

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n6e1414>

Utilização do MALDI-TOF MS para identificação de micobactérias em amostras clínicas de animais

Cristina Corsi Dib*¹ 

*Pesquisador Científico, Instituto Biológico, São Paulo – SP, Brasil. E-mail: criscdib@sp.gov.br

Resumo. O diagnóstico das enfermidades transmitidas por micobactérias em animais domésticos e selvagens representa um grande desafio à medicina veterinária. Embora o *Mycobacterium bovis*, seja a espécie de maior interesse por causar a tuberculose, as micobactérias não tuberculosas (MNT), também podem causar graves infecções, denominadas micobacterioses, em animais e no homem. As doenças micobacterianas caracterizam-se pelo desenvolvimento granulomatoso crônico e progressivo. O tempo de geração das espécies de crescimento lento pode chegar até vinte horas, fazendo com que seu isolamento em meios de cultura tradicionais, possa demorar até 90 dias para espécies de crescimento lento e aproximadamente seis dias para espécies de crescimento rápido. Além de fastidiosas, as micobactérias possuem parede celular rica em lipídeos e ácidos micólicos, o que dificulta a extração de DNA, interferindo em muitos métodos moleculares utilizados na tentativa de acelerar o diagnóstico. Embora a diferenciação entre as espécies tenha avançado nos últimos anos com a utilização de métodos moleculares mais específicos, em espécies geneticamente muito próximas, este processo ainda é muito desafiador, estimulando-se o desenvolvimento de novas tecnologias. As metodologias de espectrometria de massas como o MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry), têm sido utilizadas como ferramenta de identificação microbiológica em laboratórios clínicos, indústrias alimentícias e hospitais. Neste artigo, serão discutidos os principais aspectos relacionados ao uso desta ferramenta para o diagnóstico de micobactérias provenientes de amostras clínicas de animais.

Palavras chave: Espectrometria de massas, MALDI TOF MS, micobactérias

Use of MALDI-TOF MS for identification of mycobacteria in clinical samples from animals

Abstract. The diagnosis of mycobacterial diseases in domestic and wild animals represents a big challenge in veterinary medicine. Although *Mycobacterium bovis* is the species of major interest for causing tuberculosis, nontuberculous mycobacteria (NTM) can also cause serious infections, named mycobacterioses, in animals and humans. Mycobacterial diseases are characterized by their chronic and progressive granulomatous development. The generation time of slow-growing species can reach up to twenty hours, making their isolation in traditional culture media take up to 90 days for slow-growing species and approximately six days for fast-growing species. In addition to being fastidious, they have a cell wall rich in lipids and mycolic acids, which makes DNA extraction difficult, interfering with many molecular methods used in attempting to speed up diagnoses. Although the differentiation between species has advanced in recent years with the use of more specific molecular methods, in very genetically close species, this process is still quite challenging, stimulating the development of new technologies. Mass spectrometry methodologies like MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry) have been used as a microbiological identification tool

in clinical laboratories, food industries and hospitals. In this article, the main aspects related to the use of this tool for the identification of mycobacteria from animal clinical samples will be discussed.

Keywords: Mass spectrometry, MALDI-TOF MS, mycobacteria

Introdução

O gênero *Mycobacterium* abrange um grande grupo de bacilos aeróbios, imóveis, não esporulados, gram-positivos, álcool-ácido-resistentes do Filo Actinobacteria, Família Mycobacteriaceae (Gupta et al., 2018; Malama et al., 2014). Atualmente estão incluídas 261 espécies e 24 subespécies de acordo com o *List of Prokariotik Names with Standing in Literature* (<http://www.bacterio.net>). As espécies de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* são os agentes etiológicos da tuberculose humana e leprose, respectivamente (Gupta et al., 2018). As micobactérias não tuberculosas (NTM-nontuberculous mycobacteria) englobam todas as outras micobactérias que não pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*. São organismos que residem em ambientes naturais, sendo muitas espécies saprofíticas e algumas consideradas patógenos oportunistas de homens e animais (Malama et al., 2014; Odoi et al., 2020). As NTM podem ser consideradas patógenos de transmissão pela água, pelo ar ou pelo solo (sapronoses) (Pavlik et al., 2022).

As infecções micobacterianas são uma ameaça à saúde dos homens e animais (Didkowska et al., 2021). Entre as micobactérias patogênicas, o *Mycobacterium bovis* e o *Mycobacterium tuberculosis*, são as principais causadoras da tuberculose (Borham et al., 2022). Dentro do complexo *M. tuberculosis*, o *M. bovis*, agente causador da tuberculose bovina, possui um grande espectro de espécies hospedeiras, incluindo o homem, tornando-se um dos principais patógenos bacterianos zoonóticos (Zimpel et al., 2020). É uma doença progressiva crônica que causa um grande impacto econômico, devido às perdas na produtividade, morbidade, mortalidade, condenação de carcaças em abatedouros, embargos ao comércio de produtos no mercado internacional, custos com programa de controle e erradicação e ameaça à saúde pública e de espécies protegidas em risco de extinção (Borham et al., 2022; Carneiro et al., 2019; Krajewska-Wedzina et al., 2018). Do ponto de vista zoonótico, a transmissão para o homem, geralmente ocorre após contato próximo com animais infectados, via aerossóis, que causa a tuberculose pulmonar, ou consumo de produtos lácteos não pasteurizados, onde a doença pode se apresentar na forma extrapulmonar (Borham et al., 2022; Zulu et al., 2021). Os sintomas da doença pulmonar provocada pelo *M. bovis* no homem são clinicamente, radiologicamente e microscopicamente indistinguíveis da doença provocada pelo *M. tuberculosis* (Allix-Béguec et al., 2010). Embora a doença humana causada pelo *M. bovis* seja atualmente mais rara em países desenvolvidos, é um importante problema de saúde pública em regiões onde há falta de medidas de controle e consumo de produtos lácteos sem pasteurização. Mesmo assim, a tuberculose zoonótica pode ser subestimada, já que o diagnóstico comumente utilizado na rotina dos laboratórios não permite a distinção entre as espécies de *M. bovis* e *M. tuberculosis* causando um impacto significativo no manejo do paciente tuberculoso (Allix-Béguec et al., 2010; Borham et al., 2022). Isto acontece, pois, na prática clínica, a tuberculose provocada pelo *M. bovis* só pode ser diferenciada da doença pulmonar causada pelo *M. tuberculosis* quando há diferenciação entre os dois agentes patológicos por meio do uso de testes bioquímicos ou genéticos, necessários para a prescrição do tratamento, que no caso do *M. bovis* consiste em rifampicina, izoniazida e etambutol, uma vez que o mesmo é resistente à pirazinamida, recomendada como primeira linha no tratamento do *M. tuberculosis* (Allix-Béguec et al., 2010; Lan et al., 2016). Portanto, a inexistência de uma identificação específica entre as duas espécies, pode ter consequências graves para pacientes tuberculosos, encorajando fortemente o uso de testes moleculares como rotina nos laboratórios clínicos (Allix-Béguec et al., 2010). Devido aos riscos relacionados à saúde pública, e multidroga resistência, a tuberculose bovina raramente é tratada nos animais, exceto em casos de animais em risco de extinção (Borham et al., 2022).

Embora, historicamente o *M. bovis* e o *M. tuberculosis* tenham se destacado devido a sua relevância na saúde veterinária e humana, atualmente, este papel tem sido atribuído a muitas outras espécies de micobactérias não tuberculosas (Varela-Castro et al., 2017; Varela-Castro et al., 2022). Estas últimas são consideradas patógenos ambientais oportunistas de homens e animais que estão emergindo como um grave problema de saúde pública impactando, principalmente, indivíduos com Síndromes de

Imunodeficiências Adquiridas, como portadores de HIV ([Zulu et al., 2021](#)) e podendo causar alterações em resultados de testes diagnósticos em bovinos, como a tuberculinização intradérmica e a sorologia por ELISA, devido às reações cruzadas entre as diferentes espécies de micobactérias, amplamente distribuídas no meio ambiente, em diversas fontes como água, alimentos, solo, poeira entre outros ([Didkowska et al., 2021](#); [Varela-Castro et al., 2017](#); [Varela-Castro et al., 2022](#)).

As micobactérias do complexo *Mycobacterium avium* são patógenos oportunistas e ubíquos, presentes no ambiente, que podem causar tuberculose em aves, gerando perdas irreparáveis que afetam granjas comerciais, aves exóticas ameaçadas de extinção, animais de cativeiro e domésticos ([Sattar et al., 2021](#)). Entre as micobactérias deste complexo, o *M. avium* spp. *paratuberculosis* (MAP), causa a paratuberculose ou doença de Johne's, caracterizada por uma enterite granulomatosa, que acomete principalmente ruminantes, podendo causar prejuízos econômicos significativos para criadores ([Didkowska et al., 2021](#)). Outras espécies pertencentes ao Complexo *M. avium* também já foram identificadas em animais silvestres e domésticos, embora devido a inexistência de um número relevante de estudos, ainda não se compreenda o impacto destes microrganismos em animais terrestres ou aquáticos, domésticos, selvagens ou de criação ([Varela-Castro et al., 2022](#)).

O manejo do paciente suspeito de infecção bacteriana baseia-se, principalmente, na identificação do patógeno e na melhor opção terapêutica com antibióticos visando reduzir morbidade e mortalidade ([Carbannelle et al., 2011](#)). Todavia, em caso de infecções micobacterianas em animais, o tratamento não é recomendado na maior parte dos casos, devido a ineficiência do tratamento, e riscos relacionados com o surgimento de cepas resistentes, o que poderia desencadear problemas de saúde pública ([Borham et al., 2022](#)). Ainda assim, a identificação de micobactérias é relevante e necessária para ensaios clínicos e estudos epidemiológicos, com foco em estratégias de controle e prevenção de sua transmissão.

As micobactérias não tuberculosas são encontradas no solo e água, no mundo todo. A grande maioria destes organismos não é patogênica para o homem, mas podem se comportar como oportunistas e desta forma ser responsáveis pela doença em condições predisponentes ([Mediavilla-Gradolph et al., 2015](#)).

Diagnóstico e identificação de micobactérias

A identificação convencional de micobactérias em nível de espécie é um processo longo e complicado, baseado em características fenotípicas de crescimento em meio de cultura (desenvolvimento de cor e taxa de crescimento), identificação bioquímica, e utilização de substratos que muitas vezes não permitem uma identificação acurada ([Mediavilla-Gradolph et al., 2015](#)). O estudo microscópico e a cultura de amostras continuam sendo cruciais para o diagnóstico das infecções bacterianas ([Fernández-Esgueva et al., 2021](#)). Todavia, apesar do aprimoramento dos meios de cultura para micobactérias e utilização de técnicas moleculares, a identificação de espécies menos comuns ainda pode ser considerada demorada e difícil ([Cao et al., 2018](#); [Mediavilla-Gradolph et al., 2015](#)).

Nas últimas décadas, a identificação de espécies de micobactérias foi tradicionalmente baseada em testes bioquímicos convencionais e características fenotípicas, como taxa de crescimento e pigmentação. Embora esses testes sejam simples de realizar, são trabalhosos, incômodos e requerem longos períodos de incubação, atrasando assim a identificação micobacteriana imediata e precisa. O advento dos métodos moleculares, como a PCR (Polimerase Chain Reaction), Real Time PCR, Sequenciamento de DNA, entre outras ferramentas, proporcionaram formas rápidas e reprodutíveis de identificação de espécies de micobactérias. Sondas de DNA altamente sensíveis estão disponíveis para o complexo *M. tuberculosis*, complexo *M. avium intracellulare*, *M. kansasii* e *M. goodii*. No entanto, as sondas de DNA para espécies de micobactérias encontradas com menos frequência, muitas vezes tem baixa especificidade gerando erros de identificação. A identificação micobacteriana baseada em 16S rRNA tem sido a principal técnica para estudos taxonômicos moleculares. Outros alvos para identificação de espécies baseada em técnicas moleculares de micobactérias incluem o gene da proteína de choque térmico (hsp65), o gene intergênico entre 16S e 23S e o gene que codifica a subunidade beta de RNA polimerase (rpoB). As técnicas moleculares ajudaram muito a melhorar o tempo de resposta. No entanto, requerem um alto nível de especialização, com altos custos e uma configuração de laboratório especial. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a análise de ácidos micólicos também é usada para identificar micobactérias a partir de cultura; no entanto, esta técnica só está disponível em apenas alguns laboratórios especializados ([Balada-Llasat et al., 2013](#)).

A diferenciação molecular de espécies de micobactérias não tuberculosas (MNT) tem levado a avanços recentes, principalmente, devido ao reconhecimento da importância dessas bactérias com potencial patogênico. Estudos de métodos e marcadores moleculares, que discriminem as espécies de MNT, são escassos na literatura científica, apesar de sua importância para a definição diagnóstica rápida dessa infecção e impacto causado para a saúde pública ([Peixoto et al., 2020](#)). Apesar da facilidade de uso e rapidez nos resultados de métodos moleculares, além dos problemas relacionados a diferenciação entre espécies de micobactérias, o processo de extração do DNA, alvo da maior parte dos ensaios moleculares ainda constitui um entrave. Isto acontece devido às características inerentes às próprias lesões provocadas por micobactérias. Muito embora elas possam ocorrer em qualquer órgão ou tecido, o granuloma é considerado a lesão patognomônica da tuberculose e de outras micobacterioses. Sua formação representa uma tentativa do hospedeiro em isolar e conter a micobactéria, bem como para limitar mais danos nos tecidos circundantes, amortecendo a inflamação crônica ([Carrisoza-Urbina et al., 2019](#)). Assim, a aplicação de métodos moleculares em espécimes clínicos suspeitos de infecção micobacteriana, encontra uma série de problemas, como a parede celular micobacteriana complexa, a presença da célula bacteriana dentro de um fagossomo, uma célula hospedeira e um granuloma e a baixa quantidade de células bacterianas ou DNA ([Kumar et al., 2010](#); [Radomski et al., 2013](#)). Além disso, substâncias inibitórias presentes nas amostras ou nos reagentes usados durante a extração de DNA, e um excesso de DNA do hospedeiro em comparação com o DNA alvo do patógeno, também pode dificultar sua detecção em espécimes clínicos ([Park et al., 2014](#)). Desta forma, a identificação e a diferenciação entre as espécies de micobactérias ainda representam desafios para clínicos e epidemiologistas, e, portanto, estudos de novas ferramentas devem ser estimulados.

Espectrometria de massas MALDI-TOF MS

A espectrometria (MALDI-TOF MS) emergiu como uma ferramenta rápida, poderosa e relativamente barata que está sendo cada vez mais utilizada para a identificação de bactérias e leveduras no ambiente do laboratório clínico. É um método de determinação precisa de massas moleculares ([Cunha et al., 2006](#)) utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas ([Assis et al., 2011](#)), que vem se consolidando como ferramenta insubstituível na determinação de estruturas químicas ([Cunha et al., 2006](#)). É uma ferramenta física que caracteriza as moléculas pela medida da razão massa/carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa ([Ferreira, 2019](#)), já bastante utilizada pela física e pela química, cuja base teórica já foi estabelecida ao longo de um século de estudos ([Griffiths, 2008](#)). Inicialmente usada para determinação de estruturas químicas apenas em compostos de baixa massa molecular e voláteis, a partir dos anos 80, o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais especializados e técnicas mais brandas de ionização, como MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization – time off light) e ESI (electrospray ionization), permitiu a análise de moléculas de peso molecular elevado como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, sem decorrer na decomposição destes analitos, podendo ser empregado na proteômica, para caracterização de biomoléculas e posteriormente na microbiologia para classificação e identificação de microrganismos por meio da obtenção de espectros de massa de bactérias ([Assis et al., 2011](#); [Cunha et al., 2006](#)).

O MALDI-TOF MS é uma ferramenta poderosa em uma variedade de campos porque realiza a determinação do peso molecular e a caracterização estrutural das macromoléculas de forma rápida, fácil, com alta sensibilidade e ampla faixa de massa detectável. A complexidade do analito e contaminações aumentam as chances de supressão de sinais pelo MALDI. O sucesso depende muito do tipo de matriz e da preparação apropriada da amostra antes da sua análise. A diminuição dos contaminantes com um pré-tratamento adequado melhora a qualidade do espectro de massa das amostras-alvo ([Pan et al., 2007](#)).

Um espectrômetro de massa é formado pelo sistema de ionização das moléculas, responsável por vaporizá-las e carregá-las eletricamente, um analisador de massa, que separa os íons resultantes de acordo com a massa ([Cunha et al., 2006](#)), um detector destes íons e um sistema de aquisição dos dados ([Assis et al., 2011](#); [Melo, 2014](#)).

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 identificação dos analitos, os picos de espectro são comparados com um banco de dados, contendo as impressões digitais de cada molécula ([Melo, 2014](#)).

Utilização da espectrometria de massas MALDI TOF MS no diagnóstico microbiológico

O uso da proteômica e sua aplicação no diagnóstico rápido da etiologia de infecções é um grande avanço tecnológico e é, primariamente, representado pela utilização da metodologia de espectrometria de massa, MALDI-TOF MS, na identificação microbiológica ([Ferreira, 2019](#)).

O MALDI-TOF MS é uma das ferramentas mais utilizadas como método de espectrometria de massas aplicado na identificação de microrganismos em amostras clínicas ([Tsuchida et al., 2020](#)). Este sistema realiza o processo de identificação de bactérias, leveduras, neoplasias e fungos num curto período de tempo, tornando-se uma ferramenta rápida e confiável, para a classificação e identificação de microrganismos, podendo ser aplicado em diagnóstico clínico, pesquisa, taxonomia e na qualidade de processamento dos alimentos ([Almeida et al., 2022](#); [Maier et al., 2006](#)). Neste sistema, o material biológico, como colônias da bactéria a ser identificada é colocado em uma placa em que há uma matriz polimérica ([Pasternak, 2012](#)). A matriz química penetra na parede celular e torna as proteínas intracelulares acessíveis para análise, facilitando a produção de íons intactos em fase gasosa a partir de proteínas, oligo nucleotídeos, polímeros sintéticos e compostos orgânicos pesados. A qualidade do espectro depende da escolha de muitos parâmetros, como a natureza da matriz e suas propriedades físicas e químicas como a absorvância eficiente no comprimento de onda do laser, ionização eficiente e estabilidade. A escolha da matriz também depende da natureza da amostra a ser estudada. Alguns exemplos de matrizes muito utilizadas são o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (ácido gentísico) (DHB), ácido 3,5 – dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico) e α -ciano-4-hidroxicinâmico acid (CHCA). Em geral o DHB é mais eficiente para o estudo de componentes de massa molecular menores, como oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas e o ácido sinapínico e CHCA para o estudo de proteínas ([Melo, 2014](#)). A escolha da matriz primária utilizada para identificação bacteriana é a α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), que funciona absorvendo a energia do feixe de laser irradiado, promovendo a ionização branda da amostra pela doação de prótons, e desta forma prevenindo sua fragmentação ([Melo, 2014](#); [Tsuchida et al., 2020](#)). A matriz química penetra na parede celular, tornando as proteínas intracelulares acessíveis para análise. Desta forma, facilita com que íons intactos em fase gasosa sejam produzidos ([Melo, 2014](#)). A dessorção das moléculas de matriz e de proteína faz com que elas passem para o estado gasoso, o que é uma condição para que uma molécula possa ser analisada por espectrometria de massa ([Cunha et al., 2006](#)).

As moléculas ionizadas e em estado gasoso são então aspiradas no tubo de vácuo e levadas a um detector (time off light – TOF), onde de acordo com o tempo de chegada de cada molécula ao detector, serão gerados picos plotados em gráficos que caracterizam os diferentes perfis de cada espécie de microrganismo. Desta forma uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado ([Pasternak, 2012](#)). O MALDI-TOF MS atua captando impressões digitais espectrais de massa características, que são exclusivas de cada microrganismo, o que faz dele um método de identificação microbiológica confiável. Portanto, a principal aplicação de MALDI-TOF MS em laboratórios clínicos é na identificação clínica de microrganismos após o cultivo ([Almeida et al., 2022](#)). Assim, é atualmente um dos métodos mais utilizados na identificação de microrganismos em amostras clínicas. Entre suas vantagens, a identificação de microrganismos por esta ferramenta é conveniente, rápida, e acurada além de ter um bom custo benefício ([Tsuchida et al., 2020](#)).

Apesar do alto custo inicial para aquisição do equipamento e dos reagentes, o potencial do sistema em diminuir o fluxo de trabalho e tempo das equipes envolvidas no diagnóstico, a redução de reagentes e custos de suprimentos, a melhora na qualidade de resultados e diminuição no tempo para diagnóstico, são fatores que devem ser considerados. Além disso, a mesma tecnologia pode ser utilizada por múltiplos departamentos dentro de uma mesma instituição, o que possibilita a divisão dos custos para aquisição do aparelho, manutenção, reagentes, suprimentos e treinamentos ([APHL, 2019](#)).

A segurança também deve ser um dos fatores considerados na aquisição desta tecnologia. Avaliação de riscos biológicos e validação de métodos de inativação devem ser realizados, principalmente quando o equipamento é multiusuário, de acesso a mais de um departamento. Cada laboratório é responsável por conduzir a avaliação de riscos associados com o sistema, na manipulação de micobactérias, e treinar sua equipe para uso do equipamento, e manipulação das micobactérias de forma segura ([APHL, 2019](#)).

Para identificação das amostras bacterianas, é necessário que elas sejam cultivadas em meios de cultura, onde uma colônia é selecionada e espalhada em uma placa-alvo MALDI. É necessário acrescentar um solvente a esse esfregaço, que será capaz de extrair a maioria das proteínas bacterianas para a medição do MALDI-TOF. O tamanho e a sequência dessas proteínas, a maioria proteínas ribossomais, são bem específicas nas espécies, o que permite identificar e diferenciar as diferentes cepas ([Almeida et al., 2022](#)).

Do ponto de vista do laboratório clínico, uma grande vantagem do MALDI-MS é sua simplicidade ([Duncan & DeMarco, 2019](#)). As amostras são aplicadas à placa de MALDI misturadas com uma matriz para que ocorra sua cristalização. A composição da matriz varia de acordo com a biomolécula a ser analisada e o tipo de laser ([Almeida et al., 2022](#)). Após a secagem do conjunto matriz e amostra na placa, as mesmas são introduzidas no espectrômetro de massas e irradiadas com laser. As moléculas da matriz absorvem a energia do laser e ionizam em conjunto com a amostra, fazendo com que os componentes sejam desorvidos ou suavemente ionizados. Desta forma, são separados de acordo com o valor da razão massa/carga no TOF e assim detectados pelo espectrômetro. Uma vez que a placa é introduzida no instrumento e colocada sob vácuo, cada ponto da placa é analisado sequencialmente, em poucos segundos por amostra ([Duncan & DeMarco, 2019](#)). Os resultados do MALDI-TOF MS podem ser obtidos de forma mais rápida do que os obtidos na PCR ou no sequenciamento de DNA. Embora o investimento inicial para aquisição do equipamento de MALDI-TOF MS e o banco de dados de identificação microbiológica seja considerado alto, o investimento pode ser recuperado em poucos anos, pois a longo prazo, o uso deste equipamento na rotina torna-se mais econômico quando comparado com métodos moleculares ([Bacanelli et al., 2019](#)).

O método primário recomendado para obtenção da identificação bacteriana a partir de colônias é feito pelo esfregaço direto da colônia selecionada do meio de cultura na placa de MS, adição da matriz polimérica e secagem até a leitura no aparelho. Este método funciona muito bem para bactérias Gram-negativas e bastonetes; porém a identificação de bactérias gram-positivas e leveduras é bem mais desafiadora devido a diferenças na estrutura intrínseca da parede celular que dificulta a extração das proteínas e fornece informação insuficiente de espectros requeridos para sua identificação. Nestes casos, para promover a destruição da parede celular, após o esfregaço da colônia na placa, é adicionado ácido fórmico para extração ácida, com o objetivo de aumentar a probabilidade de uma identificação mais acurada. Por fim, quando não se obtém espectro de massa suficiente devido à pequena quantidade de proteína extraída, há a necessidade de utilização do método de extração em tubo, que combina o tratamento de etanol, seguido da extração proteica com ácido fórmico e acetronitrila ([Tsuchida et al., 2020](#)). Em contraste com outros grupos de bactérias, há uma grande variação na acurácia da identificação de espécies de micobactérias. Isto ocorre devido à grande quantidade de ácidos micólicos presentes em sua parede celular, que resulta em uma estrutura hidrofóbica e outras variáveis, como os procedimentos de extração, que podem ser realizados na célula inteira ou em extratos celulares, variações nas taxas de crescimento de cada estirpe, características do meio de cultivo (líquido, sólido, adição de suplementos); número de replicatas (quanto maior o número maior a probabilidade de identificação) e na própria variação entre os espectrômetros disponíveis no mercado ([Cao et al., 2018](#)). Em casos de nocardia e bactérias álcool-ácidas como as micobactérias, além da extração em tubo, a homogeneização com esferas de sílica pode promover a quebra da de modo mais eficiente, aumentando as proteínas bacterianas extraídas ([Tsuchida et al., 2020](#)).

O MALDI-TOF MS tem como grande ganho, melhorar a identificação de fungos (leveduras e filamentos) e micobactérias, que tradicionalmente tem sido os microrganismos mais difíceis para identificação. Portanto é uma excelente alternativa diagnóstica aos laboratórios clínicos na identificação de micobactérias, devido a sua simplicidade e grande número de espécies incluídas no seu banco de dados. Estudos prévios têm demonstrado que o MALDI-TOF é capaz de identificar micobactérias com acurácia, tanto do complexo *M. tuberculosis* quanto micobactérias não tuberculosas. Algumas diferenças podem ocorrer dependendo do meio de cultura utilizado, tempo de crescimento das colônias, protocolo de extração aplicado à micobactéria, ou biblioteca utilizada na identificação ([Mediavilla-Gradolph et al., 2015](#)).

Considerações finais

A identificação de micobactérias é até hoje considerada um grande desafio para laboratórios clínicos destinados ao homem e a espécies animais. O MALDI-TOF é considerado uma ferramenta rápida, fácil, de baixo custo de reagentes e com menor manipulação de amostras, o que implica em menor contaminação das amostras com outros agentes e menor risco de transmissão de micobactérias para técnicos laboratoriais. Desta forma, é considerada uma ferramenta adequada e confiável para identificação rápida de micobactérias em laboratórios clínicos e de pesquisa.

Referências bibliográficas

- Allix-Béguet, C., Fauville-Dufaux, M., Stoffels, K., Ommeslag, D., Walravens, K., Saegerman, C. & Supply, P. (2010). Importance of identifying *Mycobacterium bovis* as a causative agent of human tuberculosis. *European Respiratory Journal*, 35(3), 692–694. <https://doi.org/10.1183/09031936.00137309>.
- Almeida, A. L. P., Totola, G. O. H., Pimentel, J. & Júnior, P. S. A. (2022). *MALDI-TOF: importância e aplicabilidade na microbiologia hospitalar*.
- APHL. (2019). *Association of Public Health Laboratories. Infectious diseases: Best practices for identification of Mycobacterium species using matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry*.
- Assis, D. M., Juliano, L. & Juliano, M. A. (2011). A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2011.92.344355>. *Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde*, 9(2), 344–355. <https://doi.org/10.5892/ruvrv.2011.92.344355>.
- Bacanelli, G., Olarte, L. C., Silva, M. R., Rodrigues, R. A., Carneiro, P. A. M., Kaneene, J. B., Pasquatti, T. N., Takatani, H., Zumarraga, M. J. & Etges, R. N. (2019). Matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry identification of *Mycobacterium bovis* in Bovinae. *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(10), 1400–1408. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0214>.
- Balada-Llasat, J. M., Kamboj, K. & Pancholi, P. (2013). Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), 2875–2879. <https://doi.org/10.1128/jcm.00819-13>.
- Borham, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., Hegazy, Y., Khalifa, H. O., Al-Gaabary, M. & Matsumoto, T. (2022). Review on bovine tuberculosis; na emerging disease associated with multidrug-resistant *Mycobacterium* species. *Pathogens*, 11(715), 2–25. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070715>.
- Cao, Y., Wang, L., Ma, P., Fan, W., Gu, B. & Ju, S. (2018). Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of mycobacteria: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1042/BSR20190859>.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J., Ferroni, A., Gutmann, L. & Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Bio Tribune Magazine*, 39, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>.
- Carneiro, P. A. M., Takatani, H., Pasquatti, T. N., Silva, C. B. D. G., Norby, B., Wilkins, M. J., Zumarraga, M. J., Araujo, F. R. & Kaneene, J. B. (2019). Epidemiological study of *Mycobacterium bovis* infection in buffalo and cattle in Amazonas, Brazil. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 434. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00434>.
- Carrisoza-Urbina, J., Morales-Salinas, E., Bedolla-Alva, M. A., Hernández-Pando, R. & Gutiérrez-Pabello, J. A. (2019). Atypical granuloma formation in *Mycobacterium bovis*-infected calves. *PLoS One*, 14(7), e0218547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218547>.
- Cunha, R. B., Castro, M. de S. & Fontes, W. (2006). Espectrometria de massa de proteínas. *Bioteχνologia Ciência & Desenvolvimento*, 36, 40–46.
- Didkowska, A., Krajewska-Wędzina, M., Klich, D., Prolejko, K., Orłowska, B. & Anusz, K. (2021). The Risk of False-Positive Serological Results for Paratuberculosis in *Mycobacterium bovis*-Infected Cattle. *Pathogens*, 10(8), 1054. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081054>.

- Duncan, M. & DeMarco, M. L. (2019). Maldi-Ms: emerging roles in pathology and laboratory medicine. *Clinical Mass Spectrometry*, 13, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2019.05.003>.
- Fernández-Esgueva, M., Fernández-Simon, R., Monforte-Cirac, M. L., López-Calleja, A. I., Fortuño, B. & Viñuelas-Bayon, J. (2021). Use of MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) for identification of Mycobacterium species isolated directly from liquid medium. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 39(5), 241–243. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.05.011>.
- Ferreira, M. M. C. (2019). *Espectrometria de Massa (MADI-TOF MS) aplicada ao laboratório de microbiologia clínica: Uma revisão bibliográfica*. Universidade Federal Fluminense.
- Griffiths, J. (2008). Una breve história de la espectrometría de masas. *Analytical Chemistry*, 80(15), 5678–5683. <https://doi.org/10.1021/ac8013065>.
- Gupta, R. S., Lo, B. & Son, J. (2018). Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*, 9, 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>.
- Krajewska-Wedzina, M., Augustynowicz-Kopec, E., Weiner, M. & Szulowski, K. (2018). Treatment for active tuberculosis in giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in a Zoo and potential consequences for public health-case report. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(4), 593–595. <https://doi.org/10.26444/aaem/75685>.
- Kumar, D., Nath, L., Kamal, M. A., Varshney, A., Jain, A., Singh, S. & Rao, K. V. S. (2010). Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of Mycobacterium tuberculosis. *Cell*, 140(5), 731–743. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.012>.
- Lan, Z., Bastos, M. & Menzies, D. (2016). Treatment of human disease due to Mycobacterium bovis: a systematic review. *European Respiratory Journal*, 48(5), 1500–1503. <https://doi.org/10.1183/13993003>.
- Maier, T., Klepel, S., Renner, U. & Kostrzewa, M. (2006). *Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification*. Nature Publishing Group US New York.
- Malama, S., Munyeme, M., Mwanza, S. & Muma, J. B. (2014). Isolation and characterization of nontuberculous mycobacteria from humans and animals in Namwala District of Zambia. *BMC Research Notes*, 7(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-622>.
- Mediavilla-Gradolph, M. C., Toro-Peinado, D., Bermúdez-Ruiz, M. P., García-Martínez, M. de los Á., Ortega-Torres, M., Montiel Quezel-Guerraz, N. & Palop-Borrás, B. (2015). Use of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous Mycobacterium species isolated from clinical specimens. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/854078>.
- Melo, L. F. (2014). *A utilização da espectrometria de massa MALDI-TOF na identificação de microrganismos no controle de qualidade farmacêutico*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Odoi, J. O., Ohya, K., Moribe, J., Takashima, Y., Sawai, K., Taguchi, K., Fukushi, H., Wada, T., Yoshida, S. & Asai, T. (2020). Isolation and antimicrobial susceptibilities of nontuberculous Mycobacteria from wildlife in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(4), 851–862. <https://doi.org/10.7589/2019-10-261>.
- Pan, C., Xu, S., Zhou, H., Fu, Y., Ye, M. & Zou, H. (2007). Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 193–204. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0905-4>.
- Park, S.-Y., Jang, S.-H., Oh, S.-O., Kim, J. A. & Hur, J.-S. (2014). An easy, rapid, and cost-effective method for DNA extraction from various lichen taxa and specimens suitable for analysis of fungal and algal strains. *Mycobiology*, 42(4), 311–316. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.4.311>.
- Pasternak, J. (2012). Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. *Einstein*, 10(1), 118–119. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082012000100026>.
- Pavlik, I., Ulmann, V. & Falkinham III, J. O. (2022). Nontuberculous Mycobacteria: Ecology and Impact on Animal and Human Health. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 8, p. 1516). MDPI. <https://doi.org/103390/microorganisms10081516>.
- Peixoto, A. S., Montenegro, L. M. L., Lima, A. S., Melo, F. L., Barbosa Júnior, W. L., Neves, M. M. C., Ramos, J. P., Schindler, H. C. & Medeiros, Z. M. (2020). Identification of nontuberculous

- mycobacteria species by multiplex real-time PCR with high-resolution melting. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20200211. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0211-2020>.
- Radomski, N., Kreitmann, L., McIntosh, F. & Behr, M. A. (2013). The critical role of DNA extraction for detection of mycobacteria in tissues. *PLoS One*, 8(10), e78749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078749>.
- Sattar, A., Zakaria, Z., Abu, J., Aziz, S. A. & Rojas-Ponce, G. (2021). Isolation of Mycobacterium avium and other nontuberculous mycobacteria in chickens and captive birds in peninsular Malaysia. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02695-8>.
- Tsuchida, S., Umemura, H. & Nakayama, T. (2020). Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules*, 25(20), 4775. <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>.
- Varela-Castro, L., Barral, M., Arnal, M. C., Fernández de Luco, D., Gortázar, C., Garrido, J. M. & Sevilla, I. A. (2022). Beyond tuberculosis: Diversity and implications of non-tuberculous mycobacteria at the wildlife–livestock interface. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), e2978–e2993. <https://doi.org/10.1111/tbed.14649>.
- Varela-Castro, L., Lara-Vergara, J., Ortega, N., Salinas, J., Colom-Cadena, A., Lavín, S., Tizzani, P., Velarde, R., Serrano, E. & Mentaberre, G. (2017). Endemic caseous lymphadenitis in a wild Caprinae population. *Veterinary Record*, 180(16), 405.
- Zimpel, C. K., Patané, J. S. L., Guedes, A. C. P., Souza, R. F., Silva-Pereira, T. T., Camargo, N. C. S., de Souza Filho, A. F., Ikuta, C. Y., Neto, J. S. F. & Setubal, J. C. (2020). Global distribution and evolution of Mycobacterium bovis lineages. *Frontiers in Microbiology*, 11, 843. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00843>.
- Zulu, M., Monde, N., Nkhoma, P., Malama, S. & Munyeme, M. (2021). Nontuberculous mycobacteria in humans, animals, and water in Zambia: a systematic review. *Frontiers in Tropical Diseases*, 2, a679501. <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.679501>.

Histórico do artigo:**Recebido:** 16 de junho de 2023**Aprovado:** 27 de junho de 2023**Licenciamento:** Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.