



ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Aspergillus* spp.

Pamela Tymniak^{1*}, Vanessa Rodrigues Bezerra¹, Melyssa Negri¹

¹ Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, PR, Brasil.

*pamelatymniak@gmail.com

Área Temática: Doenças infecciosas e parasitárias

Resumo

O gênero *Aspergillus* compreende várias espécies oportunistas sendo um dos patógenos fúngicos com destaque mundial, perdendo apenas para *Candida* nas infecções fúngicas. Causando um amplo espectro de infecções, variando de aspergilose alérgica a invasiva. A identificação de *Aspergillus* spp. pela cultura é um processo laborioso e novas técnicas são necessárias. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial da espectrometria de massa com tempo de voo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) na identificação de *Aspergillus* spp. na rotina clínica. Podemos verificar que a identificação macro e micromorfológica dos três isolados clínicos permitiu identificar as espécies dos isolados e o MALDI-TOF MS confirmou estas informações. Apesar de serem escassos registros de atualizações do banco de dados para espécies de *Aspergillus* no software do MALDI-TOF, podendo acarretar em uma limitação para a identificação de espécies crípticas anteriormente desconhecidas. O MALDI-TOF se provou uma importante técnica de identificação, possibilitando quando correlacionada com a rotina a identificação do isolado mais rápido e precisa, viabilizando um tratamento eficaz e assertivo do paciente.

Palavras-chave: MALDI-TOF; *Aspergillus*; Espécies Críticas.

Introdução

Aspergillus spp. são fungos filamentosos, onipresentes no meio ambiente, capazes de causar infecções principalmente no trato respiratório humano, podendo evoluir para aspergilose invasiva (AI) (Yusuf *et al.*, 2021). A aspergilose está associada frequentemente com *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* (Masih *et al.*, 2016). Pacientes internados por longos períodos relacionados com AI e o progressivo aumento da resistência aos antifúngicos, sobretudo aos compostos azólicos são alarmantes (Franconi *et al.*, 2024). Recentemente a alta taxa de mortalidade somada ao aumento da resistência acarretou na entrada do *Aspergillus fumigatus* na lista de patógenos fúngicos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Coordination *et al.*, 2022). A identificação de *Aspergillus* spp. pela cultura é um processo laborioso e novas técnicas são necessárias para acelerar este processo (Sanguinetti & Posteraro, 2014). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial da espectrometria de massa com tempo de voo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) na identificação de *Aspergillus* spp. na rotina clínica.



Materiais e métodos

Foram estudados três isolados clínicos do gênero *Aspergillus* provenientes de secreção de ouvido, aspirado de ouvido e cânula metálica interna, respectivamente. Antes dos ensaios experimentais, os isolados foram reativados em ágar Sabouraud Dextrose (SDA), para confirmar a pureza das colônias. Os isolados foram identificados de acordo com a macromorfologia (tipo de borda, crescimento radial, cor e textura da colônia) e micromorfologia (características das hifas, conidióforo e conídios) (de Hoog *et al.*, 2021). A identificação por MALDI-TOF MS, foi realizada a partir do crescimento dos isolados em SDA e ágar batata, incubados por 5 dias a 35 °C. Uma pequena porção das hifas foram suspensas em 300 µL de água e 900 µL de etanol. Após a centrifugação por 3 minutos a 10.000 rpm, foi desprezado o sobrenadante e adicionado 50 µL de ácido fórmico 70% e 50 µL de acetoneitrila. Depois de centrifugar novamente foi pipetado 1 µL do sobrenadante sobre a lâmina acrílica em quatro poços e após secar 1 µL de matriz foi adicionado. A lâmina foi processada usando o espectrômetro de massa (Vitek® MS, BioMérieux, France) e a interpretação dos dados foi realizada com o software Myla (Zvezdanova *et al.*, 2022; Malacrida *et al.*, 2023).

Resultados e discussão

Os dois isolados de *A. fumigatus* desenvolveram colônias verdes com bordas nítidas, aspecto pulverulento e reverso creme. Já o isolado de *A. niger* apresentou em um primeiro momento um micélio aéreo branco e algodinoso, porém com o amadurecimento da colônia os conídios ficaram pretos com aspecto granuloso, sendo o reverso da colônia castanho escuro. Além disso, os três isolados apresentaram características micromorfológicas de conidióforo, vesícula e conídios condizentes com as espécies identificadas. Por último, todas as cepas foram confirmadas por MALDI-TOF MS com similaridade de 99,9%.

Tabela 1 - Identificação dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Isolado	Amostra	Identificação clínica	Identificação MALDI-TOF
272	Secreção de ouvido	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> complex
2AF114	Aspirado de ouvido	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
P04CIF1	Cânula metálica interna	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Conforme a Tabela 1, podemos verificar que a identificação macro e micromorfológica permitiu identificar as espécies dos isolados e o MALDI-TOF MS confirmou estas informações. Apesar de Masih *et al.* (2016) ressaltar a importância do sequenciamento genético para identificação de espécies críticas, o MALDI-TOF MS tornou-se o meio confiável de identificação fúngica, devido à sua alta precisão. A associação de um técnico experiente, protocolos bem executados e o MALDI-TOF permitiram que o laboratório de rotina identificasse com eficiência e rapidez várias espécies de *Aspergillus*. No entanto, Franconi *et al.* (2024) aponta que existem poucos registros de atualizações do banco de dados para espécies de *Aspergillus* nos software e isso pode ser um limitante para a identificação de espécies críticas anteriormente desconhecidas.

Conclusões

Os resultados apresentados pelo MALDI-TOF comprovam a eficácia e segurança dessa técnica. Apesar do equipamento ser caro, quando utilizado em rede o custo é baixo e fácil de ser executado. Viabilizando o uso em associação com as técnicas



clássicas da rotina de um laboratório clínico. Além disso, levando em conta a epidemiologia de cada região, o número de cepas da espécie *Aspergillus* deve ser ampliada nos bancos de dados do MALDI-TOF MS para potencializar a identificação de cepas pertencentes a complexos provenientes deste gênero fúngico, a fim de maximizar a utilização do MALDI-TOF MS na clínica.

Agradecimentos

Agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 - pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

Referências

COORDINATION, Global *et al.* WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2022.

de Hoog *et al.* **Atlas of Clinical Fungi: The ultimate benchtool for diagnostics**. 4 Edn. Ulltrecht, NL: Fungal Biodiversity Center CBS-KNAW, 2021.

FRANCONI, Iacopo *et al.* Hospital distribution, seasonality, time trends and antifungal susceptibility profiles of all *Aspergillus* species isolated from clinical samples from 2015 to 2022 in a tertiary care hospital. **BMC microbiology**, v. 24, n. 1, p. 111, 2024.

MALACRIDA, Amanda Milene *et al.* Hospital *Trichosporon asahii* isolates with simple architecture biofilms and high resistance to antifungals routinely used in clinical practice. **Journal of Medical Mycology**, v. 33, n. 2, p. 101356, 2023.

MASIH, Aradhana *et al.* Identification by molecular methods and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and antifungal susceptibility profiles of clinically significant rare *Aspergillus* species in a referral chest hospital in Delhi, India. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2354-2364, 2016.

SANGUINETTI, Maurizio; POSTERARO, Brunella. MALDI-TOF mass spectrometry: any use for *Aspergillus*?. **Mycopathologia**, v. 178, p. 417-426, 2014.

YUSUF, Erlangga *et al.* *Aspergillus* in critically ill COVID-19 patients: a scoping review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 11, p. 2469, 2021.

ZVEZDANOVA, Margarita Estreya *et al.* Detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* complex isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 28, n. 2, p. 260-266, 2022.