche", em que a amostra foi colocada entre duas camadas de uma solução matriz, e (4) semelhante a primeira, mas uma camada extra de solução de matriz era adicionado. Todos produziram perfis espectrais semelhantes, porém o primeiro método era o mais simples e reprodutível.

Para Smole et al. (2002), a obtenção de espectros de alta qualidade e reprodutíveis são mais difíceis quando obtidos de bactérias Gram - positivas. Por exemplo, utilizando o protocolo no qual o microrganismo é inoculado diretamente na placa não é possível produzir de forma consistente os espectros de qualidade de bactérias Gram-positivas e por isso é necessário realizar a preparação de amostras. As bactérias Gram-positivas diferem significativamente Gram-negativas, já que a parede celular consiste em múltiplas camadas de peptidoglicano, formando uma estrutura espessa e rígida. Além disso, as paredes celulares de bactérias Gram-positivas contêm ácidos teicóicos (Tortora et al., 2012). Smole et al. (2002) concluíram que a ruptura física da camada de peptidoglicano por laser e a ionização da amostra durante o processo por MALDI não eram suficientes para ionizar uma série de proteínas individuais ou ligadas na parede celular. Para resolver esse problema, utilizaram lisozima para hidrolisar especificamente as ligações β - 1,4 entre as subunidades do peptidoglicano, N - acetilglucosamina (NAG) e ácido N - murâmico (NAM), como demonstrado na Figura 07. Esta clivagem enzimática aumenta a probabilidade de solvatação e co-cristalização para permitir análise mais reprodutível de um maior número de íons. Eles utilizaram padrões de bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus capitis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus* e *Streptococcus pyogenes*.

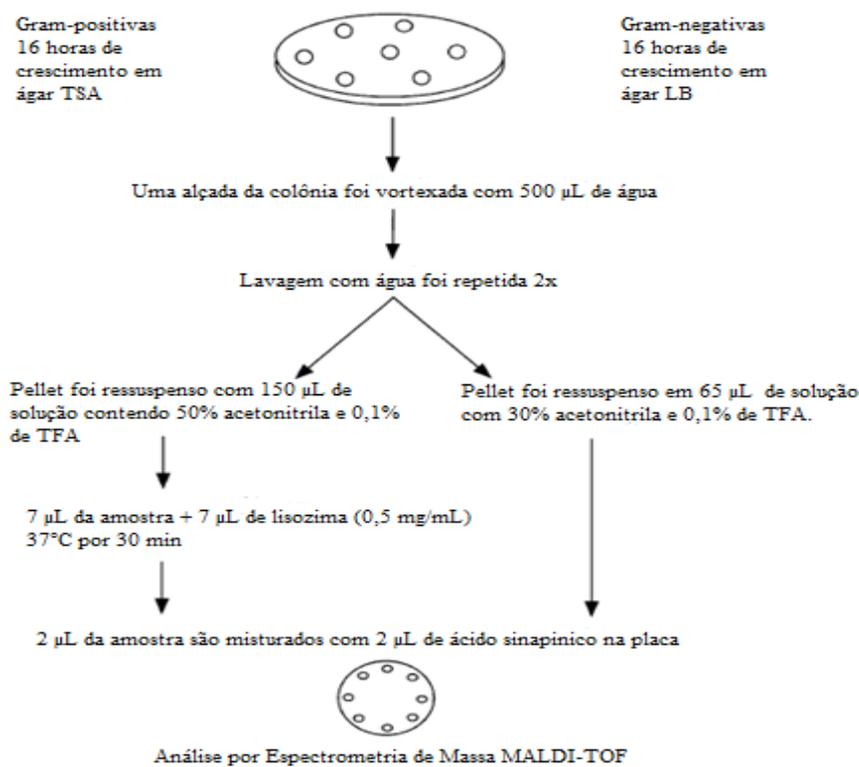


Figura 7: Preparação das amostras proposta por Smole et al. 2002.

Fonte: Adaptado de SMOLE et al., 2002.

Bizzini et al. (2010) compararam os resultados de identificação de microrganismos isolados de amostras clínicas pela técnica de MALDI-TOF, com aqueles nos quais foram usados métodos fenotípicos tradicionais como o teste da catalase, oxidase e testes utilizando o sistema Vitek2[®] e API[®] (bioMérieux). Durante o período de estudo, um total de 1.371 isolados foram identificados no nível de espécie por métodos convencionais. MALDI-TOF MS resultou em uma identificação precisa do nível de espécie para 1278 (93,2%). Eles analisaram os espectros através de dois protocolos, o primeiro a partir das células íntegras obtidas da cultura e o segundo realizando uma extração das proteínas utilizando ácido fórmico e acetonitrila. Entre todos os 1.371 isolados testados, um resultado confiável foi obtido para 964 isolados (70,3%), após a deposição direta da colônia e para 314 cepas adicionais após a extração de proteínas (22,9%).

Através dos resultados obtidos, também concluíram que bactérias Gram-positivas e leveduras, devido à estrutura da parede celular, necessitam de uma etapa de extração para obter um resultado mais preciso. Os resultados válidos para amostras de levedura

em que a análise foi feita a partir de aplicação direta da colônia foram de apenas 4% do total de amostras analisadas. A qualidade do espectro obtido realizando a etapa de extração é superior à qualidade do espectro obtido por deposição direta da colônia. Foi demonstrado um aumento do rendimento global dos resultados de 25% (BIZZINI et al., 2010).

Tipicamente, as bactérias são cultivadas em tríptico agar de soja (TSA). No entanto, outros meios podem ser utilizados. Para ótima reprodutibilidade, culturas bacterianas devem ser cultivadas e armazenadas sob as mesmas condições para cada experimento. Isto inclui a uniformidade no meio de crescimento e o tempo entre a inoculação e transferência para análise das células. Estudo realizado com a mesma cepa de *Escherichia coli*, utilizando o mesmo instrumento, mas com condições experimentais diferentes, resultaram em espectros claramente diferentes. Essas diferenças são atribuídas a fatores como o crescimento, a manipulação e armazenamento das células antes da análise (LAY, 2000).

Segundo Bizzini et al. (2010), houve uma diferença estatisticamente significativa na identificação para as bactérias Gram-negativas cultivadas em ágar MacConkey, em comparação com que as mesmas espécies cultivadas em meio rico, como o ágar suplementado com sangue de carneiro e ágar chocolate. Assim, usando a técnica de deposição direta, apenas 56% dos 108 isolados de *E. coli* do meio MacConkey foram identificados corretamente, enquanto 87% de 148 de *E. coli* isoladas a partir de outros meios de crescimento foram identificados corretamente. Após a etapa de extração, não houve diferença nas identificações corretas entre isolados de *E. coli* isoladas de qualquer meio de cultura, uma vez que 100% das *E. coli* isoladas foram identificadas corretamente.

Mitsuma et al. (2013) compararam a técnica MALDI-TOF MS com métodos convencionais para identificação de 1371 bactérias e fungos isolados em um laboratório clínico. MALDI-TOF MS identificou 98,5% dos isolados, incluindo 93,2% em nível de espécie e 5,3% em nível de gênero. Das espécies identificadas, 95,1% está de acordo com os resultados dos métodos convencionais. Dos resultados discordantes, 11% são devido a erros na análise pelos métodos convencionais e os 89% restantes, são devido a erros pelo MALDI-TOF MS.

Barreiro et al. (2010) avaliaram a técnica de MALDI-TOF MS para identificação de bactérias causadoras de mastite subclínica bovina, comparando os resultados com métodos tradicionais e por sequenciamento do fragmento do gene 16S rRNA. Em relação ao *Staphylococcus aureus*, de 13 isolados, 11 apresentaram resultados de mesma identificação. Um isolado de *S. aureus* foi identificado por MALDI-TOF como *Staphylococcus haemolyticus*, e o resultado foi confirmado por sequenciamento do gene 16S rRNA. Para o segundo caso no grupo de amostras de *S. aureus*, a análise indicou *E. faecalis*. O espectro obtido foi diferente do espectro de *S. aureus*, indicando uma possível cultura mista de bactérias. Foi utilizado nesse estudo o programa computacional Biotyper, e o algoritmo do programa foi aplicado confirmando a presença de cultura mista de *E. faecalis* e *S. aureus*. (BARREIRO, 2010)

Koubek et al. (2012), utilizaram a técnica MALDI-TOF MS para análises de isolados ambientais e confirmou o seu potencial como um método de triagem rápida método para determinar semelhanças entre isolados bacterianos, especialmente em um campo tão diverso como microbiologia ambiental. No entanto, também foi observado que é necessário o tratamento dos isolados, principalmente bactérias Gram-positivas. A extração com ácido trifluoroacético e acetonitrila, também é utilizada como sugerido por Grosse-Herrenthey et al. (2008), para a identificação de várias cepas de *Clostridium*.

Dubois et al. (2010) utilizaram MALDI-TOF MS e análise de “fingerprinting” (impressões digitais), para a identificação de 152 cepas de *Staphylococcus* de origem clínica e ambiental. Esse grupo também avaliou a aplicação do programa computacional Biotyper para a identificação rápida do “fingerprinting” por meio de comparação com o banco de dados do programa computacional, concluindo que essa abordagem é uma excelente alternativa aos métodos tradicionais e pode ser utilizado para a análise das relações clonais e/ou taxonômica.

Uma das desvantagens desta tecnologia, é que a análise é dependente de bancos de dados que são disponíveis somente comercialmente e as entradas atuais são essencialmente de isolados clínicos o que não é interessante para análises de isolados ambientais. A maioria dos erros de identificação por MALDI-TOF MS estão associados a um número insuficiente de cepas de referência disponíveis no banco de dados do espectro MALDI-TOF MS. Geralmente, o desempenho global do processo vai ser

continuamente melhorado com a introdução de mais entradas de dados em conjunto com o esclarecimento de grupos taxonomicamente problemáticos.

Outra desvantagem é quanto a dificuldade de análise de microrganismos com parede espessa como no caso de alguns fungos filamentosos, micobactérias e até mesmo bactérias Gram-positivas. E também, o fato de o MALDI-TOF não obter parâmetros para antibiograma e este deva ser feito manualmente ou por outro método automatizado, porém, o novo método de espectrometria dá indicações e diretrizes ao microbiologista referentes a resistências intrínsecas da bactéria. (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011)

Os investimentos iniciais para a aquisição do MS instrumentação MALDI-TOF e banco de dados como o *Biotyper* são relativamente elevados. No entanto, o investimento inicial pode ser recuperado em poucos anos, dependendo do rendimento das amostras. (DUSKOVÁ et al., 2012)

MALDI-TOF tem apresentado grande aplicação em laboratórios de análises clínicas tanto que já é amplamente utilizada em laboratórios clínicos da Europa e nos Estados Unidos. Por isso, novas abordagens vêm sendo desenvolvidas para atender a necessidade de diagnósticos rápidos e precisos para diversas doenças utilizando essa técnica. (GOULART, RESENDE, 2013) Esse método certamente terá também aplicabilidade no âmbito industrial, que exige um controle microbiológico rigoroso e que os resultados confiáveis sejam requeridos em curtos espaços de tempo. Os espectrômetros de massa são de fácil implementação e estão de acordo com exigências ambientais e sustentabilidade, pois, não geram nenhum tipo de resíduo.

6. CONCLUSÃO

O uso do MALDI-TOF MS pode abrir uma nova era em microbiologia, quando métodos fenotípicos convencionais e demorados poderão ser substituídos por métodos rápidos e precisos para análises taxonômicas e filogenéticas. Além da vantagem da economia de tempo proporcionada pela técnica, a mesma possui um custo-benefício viável (preparo simples e barato de amostras e placas de MALDI reutilizáveis) e de alto desempenho.

A validação e comprovação da reprodutibilidade da técnica são exigências na indústria farmacêutica. Portanto, estudos prospectivos destinados a implantar um método universal de preparação de amostra para diferentes microrganismos, a fim de facilitar a uniformidade entre os testes laboratoriais e treinamentos adequados aos técnicos ainda são necessários na área industrial. Além disso, pesquisas envolvendo os principais patógenos exigidos pela Farmacopéia Brasileira e também outros isolados ambientais para elaboração de bancos de dados são importantes para utilização no controle de qualidade farmacêutico.

É importante incluir este tópico nas disciplinas relativas ao tema na tentativa de já preparar os profissionais que irão se deparar com esta metodologia. A técnica apresenta inúmeras vantagens e certamente se tornará a primeira escolha na identificação de microrganismos. Junto com as ferramentas que os microbiologistas dispõem em seus laboratórios e diante da agilidade dos resultados e da diminuição dos custos, essa técnica vai beneficiar as empresas e principalmente o paciente, o qual depende do resultado e de melhorias na área microbiológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Farmacopéia Brasileira. 5 ed. Brasília, DF, 2010.

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, v. 9, n. 2, p. 344-355, ago./dez. 2011.

BARREIRO, J. R. **Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

BIZZINI et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, Lausanne, v. 48, n. 5, p. 1549–1554, may 2010.

BONFILIOA R., et al. Farmácia Magistral: sua importância e seu perfil de qualidade. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.34, n.3, p.653-664, jul./set. 2010.

BORGLIN et al. Application of phenotypic microarrays to environmental microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, Berkeley, v. 23, n. 1, p. 41-48, february 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 17 de 16 de abril de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária–ANVISA**. Regulamento técnico sobre Boas Práticas de Fabricação. Diário Oficial da União. Brasília, 17 de abril de 2010.

CARBONELLE et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 1, p. 104–109, jan. 2011.

COUTO, M. Monitoramento e controle microbiológico. **Revista SBCC**, n.55, 2012. Disponível em: <http://www.sbcc.com.br/revistas_pdf/ed55/1017%20microbiologia.pdf> Acesso em: 14 de agosto de 2013.

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**, Brasília, ano IX, n. 36, P. 40-46jan./jun. 2006.

DEMIREV, P. A.; FENSELAU C. Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Microorganisms. **Analytical Chemistry**, Maryland, v. 1, p. 71-93, 2008.

DUBOIS et al. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, Clermont-Ferrand, v. 48, n. 3, p. 941–945, 2010.

DUSKOVÁ et al. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. **International Journal of Food Microbiology**, Palackého, v. 159, n. 2, p. 107-114, 2012.

FERREIRA, C. R. Técnicas de Ionização. Maldi - Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz. **Espectrometria de Massas: Princípios e Aplicações**. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br>> Acesso em: 10 de setembro de 2013.

GROSSE-HERRENTHEY et al. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Anaerobe**, Leipzig, v. 14, n. 4, p. 242-249, october 2008.

GONÇALVES, V. M. F. **Caracterização de Heteropolissacarídeos por Espectrometria de Massa**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Química dos Alimentos) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**, Belo Horizonte, v.1, n. 3, nov. 2013. Disponível em: <<http://sbsc.org.br/nanocell/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>> Acesso em: 02 de dezembro de 2013.

HETTICK et al. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. **Proteomics**, Morgantown, v. 6, n. 24, p. 6416-6425, 2006.

HO, Y. P.; REDDY, M. Identification of pathogens by mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 525 – 536, 2010.

KEYS et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. **Infection, Genetics and Evolution**, London, v. 4, n. 3, p. 221-242, september 2004.

KOUBEK et al. Whole-cell MALDI-TOF: Rapid screening method in environmental microbiology. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Prague, v. 69, p. 82-86, april 2012.

KUNITSKY C.; OSTERHOUT G.; SASSER M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock® microbial identification system. **Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods**, v. 3, March 2006.

LAY JR, J. O. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. **Trends in analytical chemistry**, Jefferson, v. 19, n. 8, p. 507-516, 2000.

MITSUMA, et al. Promising new assays and Technologies for the diagnosis and management of infectious diseases. **Clinical Infectious Diseases**, Aarau, v.56, n. 7, p. 996-1002, april 2013.

MONIATTE M., VAN DER GOOT F.G., BUCKLEY J.T., PATTUS F., VAN DORSSELAER A. Characterization of the heptameric pore-forming complex of the Aeromonas toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry. **FERS Letters**. Strasbourg, v. 384, nº 33, p. 269-272, april, 1996.

PACHECO, F. L. C. **Identificação bacteriana por derivação de ácidos graxos extraídos de células íntegras**. 2009. 167 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. 780 p.

REES, J. C.; VOORHEES, K. J. Simultaneous detection of two bacterial pathogens using bacteriophage amplification coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 19, p. 2757 – 2761, October 2005.

RUIZ A. M.; CASTRO C. G. S. O. Medicamentos: falando de qualidade. **Associação Brasileira Interdisciplinar de AIDS (ABIA)**. 1 ed. Rio de Janeiro, julho 2008.

SANDLE, T. Automated Microbial Identification: A Comparison of USP and EP Approaches. **American Pharmaceutical Review**, July 05, 2013. Disponível em: <<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/140520-Automated-Microbial-Identification-A-Comparison-of-USP-and-EP-Approaches/>> Acesso em: 10 de julho de 2013.

SAWAYA, A. C. H. Analisadores de Massas: TOF. **Espectrometria de Massas: Princípios e Aplicações**. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br>> Acesso em: 10 de setembro de 2013.

SMOLE et al. Sample preparation of Gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight. **Journal of Microbiological Methods**, Boston, v. 48, n. 1-2, p. 107-115, february 2002.

SOUZA, M. O. **Caracterização fenotípica e molecular de *Bacillus* sp. e gêneros relacionados provenientes de análises de produtos farmacêuticos**. 2011. 161 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

SUTTON, S. V. W.; CUNDELL A. M. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. **Pharmacoepial Forum**, v. 30, n. 5, p. 1884-1894, set./ out. 2004.

WELKERA, M.; MOOREC E. R. B. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. **Systematic and Applied Microbiology**, Germany, v. 34, n. 1, p. 2–11, february 2011.

WIEDMANN, M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 66, n. 5, p. 2085-2095, may 2000.

WILLIAMS, B. H.; HATHOUT, Y.; FENSELAU, C. Structural characterization of lipopeptide biomarkers isolated from *Bacillus globigii*. **Journal of Mass Spectrometry**, Maryland, v. 37, n. 3, p. 259-264, march 2002.