

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

TIAGO FOLLMANN PERIN

**IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella sp.* E *Listeria monocytogenes* UTILIZANDO A  
TÉCNICA DE MALDI-TOF**

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

TIAGO FOLLMANN PERIN

**IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella sp.* E *Listeria monocytogenes* UTILIZANDO A  
TÉCNICA DE MALDI-TOF**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Química Industrial do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Tania Mara Pizzolato

Co-orientadora: Profa. Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Perin, Tiago Follmann  
Identificação de Salmonella sp. e Listeria  
monocytogenes utilizando a técnica de MALDI-TOF /  
Tiago Follmann Perin. -- 2021.  
48 f.  
Orientadora: Tania Mara Pizzolato.

Coorientadora: Livia Kmetzsch Rosa e Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Química, Curso de Química Industrial, Porto Alegre,  
BR-RS, 2021.

1. Identificação de microrganismos. 2. MALDI-TOF.  
3. Salmonella sp. 4. Listeria monocytogenes. I.  
Pizzolato, Tania Mara, orient. II. Silva, Livia  
Kmetzsch Rosa e, coorient. III. Título.

Tiago Follmann Perin

**Identificação de *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* Utilizando a Técnica de MALDI-TOF**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Química Industrial do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Tania Mara Pizzolato

Co-orientadora: Profa. Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva

**Aprovado em:** Porto Alegre, 22 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Tania Mara Pizzolato  
Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profa. Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva  
Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dr. Charley Christian Staats  
Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profa. Dra. Eliana Weber de Menezes  
Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Maria Inês e Valdemar e ao meu irmão Léo, por todo apoio e amor ao longo de toda a vida, em especial ao longo desses anos de graduação. Sem vocês, eu com certeza não estaria onde e como estou. Agradeço imensamente também minhas tias Leda e Terezinha e ao meu tio João por estenderem e definirem o significado de família ao longo desse tempo.

Às minhas orientadoras Livia e Tania, agradeço muito pela disposição em orientar o trabalho e pelas contribuições ao longo do desenvolvimento.

Aos meus amigos e minhas amigas, em especial Alice, Ana Paula, Camila, Daniela, Diego, Elaine, Franciele, Gabriela, Girrezi, Gustavo, Marcela, Victoria e Walquiria, por tudo que a gente já viveu, riu e chorou e juntos. Vocês todos fazem a vida ter um pouco mais de brilho e felicidade e têm um lugar muito especial no meu coração.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do LFDA-RS, pela troca e ajuda constante ao longo desses 7 anos e principalmente ao longo da execução desse trabalho.

## RESUMO

O trabalho teve por objetivo a verificação de desempenho de métodos já validados para a identificação de culturas de *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos utilizando a técnica de MALDI-TOF, bem como a comparação dos impactos econômico, ambiental e de desempenho temporal com a implementação dessa metodologia. Esse processo foi feito de acordo com a norma ISO 16140-3:2021. Seguindo esse protocolo, o método alternativo utilizando espectrometria de massas foi comparado com as metodologias microbiológicas tradicionais (normas ISO 6579-1:2017 e ISO 11290-1:2017, respectivamente para cada microrganismo) quanto ao resultado obtido na identificação de 10 culturas: 5 pertencentes ao grupo alvo e 5 interferentes do isolamento. Obteve-se total concordância entre os métodos alternativo e de referência para a identificação dos dois grupos de microrganismos, evidenciando que o método utilizando MALDI-TOF tem desempenho metrológico comparável à metodologia microbiológica tradicional. Utilizando a técnica de MALDI-TOF, o processo de identificação necessita de menor tempo de análise, gera menor volume de resíduos e tem um gasto menor de consumíveis, quando comparada com os métodos de referência; entretanto, demanda um investimento inicial elevado para a aquisição do equipamento e para a implementação do método.

**Palavras-chave:** Identificação. *Salmonella sp.* *Listeria monocytogenes*. MALDI-TOF.

## ABSTRACT

The aim of this work was to verify the performance of already validated methods for the identification of *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes* isolates from food products using the MALDI-TOF technique, as well as the comparison of economic, environmental and temporal performance impacts with the implementation of this methodology. This process was executed in accordance with the ISO 16140-3:2021 standard. Using this protocol, the alternative method using mass spectrometry was compared with the traditional microbiological methodologies (ISO 6579-1:2017 and ISO 11290-1:2017 standards, respectively for each microorganism) about the result obtained in the identification of 10 cultures: 5 belonging to the target group and 5 interferers from the isolation. Total agreement was obtained between the alternative and reference methods for the identification of the two groups of microorganisms, showing that the method using MALDI-TOF has a metrological performance comparable to the traditional microbiological methodology. Using the MALDI-TOF technique, the identification process requires less analysis time, generates less waste and has a lower cost of consumables, when compared to reference methods; however, it demands a high initial investment for the acquisition of equipment and implementation of the method.

**Keywords:** Identification. *Salmonella sp.* *Listeria monocytogenes*. MALDI-TOF.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Testes de caracterização fenotípica de <i>Salmonella sp.</i> conforme ISO 6579-1:2017 .....	15
Tabela 2 – Testes de caracterização fenotípica de <i>Listeria monocytogenes</i> conforme ISO 11290-1:2017 .....	16
Tabela 3 – Métodos de referência e validados para a identificação de microrganismos.....	19
Tabela 4 – Cepas utilizadas para avaliação dos parâmetros de inclusividade e seletividade...	24
Tabela 5 - Resultados dos testes bioquímicos para identificação de <i>Salmonella sp.</i> ....	25
Tabela 6 – Resultados dos testes bioquímicos para identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	26
Tabela 7 – Resultados de identificação de <i>Salmonella sp.</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> utilizando MALDI-TOF pelo protocolo de transferência direta. ....	27
Tabela 8 – Resultados de identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> utilizando MALDI-TOF pelo protocolo de extração.....	28
Tabela 9 - Resíduos gerados nas técnicas de identificação para 500 culturas de microrganismos. ....	30
Tabela 10 – Custos de reagentes para o teste de 500 culturas de pelos métodos tradicionais e de MALDI-TOF.. ....	32



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de ionização por MALDI em uma proteína.....	14
Figura 2 – Espectro de massas normalizado de cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> obtido pelo método de transferência direta.....	18
Figura 3 – Espectro de massas normalizado de cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> obtido pelo método de extração.....	19
Figura 4 – Fluxograma do protocolo de identificação de microrganismos .....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
HCCA	ácido $\alpha$ -ciano-4-hidróxi-cinâmico
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Dessorption/Ionization</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 ASPECTOS INTRODUTÓRIOS.....</b>	<b>12</b>
2.1 HISTÓRICO DOS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS UTILIZANDO MALDI-TOF .....	12
2.2 ESTADO DA ARTE DA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS .....	12
<b>2.2.1 Identificação fenotípica tradicional .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2 Espectrometria de massas com Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz com Analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF) .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.3 Identificação de microrganismos utilizando MALDI-TOF .....</b>	<b>17</b>
2.3 UTILIZAÇÃO NO PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	19
2.4 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	22
<b>3 DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>23</b>
3.1 PARÂMETROS AVALIADOS .....	23
3.2 RESULTADOS OBTIDOS.....	23
3.3 IMPACTO DOS RESULTADOS NA PRODUTIVIDADE.....	28
3.4 IMPACTO AMBIENTAL.....	29
3.5 VIABILIDADE ECONÔMICA .....	30
3.6 PERSPECTIVAS DE MERCADO .....	31
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSA OBTIDOS NA VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE <i>SALMONELLA SP.</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>APÊNDICE B – ESPECTROS DE MASSA OBTIDOS NA VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>.....</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de detecção, isolamento e identificação de microrganismos presentes nos alimentos é de grande importância sanitária e econômica. Através dessa análise microbiológica, se garante a inocuidade do alimento, bem como é possível estabelecer medidas de controle do processo produtivo, segregando produtos que seriam impróprios para consumo.

A seleção de um método para cumprir tal tarefa é etapa importante na garantia da qualidade. O método deve apresentar o adequado desempenho metrológico e ser de execução economicamente viável.

Para a etapa de identificação de microrganismos, as técnicas mais utilizadas são as microbiológicas tradicionais. Esses métodos se baseiam num conjunto de reações bioquímicas que caracterizam o microrganismo a ser detectado. São de fácil execução; porém, necessitam de tempos de incubação para fornecer a resposta.

Os métodos de identificação baseados em espectrometria de massas, especialmente o MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*: Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz com analisador de Tempo de Voo) vêm apresentando destaque nos últimos tempos. Baseados na comparação dos espectros de massas gerados com uma biblioteca de referência, as culturas são identificadas sem a necessidade de mais uma etapa de incubação após o isolamento das colônias suspeitas.

Desse modo, objetiva-se avaliar os protocolos existentes e já validados para a identificação de *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* utilizando a técnica de MALDI-TOF em substituição a metodologia tradicional. Isso foi feito com um protocolo de verificação de desempenho baseado na comparação do método utilizando MALDI-TOF em relação à metodologia tradicional de referência para cada microrganismo. Além dessa comparação baseado nos parâmetros metrológicos, os métodos foram comparados quanto aos custos e aos impactos econômicos e na produtividade e temporalidade da análise.

## 2 ASPECTOS INTRODUTÓRIOS

### 2.1 HISTÓRICO DOS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS UTILIZANDO MALDI-TOF

Ao longo dos últimos 50 anos, a espectrometria de massas tem se tornado uma alternativa como método de identificação de microrganismos. Em 1975, Anhalt e Fenselau evidenciaram que havia diferenças significativas nos espectros de massas gerados pela pirólise de lisados bacterianos, utilizando um analisador de setor magnético de duplo foco. (1)

O desenvolvimento do MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization: Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz*) foi um passo importante nesse caminho. A possibilidade de um processo de ionização mais conservativo, que permitiria análise de macromoléculas, rendeu parte do prêmio Nobel em química de 2002 para os responsáveis pelo estudo e desenvolvimento dessa técnica, no final dos anos 1980. (2)

A partir do desenvolvimento do MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight: Ionização/Dessorção por Laser Assistida por Matriz com analisador de Tempo de Voo*), iniciou-se estudos para aplicação na identificação de microrganismos. Os processos de identificação de bactérias iniciaram pela análise do perfil do espectro gerado por proteínas extraídas após a lise celular, em 1994. Logo após, em 1996, desenvolveram-se métodos de análise espectrométrica de culturas bacterianas inteiras utilizando MALDI-TOF. A identificação, desse modo, baseava-se na comparação dos espectros e visualização de picos de impressão digital, para diferenciar os microrganismos. (2)

Ao longo dos anos, focou-se em aperfeiçoar os procedimentos de preparo da amostra, condições de ionização e de tratamento dos espectros. Atualmente o estado da arte de identificação de microrganismos, utilizando MALDI-TOF, permite procedimentos mais rápidos, com maior sensibilidade de certeza de identificação.

### 2.2 ESTADO DA ARTE DA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Não é permitida a presença de microrganismos patogênicos, suas toxinas ou metabólitos em alimentos destinados ao consumo humano. Desse modo, o processo de detecção e identificação de microrganismos nos produtos alimentícios é de fundamental importância para garantir sua inocuidade e segurança ao consumidor. Esse processo deve ser realizado pelo responsável pela produção do produto, bem como por órgãos de fiscalização. Além disso, no

caso de um surto de Doença Transmitida por Alimentos (DTA), é de importância clínica e epidemiológica a identificação do agente etiológico envolvido. (3)

Serão abordados aspectos teóricos referente às técnicas de identificação de microrganismos mais utilizados atualmente. Serão descritos os métodos tradicionais baseados em informações fenotípicas, e aqueles utilizando a espectrometria de massas com ênfase na técnica de MALDI-TOF, para a caracterização de *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*.

*Salmonella* é um gênero de bacilos gram-negativas da família *Enterobacteriaceae*. Apresenta duas principais espécies - *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* - sendo a primeira mais relevante para saúde pública. No Brasil, é um dos principais agentes etiológicos associados aos surtos de DTAs, apresentando os sintomas gastrointestinais comuns: diarreia, vômito e febre moderada. (4)

*Listeria monocytogenes* é um bacilo curto gram-positivo que é um importante patógeno. Em idosos, recém-nascidos e pessoas com imunidade celular deprimida, potencialmente causa bacteremia e meningite. Além disso, em grávidas, a infecção pode se estender ao feto, causando aborto. É um microrganismo que se desenvolve em temperaturas de resfriamento, estando associada à formação de biofilme em lâminas fatiadoras industriais. (5)

### 2.2.1 Identificação fenotípica tradicional

Os métodos tradicionais de identificação de microrganismos são baseados em características fenotípicas. As principais características utilizadas neste conjunto de métodos são a análise microscópica da cultura, avaliação da característica morfológica da colônia, requisitos para o crescimento em meios de cultura seletivos e atividades metabólicas específicas. O critério de decisão sobre quantos e quais desses recursos serão utilizados depende de qual a provável identidade da cultura em estudo, baseado na matriz do isolado. (5)

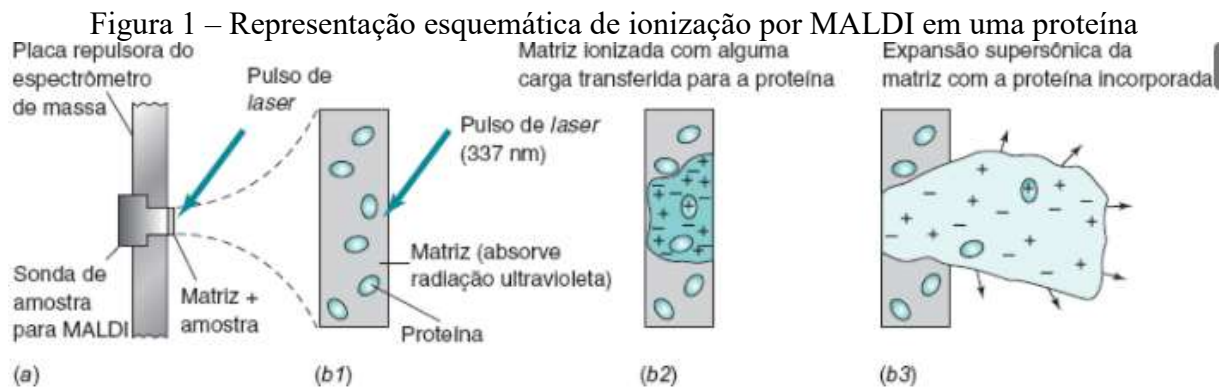
Os testes bioquímicos são um conjunto de provas que avaliam a atividade metabólica sob condições específicas. São ensaios cujo resultado depende da capacidade do microrganismo de utilizar algum componente do meio de cultivo, sendo o produto facilmente detectado. São exemplos: as modificações de pH utilizando indicadores, formação de precipitados e a formação de gás. (5)

Os testes fenotípicos mínimos para a identificação de culturas isoladas de *Salmonella sp.* em alimentos, conforme a norma ISO 6579-1:2017, são apresentados na Tabela 1. Os três primeiros testes necessitam de incubação de até 24h na temperatura de 34 a 38 °C para leitura dos resultados. Os testes sorológicos são feitos a partir das culturas isoladas. Para a identificação

de *Listeria monocytogenes*, conforme a norma ISO 11290-1:2017, os testes utilizados são apresentados na Tabela 2.

### 2.2.2 Espectrometria de massas com Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz com Analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF)

As bases científicas referentes à aplicação da técnica de MALDI-TOF, para a identificação de microrganismos, apesar de recentes, já estão bem estabelecidas. Ao longo dos anos, a técnica foi sendo refinada e estudada no caminho de padronizar os métodos de preparo da amostra, bem como das condições de ionização que aperfeiçoam o resultado. (8) A Figura 1 representa um esquema de análise por MALDI-TOF.



Fonte: Harris, 2017 (9)

A técnica de MALDI-TOF necessita de uma matriz de suporte para realizar o processo de ionização. Inicialmente, prepara-se uma solução da matriz com o analito e deixa-se que o solvente evapore sobre uma sonda, para permitir a cristalização dessa mistura (a). Quando ocorre a incidência dos pulsos de *laser* (b.1) sobre esses cristais, ocorre a dessorção e ionização das moléculas presentes no analito (b.2 e b.3). Como a transferência de energia luminosa ocorre de maneira controlada, isso diminui a clivagem das macromoléculas, gerando íons com maior relação massa carga. (10,11)

Tabela 1 – Testes de caracterização fenotípica de *Salmonella sp.* conforme ISO 6579-1:2017

Nome do teste	Característica evidenciada	Princípio do teste	Reação esperada
Ureia de Christensen	Produção de urease, para utilização como fonte de nitrogênio	Teste bioquímico evidenciado pela mudança de cor do indicador de pH vermelho de fenol	Reação negativa: sem alteração da coloração do meio de cultura
<i>TSI: Triple Sugar Iron</i> (Três açúcares e ferro)	Fermentação de açúcares (glicose, lactose e sacarose), produção de H <sub>2</sub> S, produção de gás na fermentação da glicose	Produção de precipitado escuro de FeS, viragem do indicador de pH (vermelho de fenol) para evidenciar a fermentação dos açúcares e formação de bolhas no fundo do tubo	Formação de precipitado escuro, produção de ácido e gás a partir da glicose (coloração amarela no fundo) e não fermentação da sacarose e da lactose (coloração vermelha na superfície)
Descarboxilação da lisina	Capacidade de decarboxilar a lisina, produzindo amônia.	Mudança de coloração do meio de cultura após a fermentação da glicose, através da viragem do indicador púrpura de bromocresol (de amarelo para roxo)	Reação positiva: turvação do meio e coloração roxa após o tempo de incubação
Sorologia	Presença de antígenos específicos na parede celular do microrganismo	Formação de coágulos quando adicionado o reagente contendo os anticorpos específicos sobre uma suspensão da cultura bacteriana	Reação positiva: formação de coágulos nos soros polivalentes de <i>Salmonella sp.</i>

Fonte: Adaptado de ISO 6579-1:2017 (6)



Tabela 2 - Testes de caracterização fenotípica de *Listeria monocytogenes* conforme ISO 11290-1:2017

Nome do teste	Característica evidenciada	Princípio do teste	Condições de incubação	Reação esperada
Coloração de Gram	Morfologia microscópica da célula frente ao processo de coloração de Gram	Características da parede celular da célula diferenciam a fixação ou não do corante cristal violeta na estrutura celular	Feito a partir da cultura isolada	Bacilos curtos gram positivos (coloração roxa)
Catalase	Produção da enzima catalase	Capacidade do microrganismo de produzir a catalase, enzima que quebra o peróxido de hidrogênio	Feito a partir da cultura isolada	Reação positiva: formação de bolhas ao suspender a cultura em solução de peróxido de hidrogênio
Hemólise	Capacidade de degradar as hemácias, liberando a hemoglobina	Formação de uma zona transparente ao redor do crescimento da cultura em meio sólido contendo sangue de carneiro	18 a 24 h à temperatura de 36 a 38 °C	Reação positiva: formação de uma zona transparente
Fermentação de xilose e de ramnose	Capacidade de fermentar açúcares, produzindo ácido	Mudança de coloração do através da viragem do indicador de pH púrpura de bromocresol, de roxo para amarelo	De 24h até 5 dias, à temperatura de 36 a 38 °C	Reação positiva para a ramnose (mudança de cor do caldo) e reação negativa para a xilose (inalteração da cor do meio de cultura)

Fonte: Adaptado de ISO 11290-1:2017 (7)

O analisador de massas de tempo de voo (TOF) é o que normalmente se usa associado ao uso de MALDI. O TOF consiste em um tubo linear no qual não é aplicado qualquer tipo de campo. Os íons formados são acelerados com igual energia cinética ao saírem da fonte. A separação e análise dos íons formados são realizadas em função de sua velocidade de voo através do tubo, em função da relação massa-carga. Essas duas grandezas são inversamente proporcionais. Desse modo, íons de menor relação massa-carga apresentam maior velocidade, e, portanto, percorrem o comprimento do tubo, até o detector em menor tempo. (10,11)

A obtenção de bons resultados utilizando MALDI-TOF depende, principalmente, de dois fatores: o correto preparo da amostra e a seleção da matriz adequada. Durante o preparo, é importante que a proporção de analito e matriz seja adequada, para evitar que ocorram interações analito-analito durante o processo de ionização. Além disso, é crucial que a mistura entre a solução de matriz e o analito seja homogênea e permita que matriz e analito cristalizem conjuntamente. A seleção da correta matriz depende de 4 principais características: forte absorção de energia luminosa no comprimento de onda de emissão dos pulsos de *laser*; compatibilidade com o solvente e o analito, para permitir que os cristais formados tenham tamanho apropriado e a correta proporção de matriz/analito; capacidade de ser facilmente sublimada para que a mistura matriz-analito forme facilmente vapores para gerar os íons frente aos pulsos de laser; e participar de reações fotoquímicas para permitir a transferência de prótons para o analito. (2,11)

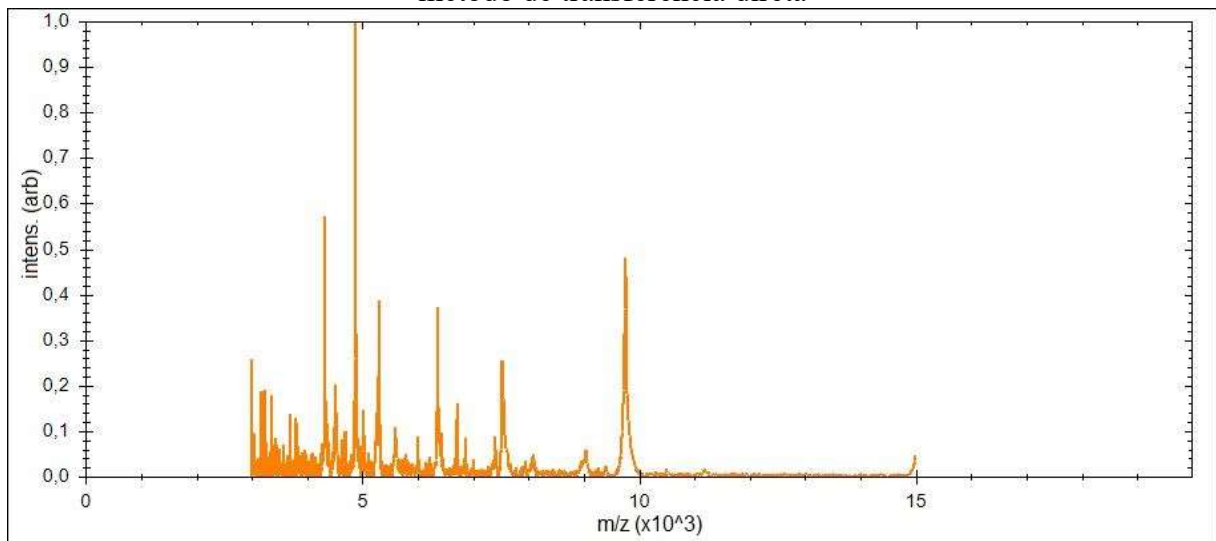
### 2.2.3 Identificação de microrganismos utilizando MALDI-TOF

A identificação de microrganismos utilizando a espectrometria de massas tem como princípio a análise do perfil do espectro das macromoléculas da estrutura bacteriana. As proteínas ribossômicas são as principais estruturas responsáveis pelos fragmentos que geram o espectro de massa característico de cada microrganismo. (8)

Existem vários métodos de preparo das culturas para gerar os respectivos espectros de massa. Dentre esses, o mais simples é a cristalização de colônias presentes em placas de meio de cultura sólido (gel de Agar) junto da matriz suporte da ionização. Esse processo tem a vantagem de ser simples e rápido. Ao mesmo tempo, gera espectros com informações suficientes na região entre 3000 e 10000  $m/z$  para comparação com espectros de referência. Entretanto, nessa técnica, os espectros obtidos para cepas relacionadas apresentam diferenças significativas. Portanto, a interpretação desses espectros e comparação com as referências depende de algoritmos matemáticos para reconhecer a impressão digital e similaridade das

cepas. Não só cepas relacionadas entre si, bem como a análise da mesma cepa pode apresentar diferença significativa de repetibilidade, dependendo das condições de crescimento da mesma, além do preparo da cultura na placa de inserção para ionização. Um exemplo disso é o espectro de massas normalizado de *Listeria monocytogenes* obtido no desenvolvimento do trabalho, apresentado na Figura 2. (2,8)

Figura 2 – Espectro de massas normalizado de cepa de *Listeria monocytogenes* obtido pelo método de transferência direta

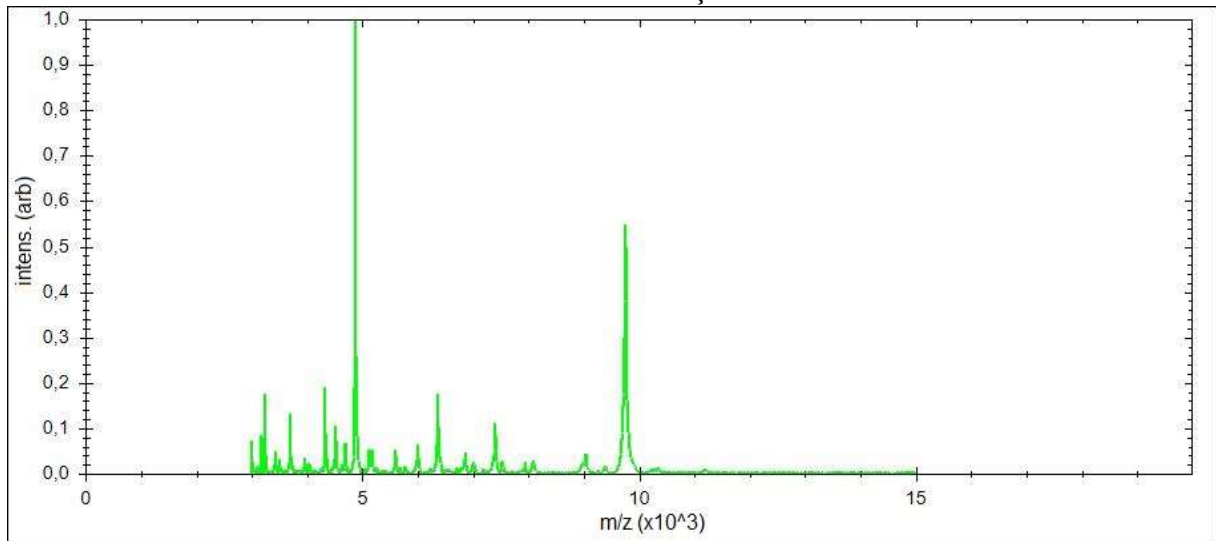


Fonte: o autor, 2021.

O uso de métodos de extração de proteínas também pode ser útil na identificação de microrganismos utilizando técnicas de espectrometria de massas. Esse processo emprega o uso de algum ácido orgânico forte (como ácido, trifluoracético e fórmico), em conjunto com algum solvente orgânico para quebrar a estrutura celular. Esse tipo de preparo pode ser feito em conjunto com a matriz de ionização ou separadamente. Essa etapa gera um espectro mais limpo, colocando em evidência os principais fragmentos utilizados na identificação. Isso pode ser visualizado no espectro de massas na Figura 3, obtido com a mesma cepa da Figura 2. (12)

Além do método de preparo, a eficiência do processo de identificação depende da seleção correta da matriz de ionização. As principais matrizes utilizadas são ácidos orgânicos com anéis aromáticos em sua estrutura. As mais comuns são o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidróxi-cinâmico (HCCA), ácido ferúlico (FA), ácido sinápico (SA), ácido 2,4-hidroxifenil-benzoico (HPBA) e ácido 2,5-dihidróxi-benzoico (DHBA). O HCCA é a matriz de mais uso, tendo resultados ótimos na geração de espectros nas faixas menores que 10000  $m/z$ . O ácido sinápico e ácido ferúlico mostram-se como melhores matrizes para identificação de proteínas maiores, entre 20 e 40 kDa de massa. (2,11)

Figura 3 - Espectro de massas normalizado de cepa de *Listeria monocytogenes* obtido pelo método de extração



Fonte: o autor, 2021

### 2.3 UTILIZAÇÃO NO PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Com o estudo e aprimoramento das técnicas utilizando MALDI-TOF, foram definidos protocolos padronizados para a identificação de microrganismos. O princípio de operação desses é a comparação do espectro gerado com uma biblioteca de referência, utilizando algoritmos matemáticos. No presente momento, a *Bruker Daltonics*® tem em seu escopo os métodos de identificação validados em conformidade com a norma ISO 16140-6: *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures*. Na Tabela 3, abaixo, são listados os microrganismos selecionados nesse estudo, bem como o método de referência utilizado e o certificado de validação vigente.

Tabela 3 – Métodos de referência e validados para a identificação de microrganismos

Microrganismo	Norma de referência	Organismo responsável pela validação do método utilizando MALDI-TOF	Número do certificado
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579-1:2017	Microval	2017LR75
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1:2017	Microval	2017LR73

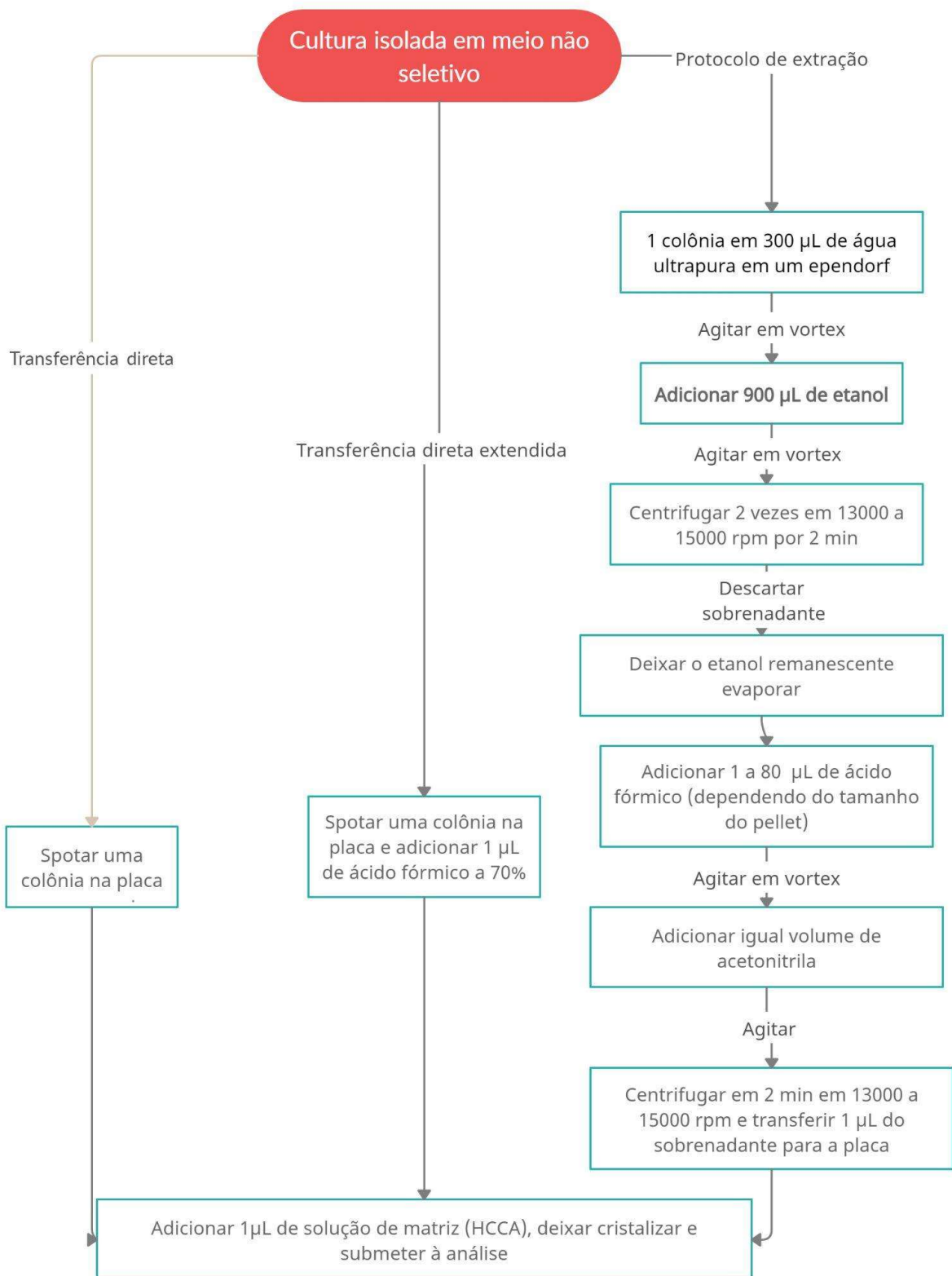
Fonte: o autor, 2021

Para os dois conjuntos de microrganismos, o protocolo de identificação utilizando MALDI-TOF é o mesmo e segue o fluxograma apresentado na Figura 4. Inicialmente, a amostra

é submetida ao protocolo de identificação por transferência direta (à esquerda no fluxograma). Caso não haja correspondência espectral suficiente, o mesmo protocolo deve ser realizado novamente. Caso persista a inconsistência, deve ser realizado o protocolo de transferência direta estendida (ao centro no fluxograma). Se, ainda assim, não houver coeficiente de identificação suficiente, deve ser realizado o protocolo de extração (à direita no fluxograma).

A aquisição dos espectros é feita utilizando o Software *Flex Control* ou similar. O tratamento dos dados utiliza o software *MaldiBioTyper* a partir da versão 4.0. O espectro adquirido é transformado em uma lista de picos que representa os fragmentos  $m/z$ . Utilizando um algoritmo bioestatístico, a lista de picos gerada para a amostra é comparada com a lista de picos dos espectros de referência incluídos na biblioteca do software. A partir dessa comparação, são gerados 3 valores de correlação (cada um variando de 0,000 a 1,000) entre a amostra e a referência. O primeiro relaciona os picos do espectro de massas de referência que estão presentes no espectro de massas da amostra. O segundo relaciona os picos do espectro de massas da amostra que estão presentes no espectro de massas da referência. O terceiro compara as intensidades dos picos que tem correlação em ambos os espectros de massas. O somatório dessas correlações gera um *Score* que varia entre 0,000 e 3,000. Quanto maior for esse valor, maior é a similaridade dos espectros de massa da amostra e da referência. Quando esse valor é maior que 2,000, considera-se que a eficiência de identificação é ao nível de espécie. Entre 1,700 e 1,999, a identificação é ao nível do gênero. Resultados com valor de compatibilidade menor que 1,700 não podem ser considerados e a análise deve ser repetida, conforme demonstrado no fluxograma da Figura 4. (13)

Figura 4 – Fluxograma do protocolo de identificação de microrganismos.



Fonte: Adaptação de Bastin, 2020 (13)

## 2.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso da técnica de MALDI-TOF aplicada à microbiologia tem ganhado bastante espaço. Já há protocolos validados para alguns patógenos relevantes para a área de alimentos, enquanto o protocolo de análise é bastante uniformizado. Além disso, para alguns casos, o método é recomendado normativamente, como a confirmação de *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina pela metodologia proposta pelo FSIS (*Food Safety and Inspection Service*). (14)

Além do uso em microbiologia de alimentos, o MALDI-TOF tem importante aplicação na microbiologia clínica. Nessa área, além da identificação de microrganismos para auxílio no diagnóstico de infecções causadas por bactérias, está evoluindo determinação de resistência a antimicrobianos utilizando essa técnica. Por exemplo, através da detecção de um pico específico de  $m/z$ , é possível identificar a presença de plasmídios associados à resistência de carbapenêmicos em bactérias pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*. (15)

Esses avanços só foram possíveis com o aprimoramento das tecnologias de aquisição e de tratamento de dados; com a evolução da tecnologia dos espectrômetros de massas, foi possível a compactação, bem como a diminuição dos custos do próprio equipamento. Com o avanço dos softwares de tratamento de dados, bem como da capacidade de processamento desses, o MALDI-TOF se apresenta como ferramenta promissora para determinação de padrões baseados na composição e constituição proteica de diferentes tipos de amostras, permitindo a comparação com as referências. Com o refino desse processo, a identificação dos microrganismos tende a apresentar maior especificidade taxonômica, além de possibilitar a determinação de características importantes, como fatores de virulência e outros mecanismos de resistência a antimicrobianos.

A vantagem da implementação da técnica de MALDI-TOF se dá principalmente pela velocidade de análise. O tempo de análise pode ser reduzido, em, no mínimo, 24 horas para a grande maioria dos processos de identificação. A rapidez associada à robustez e confiabilidade da técnica de MALDI-TOF impacta o poder de decisão sobre condenar ou não um lote de produto alimentício ou ainda de direcionar o tratamento de uma infecção bacteriana. Assim sendo, a tendência é de que a técnica seja difundida, novos protocolos de identificação sejam validados e padronizados para justificar o investimento nessa tecnologia.

### 3 DESENVOLVIMENTO

Foi realizada a verificação de desempenho do método de identificação de microrganismos utilizando MALDI-TOF de acordo com o item 7 da norma ISO 16140-3:2021 – *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory*.

#### 3.1 PARÂMETROS AVALIADOS

Conforme descreve a norma ISO 16140-3:2021, para a verificação de métodos de confirmação de identidade foram avaliados os parâmetros de inclusividade e exclusividade para garantir o desempenho metrológico. Para isso, independentemente do nível taxonômico, foram utilizadas 5 cepas pertencentes ao grupo avaliado para a inclusividade e 5 cepas interferentes na etapa de isolamento e que não pertencem ao grupo pesquisado. Essa avaliação foi feita comparativamente à metodologia tradicional específica para cada ensaio. O critério aceito pela norma ISO 16140-3:2021 é de que haja total concordância entre o método de referência e o método em verificação. As cepas utilizadas para cada protocolo avaliado estão apresentadas na Tabela 4. Foi utilizado o software *LIMS Labwere\_HML* para a identificação unívoca das amostras constante na Tabela 4, bem como rastreabilidade dos dados brutos das análises.

Além desses parâmetros metrológicos, foram avaliados parâmetros de produtividade em relação aos métodos bioquímicos tradicionais. Os parâmetros medidos foram o tempo total de análise, bem como o tempo de execução dos preparos. Além disso, comparativamente, foram avaliados os custos de implementação e de manutenção da metodologia tradicional e da metodologia tecnológica proposta.

#### 3.2 RESULTADOS OBTIDOS

Os ensaios da verificação foram realizados entre os dias 28 de setembro de 2021 e 8 de outubro de 2021. O registro dos dados brutos e dos resultados dos testes tradicionais foi realizado utilizando o software *Labwere LIMS\_HML*. O compilado dos resultados obtidos está apresentado nas Tabelas 5 e 6. O processo de identificação pela técnica de MALDI-TOF utilizando o protocolo de transferência direta obteve os resultados apresentados na Tabela 7.



Tabela 4 – Cepas utilizadas para avaliação dos parâmetros de inclusividade e seletividade.

Ensaio	Cepas para inclusividade		Cepas para exclusividade	
	Identidade	Identificação	Identidade	Identificação
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	75537/21	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	75562/21
	<i>Listeria monocytogenes</i> isolada da amostra 6499/21	75538/21	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	75563/21
	<i>Listeria monocytogenes</i> isolada da amostra 14112/21	75541/21	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	75565/21
	<i>Listeria monocytogenes</i> isolada da amostra 974/16	75550/21	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	75575/21
	<i>Listeria monocytogenes</i> isolada da amostra 5874/21	75551/21	<i>Listeria welshimeri</i> isolada da amostra 1393/16	75576/21
<i>Salmonella spp.</i>	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	75587/21	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	75604/21
	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	75588/21	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	75613/21
	<i>Salmonella</i> ser. Heidelberg controle laboratorial	75599/21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	75614/21
	<i>Salmonella</i> ser. Minnesota isolada da amostra 7102/21	75600/21	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	75615/21
	<i>Salmonella</i> ser. 1,4[5],12:i:- isolada da amostra 22848/20	75601/21	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	75622/21

Tabela 5 – Resultados dos testes bioquímicos para identificação de *Salmonella sp.*

Cepa	Ágar Ureia	TSI <sup>1</sup>	Lisina	Sorologia Poli O	Sorologia Poli H	Resultado
75587/21	Negativo	Ácido / Ácido / Positivo / Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Presença
75588/21	Negativo	Ácido / Ácido / Positivo / Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Presença
75599/21	Negativo	Ácido / Ácido / Positivo / Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Presença
75600/21	Negativo	Ácido / Ácido / Positivo / Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Presença
75601/21	Negativo	Ácido / Ácido / Positivo / Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Presença
75604/21	Negativo	Ácido / Ácido / Negativo / Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Ausência
75613/21	Positivo	Ácido / Alcalino / Positivo / Positivo	Negativo	Não realizado	Não realizado	Ausência
75614/21	Positivo	Neutro / Neutro / Negativo / Negativo	Positivo	Não realizado	Não realizado	Ausência
75615/21	Negativo	Ácido / Ácido / Positivo / Positivo	Negativo	Não realizado	Não realizado	Ausência
75622/21	Negativo	Ácido / Ácido / Negativo / Positivo	Negativo	Não realizado	Não realizado	Ausência

<sup>1</sup> Ordem da leitura: Reação da base/Reação do bisel/Produção de H<sub>2</sub>S/Produção de gás

Tabela 6 – Resultados dos testes bioquímicos para identificação de *Listeria monocytogenes*.

Cepa	Catalase	Gram	Hemólise	Ramnose	Xilose	Resultado
75537/21	Positivo	Coco-bacilos Gram positivos	Positivo	Positivo	Negativo	Presença
75538/21	Positivo	Coco-bacilos Gram positivos	Positivo	Positivo	Negativo	Presença
75541/21	Positivo	Coco-bacilos Gram positivos	Positivo	Positivo	Negativo	Presença
75550/21	Positivo	Coco-bacilos Gram positivos	Positivo	Positivo	Negativo	Presença
75551/21	Positivo	Coco-bacilos Gram positivos	Positivo	Positivo	Negativo	Presença
75562/21	Negativo	Cocos em cadeias Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Ausência
75563/21	Positivo	Cocos em cachos Gram positivos	Positivo	Negativo	Negativo	Ausência
75565/21	Positivo	Coco-bacilos Gram positivos	Negativo	Positivo	Negativo	Ausência
75575/21	Positivo	Coco-bacilos Gram positivos	Positivo	Negativo	Positivo	Ausência
75576/21	Positivo	Coco-bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Positivo	Ausência

Tabela 7 – Resultados de identificação de *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* utilizando MALDI-TOF pelo protocolo de transferência direta.

Cepa	Resultado	Score
75587/21	<i>Salmonella sp</i>	2,529
75588/21	<i>Salmonella sp</i>	2,326
75599/21	<i>Salmonella sp</i>	2,544
75600/21	<i>Salmonella sp</i>	2,496
75601/21	<i>Salmonella sp</i>	2,353
75604/21	<i>Escherichia coli</i>	2,354
75613/21	<i>Proteus mirabilis</i>	2,464
75614/21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,335
75615/21	<i>Citrobacter freundii</i>	2,341
75622/21	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,289
75538/21	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,978
75541/21	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,844
75550/21	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,028
75551/21	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,913
75562/21	<i>Enterococcus faecalis</i>	1,923
75563/21	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,149
75565/21	<i>Listeria innocua</i>	2,049
75575/21	<i>Listeria ivanovii</i>	1,735
75576/21	Sem identificação	1,610

Pela Tabela 7, o protocolo de transferência direta apresentou resultado adequado para a identificação de *Salmonella sp.* Entretanto, para *Listeria monocytogenes*, o critério mínimo de identificação (Score  $\geq 2,000$ ) não foi atingido. Em função disso, foi realizado o protocolo de transferência direta estendida, que também não alcançou o critério de identificação. Portanto, foi realizado o protocolo de extração, cujos resultados estão apresentados na Tabela 8. Os espectros de massa que geraram os scores de identificação para *Salmonella sp.* no Apêndice A, enquanto os espectros de massa que geraram os scores de identificação apresentados na Tabela 8 para *Listeria monocytogenes* são apresentados no Apêndice B.

Tabela 8 – Resultados de identificação de *Listeria monocytogenes* utilizando MALDI-TOF pelo protocolo de extração.

Cepa	Resultado	Score
75537/21	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,407
75538/21	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,276
75541/21	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,227
75550/21	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,247
75551/21	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,271
75562/21	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,068
75563/21	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,519
75565/21	<i>Listeria innocua</i>	2,320
75575/21	<i>Listeria ivanovii</i>	2,251
75576/21	<i>Listeria welshimeri</i>	2,255

Comparando os resultados obtidos entre as técnicas tradicionais e utilizando MALDI-TOF, evidencia-se que o critério metrológico estabelecido pela norma ISO 16140-3:2021 foi alcançado.

### 3.3 IMPACTO DOS RESULTADOS NA PRODUTIVIDADE

A principal vantagem da implementação do MALDI-TOF para identificação de microrganismos é a rapidez com a qual o resultado é obtido. Essa característica fica mais evidente no caso da identificação de *Listeria monocytogenes*. A partir da cultura isolada, o resultado utilizando testes bioquímicos leva ao menos 2 dias, podendo se estender a 5 dias. Utilizando MALDI-TOF, no mesmo dia em que se obtém a cultura isolada, é possível realizar a identificação. No caso de *Salmonella sp.*, esse ganho é de 1 dia até a confirmação do resultado.

Além disso, o tempo de processamento do protocolo direto é comparável com a semeadura dos testes bioquímicos. Para fazer o preparo da placa de MALDI-TOF, considerando a adição de matriz, foi necessário, em média, 1 minuto por amostra. Para a inoculação da série bioquímica dos testes de *Salmonella sp.*, foi necessário, também, aproximadamente 1 minuto por amostra. O tempo de evaporação do solvente e processamento da placa no equipamento é comparável com a etapa de soro-aglutinação. O tempo de evaporação foi em média de 10 minutos após a adição da matriz no último *spot* de placa, enquanto a obtenção e tratamento dos

espectros demoram em torno de 1 minuto por amostra. Cada reação de soro-aglutinação durou em torno de 2 minutos. Durante a verificação, foram realizadas 20 reações (2 por amostra); resultando num total de 40 minutos. Para o processamento dessas mesmas 10 amostras, após a adição de matriz foi necessário aproximadamente 20 minutos. Desse modo, houve uma diminuição significativa de tempo humano necessário para execução da análise por MALDI-TOF, sendo que essa vantagem aumenta com o aumento do volume de amostras.

Para o caso da necessidade de extração, essa vantagem temporal diminui. A semeadura dos testes bioquímicos de *Listeria monocytogenes* durou, em média, um minuto por amostra. Além disso, necessita-se, em média, de 5 minutos por amostra para coloração de Gram e visualização microscópica. No entanto, o tempo para o processo de extração para análise no MALDI-TOF é extenso e bastante variável. A variabilidade está relacionada ao tamanho do *pellet* formado, que influencia na taxa de evaporação do solvente extrator. Durante os experimentos, necessitou-se de 2 horas e 30 minutos para realizar o protocolo completo para as 10 amostras. Ainda assim, por mais que demande mais tempo do analista, o resultado final pelo MALDI-TOF segue sendo emitido com pelo menos 2 dias de antecedência, com relação ao método descrito na ISO 11290-1:2017.

### 3.4 IMPACTO AMBIENTAL

Os impactos ambientais das duas técnicas de identificação (tradicional e MALDI-TOF) são bastante diferentes e de difícil comparação. No processo tradicional, o maior volume de resíduos gerados é de risco biológico, enquanto na técnica utilizando MALDI-TOF, são gerados, majoritariamente, resíduos de compostos orgânicos, no caso, as matrizes utilizadas para fazer as placas. A quantidade de resíduos gerada para o teste de 500 colônias de cada microrganismo testado é apresentada na Tabela 9.

As culturas de *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* cultivadas nos meios de cultura dos testes bioquímicos se enquadram como agentes de Risco 2, dentro do grupo A1. Desse modo, o material, antes do descarte, deve passar por processo que garanta a descontaminação completa. (16)

Tabela 9 – Resíduos gerados nas técnicas de identificação para 500 culturas de microrganismos.

Microrganismo	Tradicional	MALDI-TOF
	500 tubos de 7 mL de Ágar Ureia	
<i>Salmonella sp.</i>	500 tubos de 8 mL de Ágar TSI	1,5 mL de solução de HCCA
	500 tubos de 5 mL de Caldo Lisina	
<i>Listeria monocytogenes</i>	125 placas de Ágar Sangue	450 mL de etanol
	500 tubos de 5 mL de caldo Xilose	10 mL de ácido fórmico
	500 tubos de 5 mL de caldo Ramnose	10 mL de acetonitrila
		1,5 mL de solução de HCCA

O método mais comum de descontaminação é a esterilização utilizando calor úmido em autoclave ou/e outro processamento que garanta inativação dos microrganismos cultivados. É um processo simples que apresenta um elevado gasto energético e que gera volumes grandes de resíduos. Os resíduos da técnica de MALDI-TOF são classificados no grupo B, devendo ser submetidos a tratamento antes da disposição final adequada. Ainda assim, é importante ressaltar que ambos os métodos de identificação necessitam de uma etapa prévia de detecção e isolamento, que gera resíduos que se enquadram no grupo A1. Desse modo, o uso do MALDI-TOF diminui o volume de resíduos biológicos, mas não os elimina completamente. (16)

Comparativamente, o volume de resíduo gerado utilizando a técnica de MALDI-TOF é bem menor. Além disso, o processo de lavagem da placa de MALDI-TOF demanda um menor volume de água tratada e purificada que os tubos utilizados nos testes bioquímicos. Também não é necessária esterilização prévia do material a ser utilizado, o que resulta num menor consumo energético total.

### 3.5 VIABILIDADE ECONÔMICA

Para mensurar a viabilidade econômica, será avaliado o investimento inicial em termos da técnica de MALDI-TOF, bem como os custos dos reagentes utilizados em cada técnica. Não será avaliado o custo de aquisição dos equipamentos da metodologia tradicional (estufas, autoclaves), pois eles são também necessários na etapa de detecção e isolamento das culturas a serem identificadas. Pela dificuldade de isolar essa informação, não será levado em conta o custo com tempo de análise, custo de energia envolvida, bem como o valor da mão de obra empregada.

O investimento para aquisição do equipamento de MALDI-TOF foi de R\$1.353.429,44, no ano de 2015, o que equivale a, aproximadamente, US\$450.000. Os custos dos reagentes utilizados para o teste de 500 colônias foram calculados com base no último preço de processo licitatório empenhado. É importante ressaltar que esses consumíveis, em sua maioria, são importados e vêm apresentando variação significativa de preço em função da variação cambial. Esses custos para o teste de 500 colônias são apresentados na Tabela 10.

Além do custo dos reagentes, o MALDI-TOF, por ser um equipamento de alta complexidade, demanda manutenção preventiva especial. O valor vigente para o contrato prevê o valor anual de aproximadamente R\$55.000,00 para 2021.

Fica claro que o custo de consumíveis utilizados na técnica de MALDI-TOF é menor em relação ao método tradicional. Entretanto, como o valor fixo de manutenção do equipamento é elevado, é necessário um grande volume de amostras para que a diferença dos consumíveis compense a manutenção. Considerando somente a análise de *Salmonella sp.*, seriam necessárias aproximadamente 3700 amostras para que esse lucro se equipare ao gasto com a manutenção do MALDI-TOF. Para que ocorra essa equiparação com o valor do equipamento são necessários mais de 91000 testes.

Entretanto, há outros fatores favoráveis economicamente para o uso do MALDI-TOF como método de identificação de microrganismos. A redução no tempo de análise é um dos principais contribuintes para isso. É difícil mensurar o quanto 1 ou 2 dias a menos no tempo de uma análise impactam na produtividade em termos financeiros, pois é um fator que vai variar muito com a realidade do laboratório.

### 3.6 PERSPECTIVAS DE MERCADO

Com a consolidação da técnica de MALDI-TOF para a identificação de microrganismos, o seu uso tem aumentado. As áreas clínica e de pesquisa são as que mais têm utilizado essa técnica. O uso na área de microbiologia de alimentos ainda não é muito difundido, mesmo que a técnica seja muito promissora.



Tabela 10 – Custos de reagentes para o teste de 500 culturas de pelos métodos tradicionais e de MALDI-TOF.

Microrganismo	Método	Reagentes contabilizados	Custo por 500 testes (R\$)	Custo total (R\$)
<i>Salmonella sp.</i>	Tradicional	500 tubos de 7 mL de Ágar Ureia	67,00	7442,00
		500 tubos de 8 mL de Ágar TSI	91,00	
		500 tubos de 5 mL de Caldo Lisina	24,00	
		10 mL de Soro Poli O	2250,00	
		10 mL de Soro Poli H	5010,00	
	MALDI-TOF	1,5 mL de solução de HCCA	6,00	6,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tradicional	125 placas de Ágar Sangue	1450,00	5260,00
		500 tubos de 5 mL de caldo Xilose	860,00	
		500 tubos de 5 mL de caldo Ramnose	2950,00	
	MALDI-TOF	450 mL de etanol	28,00	37,00
		10 mL de ácido fórmico	1,00	
		10 mL de acetonitrila	2,00	
		1,5 mL de solução de HCCA	6,00	

Nos laboratórios de indústria ou de prestação de serviços à indústria, o elevado investimento inicial dificulta o uso do MALDI-TOF para identificação de microrganismos. O uso do equipamento, no atual estado da arte da tecnologia, é recomendável em instituições com capacidade de investimento e aplicação da técnica em outras áreas do conhecimento, bem como a associação do seu uso na pesquisa. Com o avanço da tecnologia de construção do equipamento, espera-se que esse valor diminua, permitindo uma maior distribuição e uso do MALDI-TOF aplicado à área de microbiologia.

## 4 CONCLUSÃO

O trabalho realizado, mostrou que os métodos de identificação de *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* utilizando MALDI-TOF apresentam desempenho metrológico equivalente às metodologias de referência. Foi obtida total concordância nos parâmetros de inclusividade e exclusividade para os dois microrganismos, atendendo ao critério da norma ISO 16140-3:2021.

Em termos de desempenho temporal, a técnica de MALDI-TOF se mostrou mais eficiente que os métodos tradicionais. O tempo de execução da análise é semelhante entre as duas técnicas, enquanto o MALDI-TOF tem a vantagem de fornecer os resultados no mesmo dia em que a cultura é obtida. Utilizando as metodologias tradicionais, é necessário um dia de incubação para a identificação de *Salmonella sp.* e pelo menos dois dias para a identificação de *Listeria monocytogenes*.

O elevado valor para a aquisição e manutenção de um equipamento de MALDI-TOF dificulta sua utilização para a grande maioria dos laboratórios. O seu uso é favorecido quando outras aplicações estão associadas, principalmente relacionadas à pesquisa. Por mais que a redução no tempo de análise com o MALDI-TOF seja considerável, ainda assim, seria demandado um volume de amostras elevado que compensasse tamanho investimento.

**REFERÊNCIAS**

- (1) ANHALT, John P.; FENSELAU, Catherine.. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 219-225, 1 fev. 1975. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac60352a007>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60352a007> Acesso em: 20 set. 2021.
- (2) WATSON, J. Throck; SPARKMAN, O. David. **INTRODUCTION TO MASS SPECTROMETRY: instrumentation, applications and strategies for data interpretation**. 4. ed. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9780470516898>. Acesso em: 09 set. 2021.
- (3) BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE/AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/DIRETORIA COLEGIADA. Resolução - RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Brasília, 26 dez. 2019.
- (4) SALMONELLA (Salmonelose). 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella-salmonelose>. Acesso em: 12 out. 2021.
- (5) BERKOWITZ, Frank E.; JERRIS, Robert C.. **Practical Medical Microbiology for Clinicians**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119066767>. Acesso em: 14 set. 2021.
- (6) INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO6579-1: Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp.**.1 ed. Genebra, 2017
- (7) INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11290-1: Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. — Part 1: Detection method**. 2 ed. Genebra, 2017
- (8) HO, Yen-Peng; REDDY, P. Muralidhar. Advances in mass spectrometry for the identification of pathogens. **Mass Spectrometry Reviews**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 1203-1224, 9 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.20320>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mas.20320>. Acesso em: 12 set. 2021.
- (9) C., H. D. **Análise Química Quantitativa, 9ª edição**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2017. 9788521634522. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521634522/>. Acesso em: 20 set. 2021
- (10) DASS, Chhabil. **FUNDAMENTALS OF CONTEMPORARY MASS SPECTROMETRY**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/0470118490>. Acesso em: 09 set. 2021

- (11) LAY, Jackson O.. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. **Mass Spectrometry Reviews**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 172-194, 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.10003>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mas.10003>. Acesso em: 13 set. 2021.
- (12) FENSELAU, Catherine; DEMIREV, PlamenA.. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 157-171, 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.10004>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mas.10004>. Acesso em: 14 set. 2021.
- (13) BASTIN, Benjamin. **MicroVal Study 2017LR75: Confirmation Method**: validation study of the maldibiotyper® complete solution as an alternative method for the confirmation of listeria spp..2. ed. Cincinnati: Q Laboratories, 2020. Disponível em: [https://assets.bettyblocks.com/2e826c3765f4401c84671a06de961fc7\\_a31969a7e8df44178e5d71eade616777/21269/2017LR75\\_-\\_SUMMARY\\_REPORT\\_Final\\_03052020.pdf](https://assets.bettyblocks.com/2e826c3765f4401c84671a06de961fc7_a31969a7e8df44178e5d71eade616777/21269/2017LR75_-_SUMMARY_REPORT_Final_03052020.pdf). Acesso em: 15 set. 2021.
- (14) USDA/FSIS. **MLG 5C.02**: Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. 2 ed. Washington, 2021. Disponível em: [https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/2021-08/MLG-5C.02.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-08/MLG-5C.02.pdf). Acesso em: 22 set. 2021.
- (15) ZIMMERMANN, Stefan; BURCKHARDT, Irene. Development and Application of MALDI-TOF for Detection of Resistance Mechanisms. In: SHAH, Haroun N.; GHARBIA, Saheer E. (ed.). **MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology**. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Cap. 10. p. 231-244. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960226>. Acesso em: 22 set. 2021.
- (16) BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE/AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/DIRETORIA COLEGIADA. Resolução - RDC nº 222, de 28 de março de 2018. Regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde e dá outras providências. Brasília, 29 de março de 2018.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSA OBTIDOS NA VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE *SALMONELLA SP.*

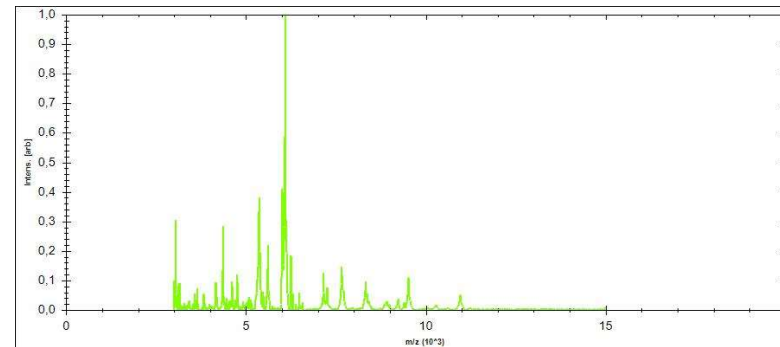
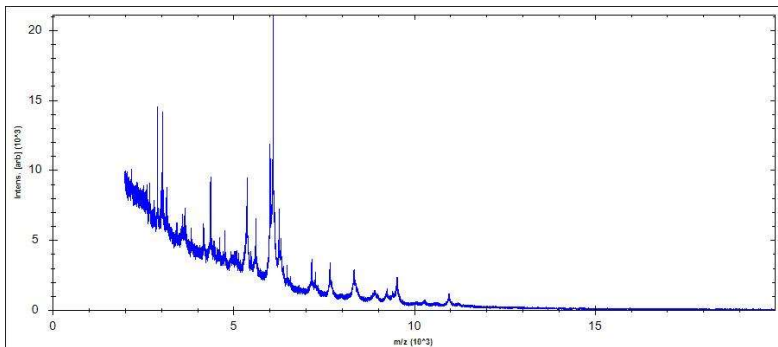
Cepa

Bruto

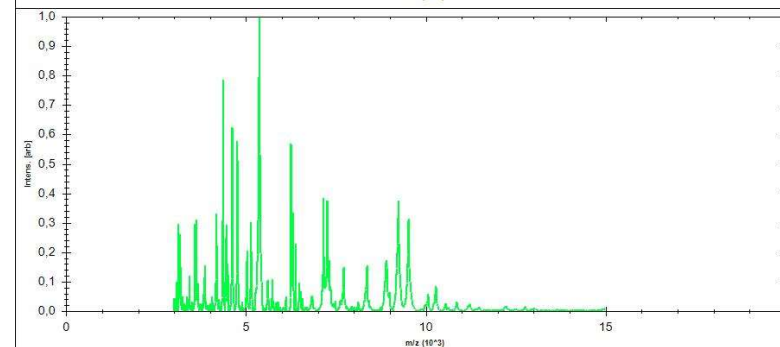
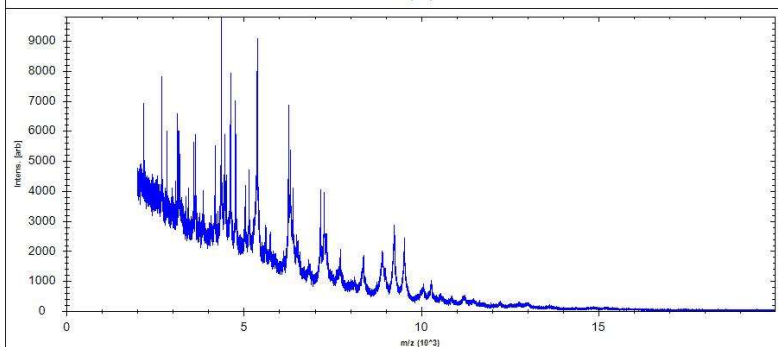
Normalizado

*Salmonella sp.*

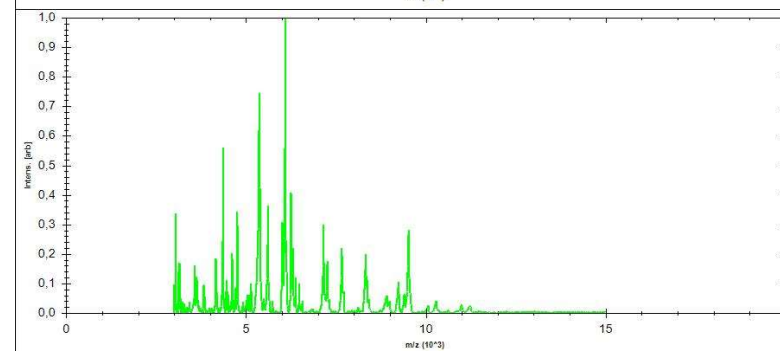
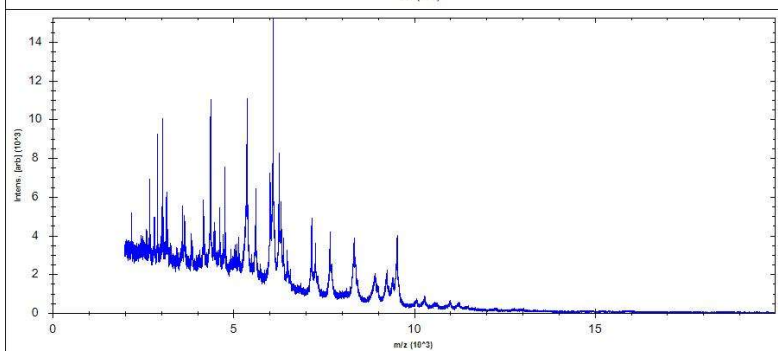
75587/21

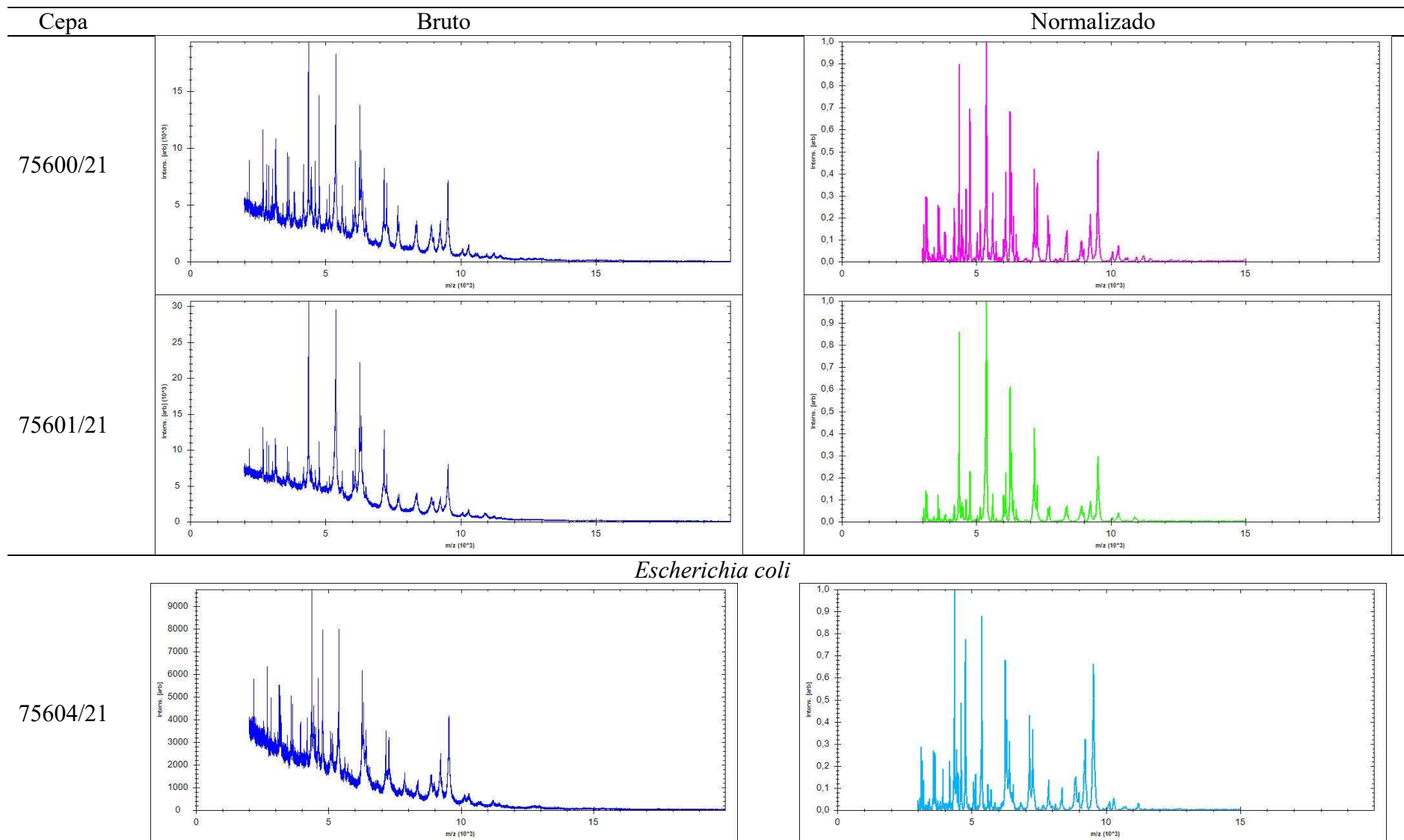


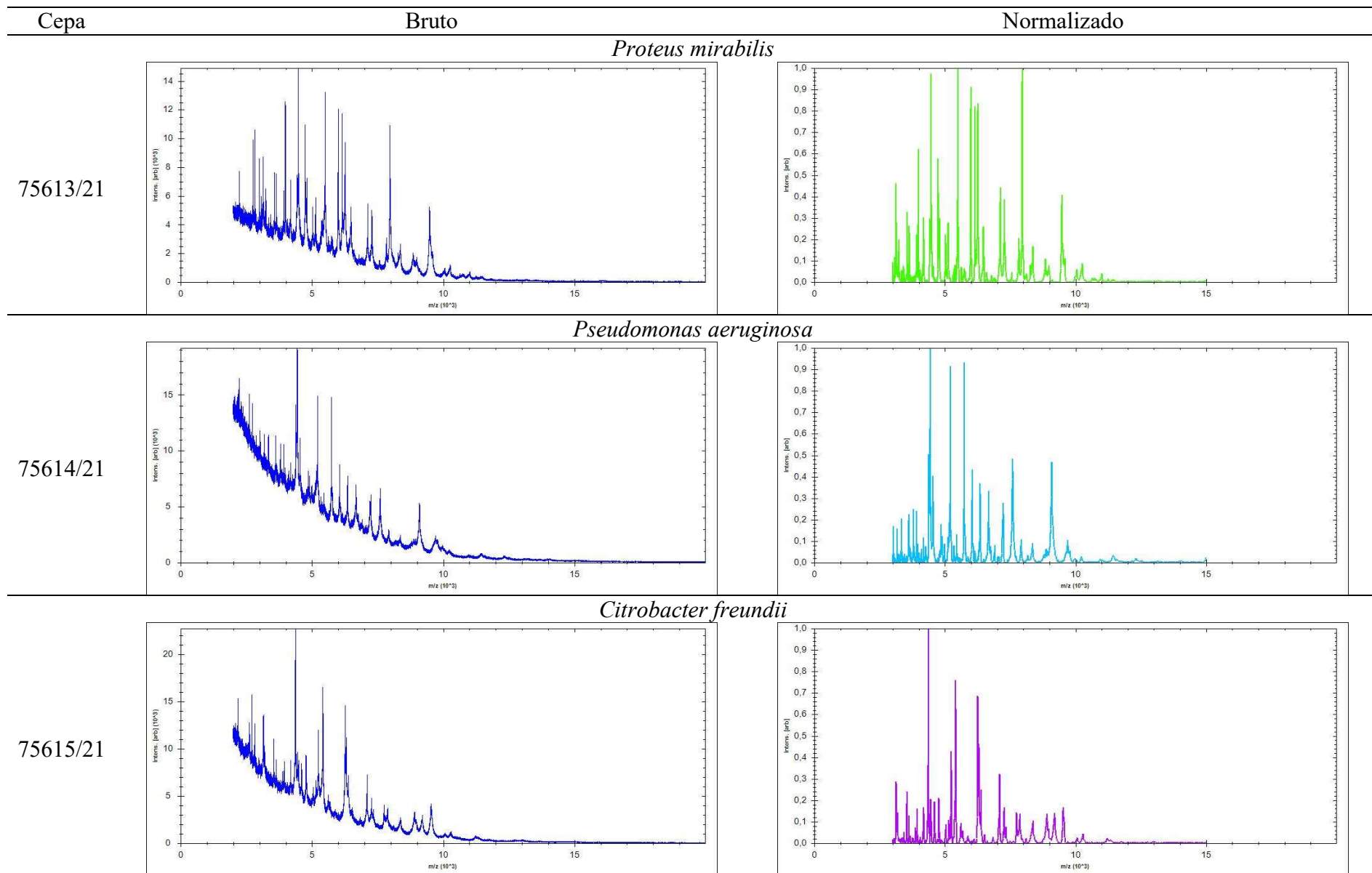
75588/21



75599/21









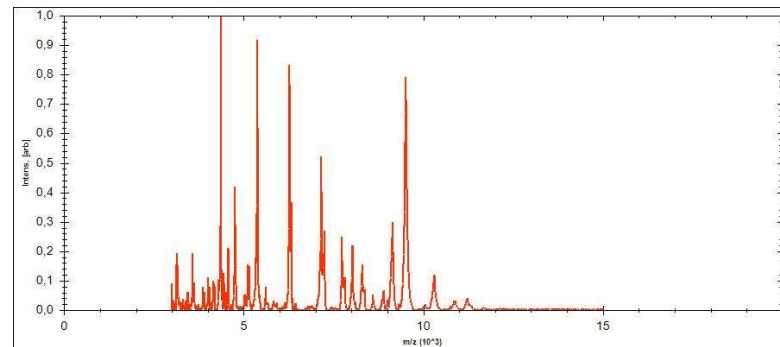
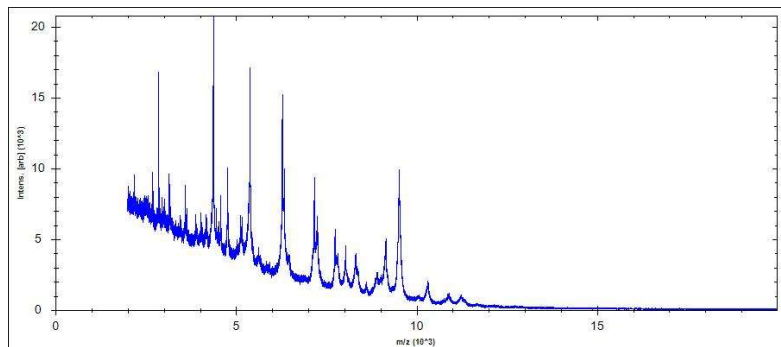
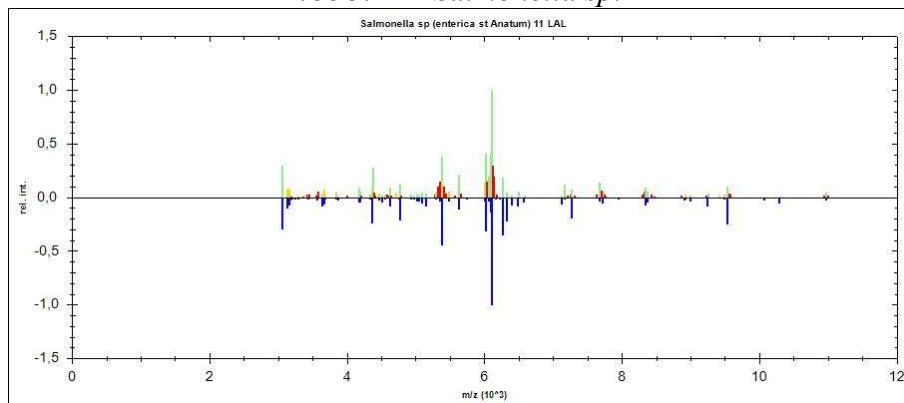
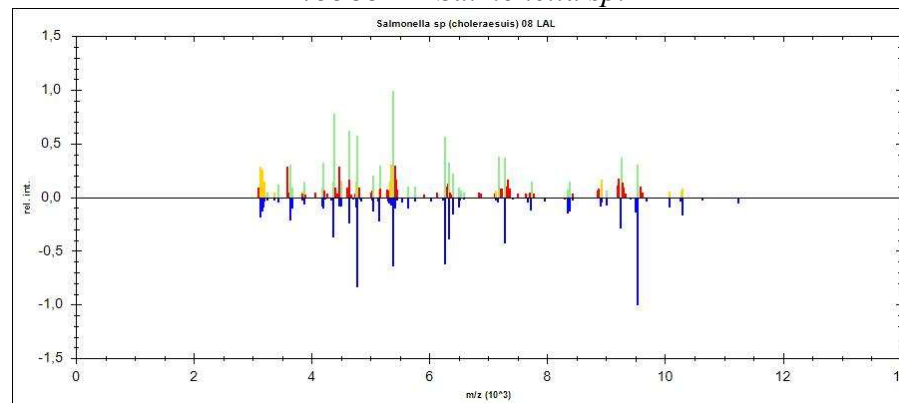
Cepa

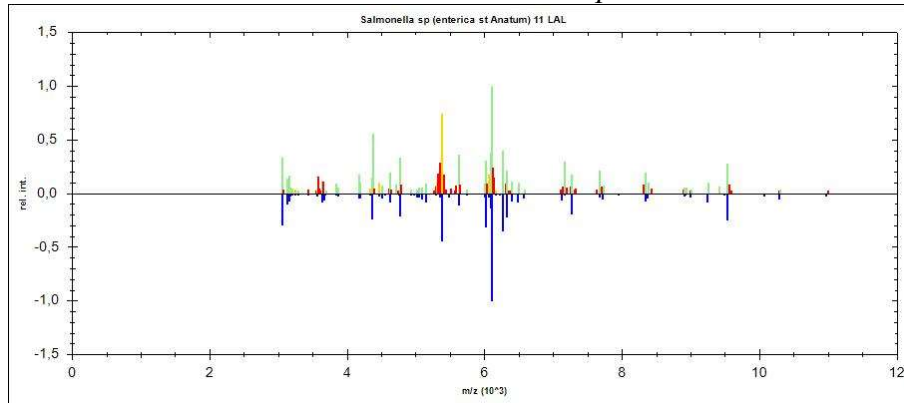
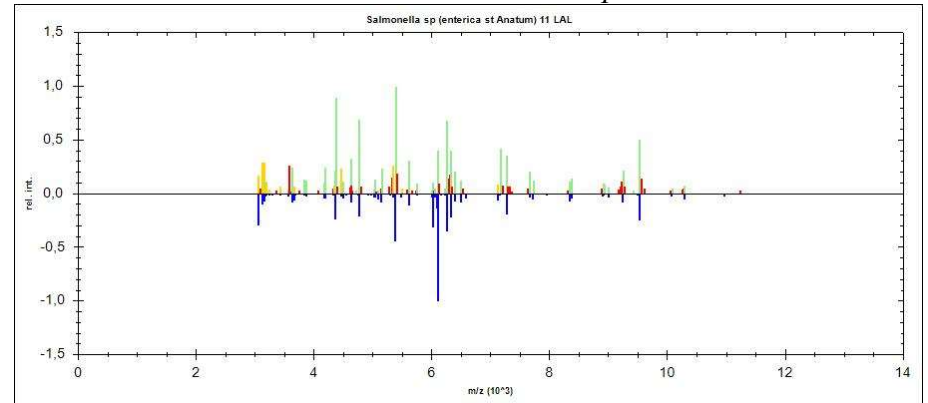
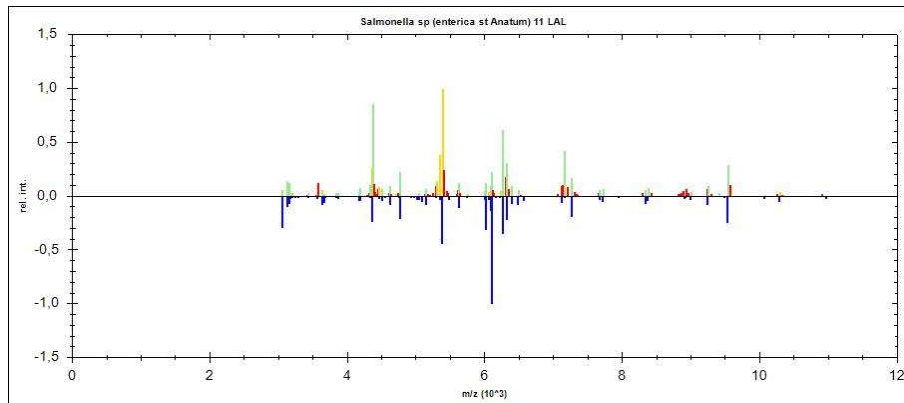
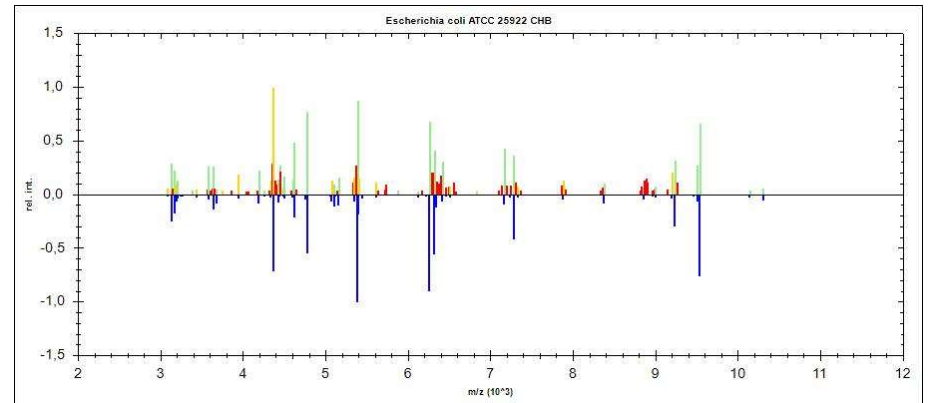
Bruto

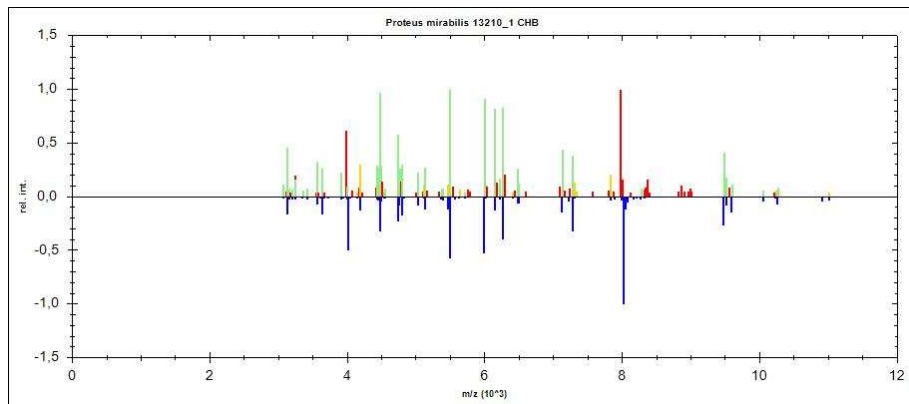
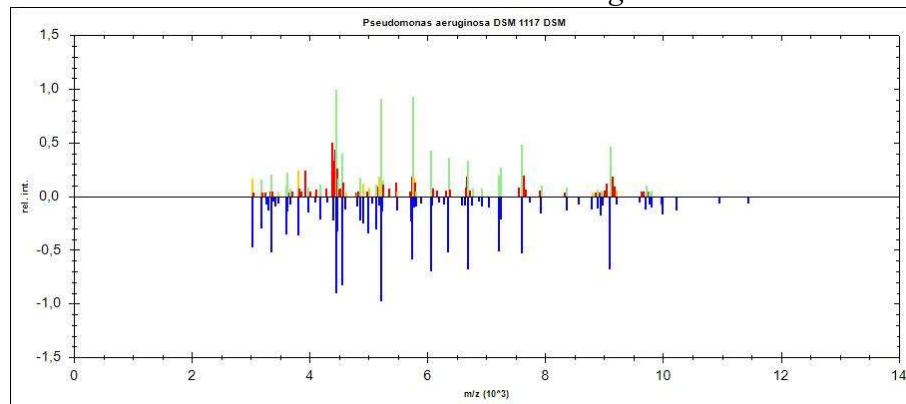
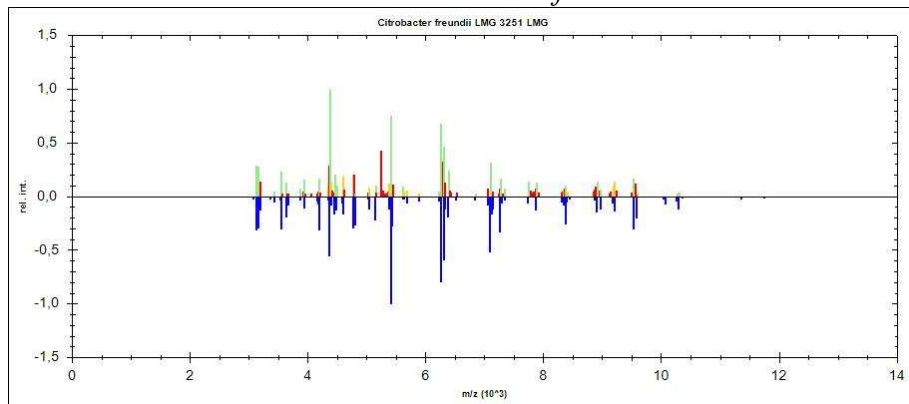
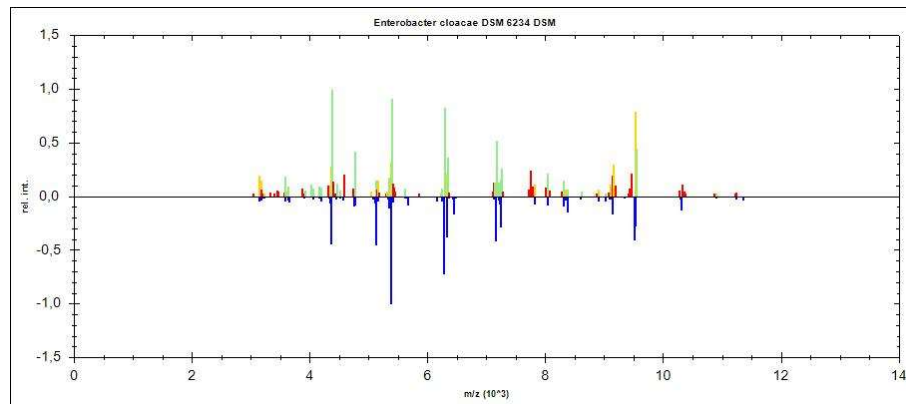
Normalizado

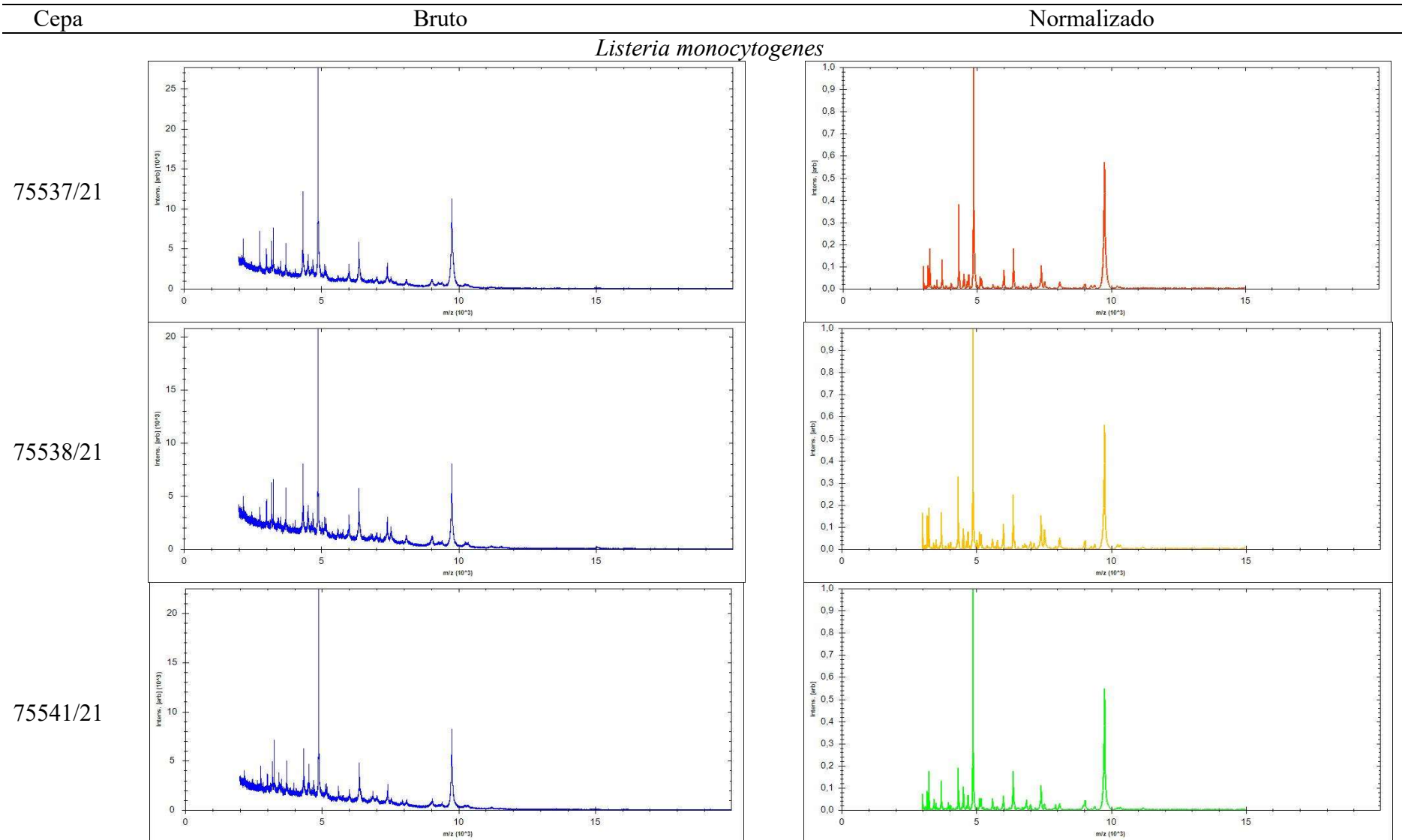
*Enterobacter cloacae*

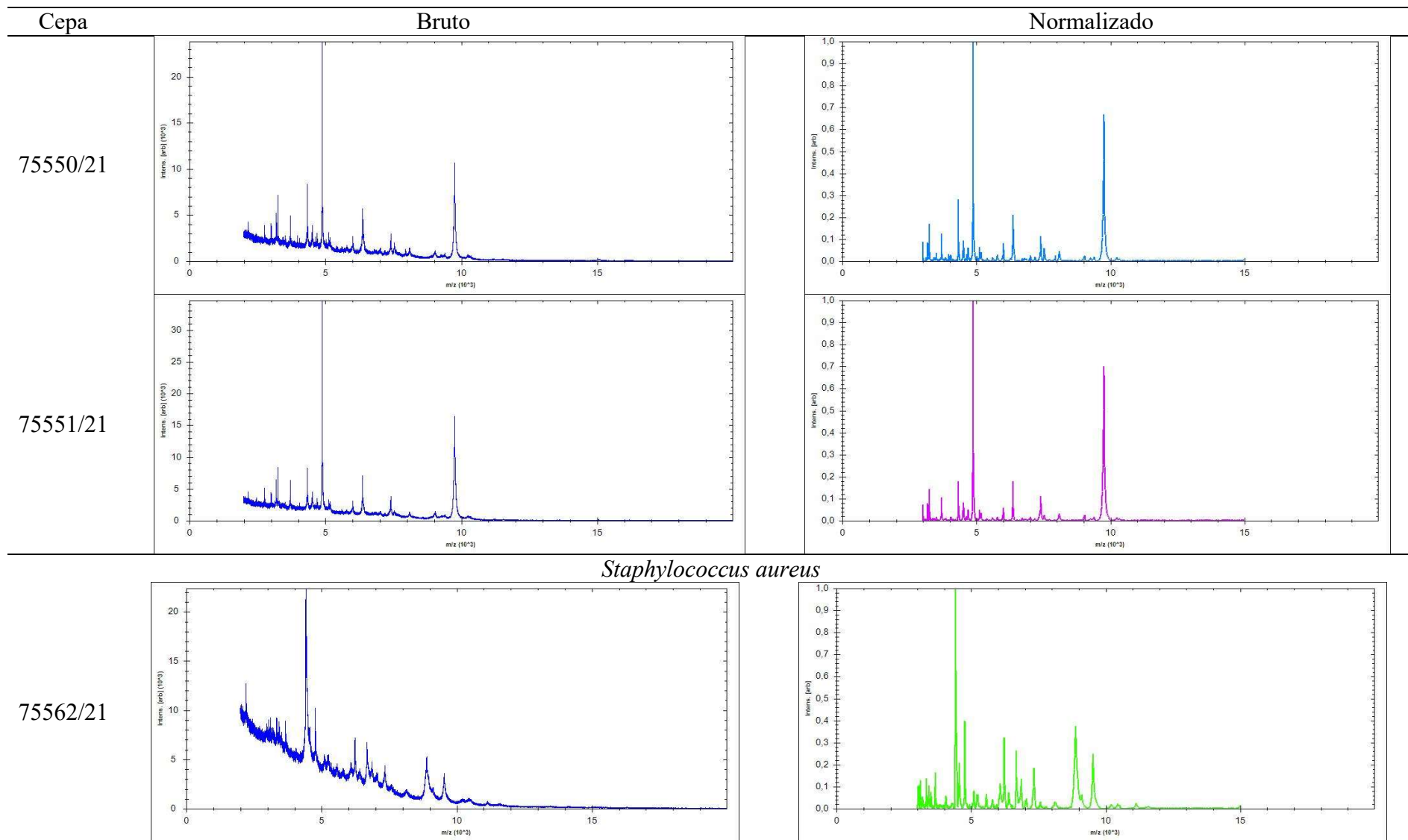
75622/21

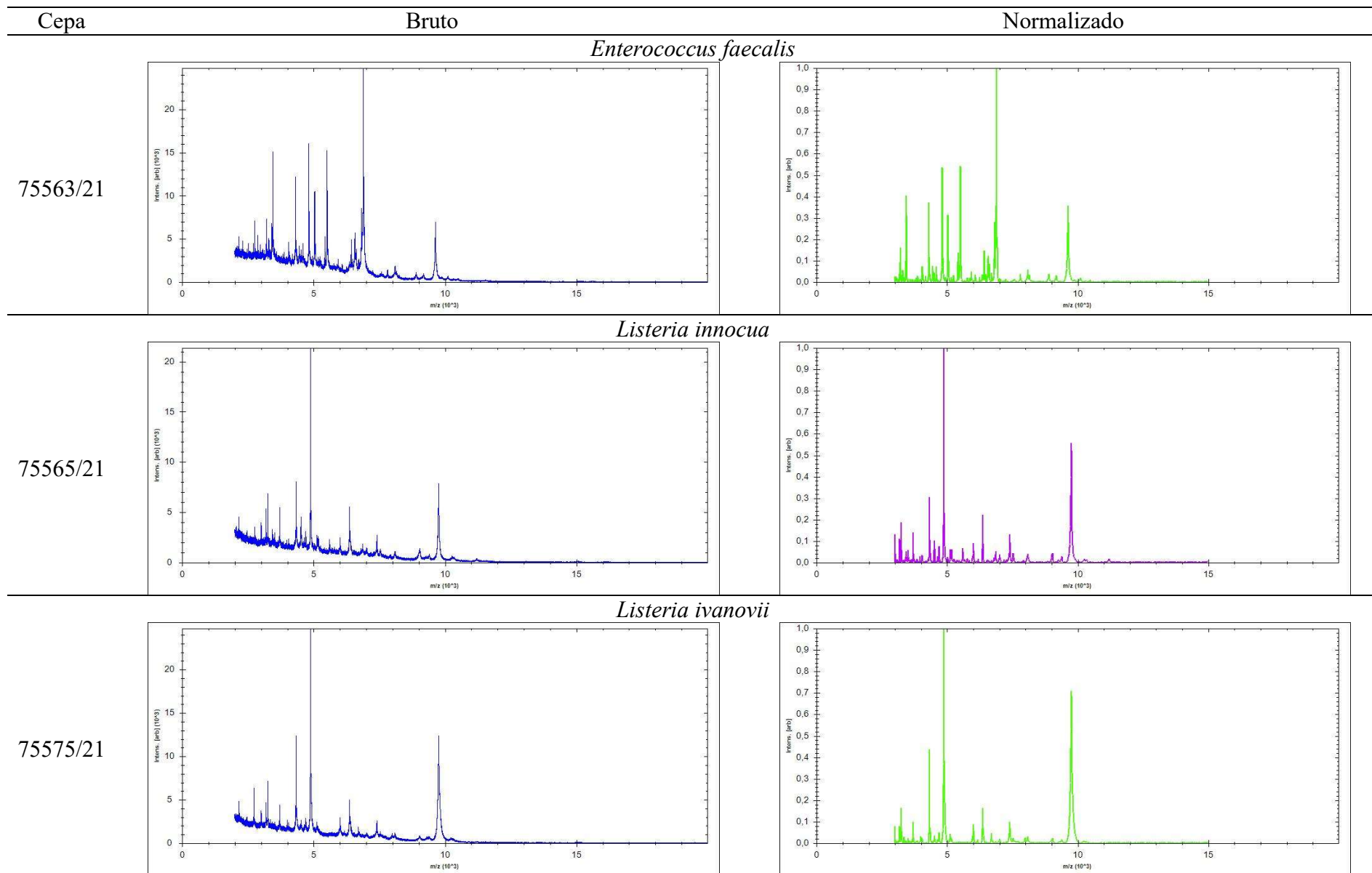
75587/21: *Salmonella sp.*75588/21: *Salmonella sp.*

75599/21: *Salmonella sp.*75600/21: *Salmonella sp.*75601/21: *Salmonella sp.*75604/21: *Escherichia coli*

75613/21: *Proteus mirabilis*75614/21: *Pseudomonas aeruginosa*75615/21: *Citrobacter freundii*75622/21: *Enterobacter cloacae*

APÊNDICE B – ESPECTROS DE MASSA OBTIDOS NA VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*





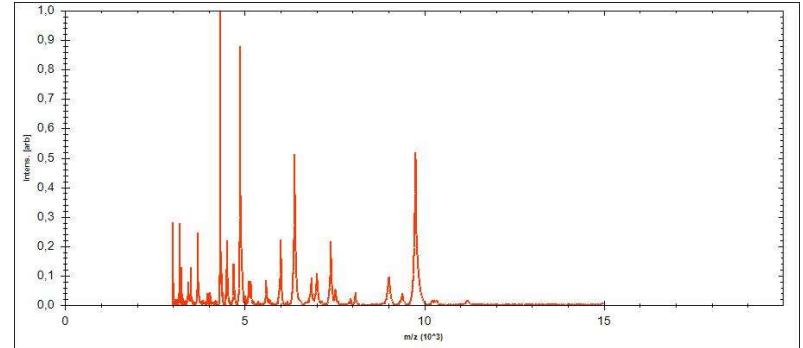
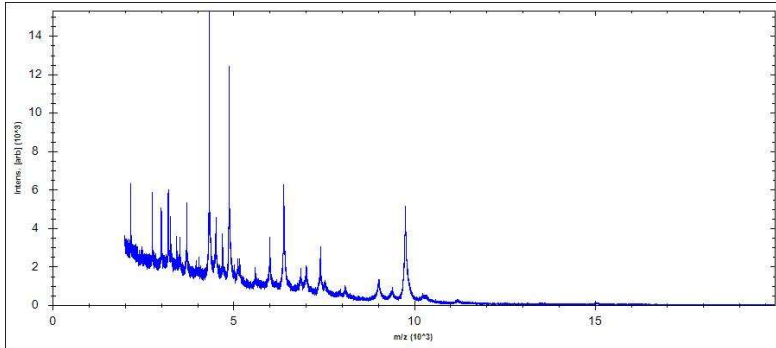
Cepa

Bruto

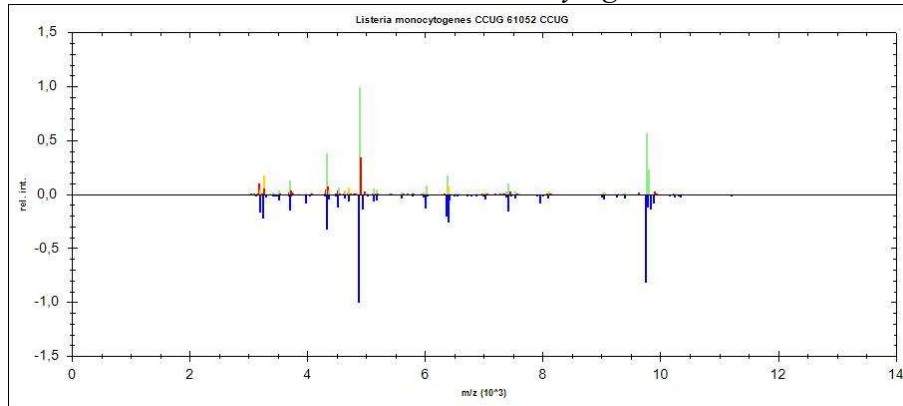
Normalizado

*Listeria welshimeri*

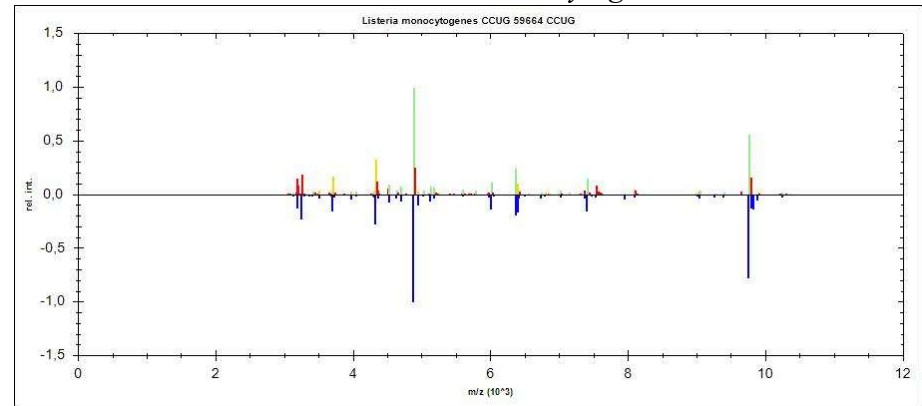
75576/21



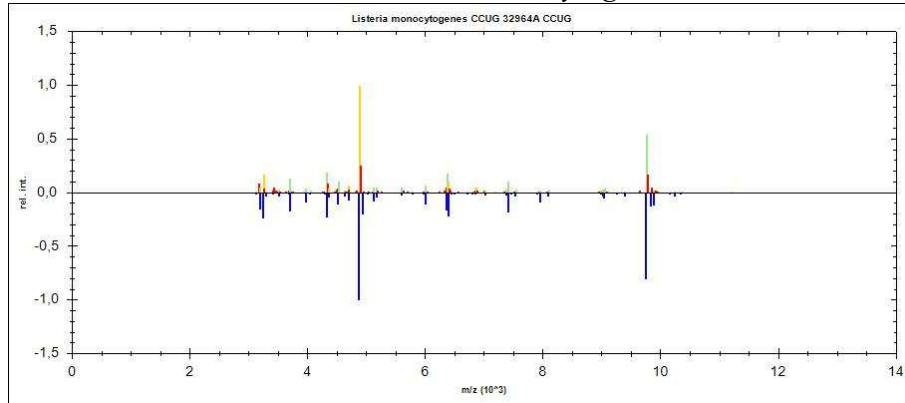
75537/21: *Listeria monocytogenes*



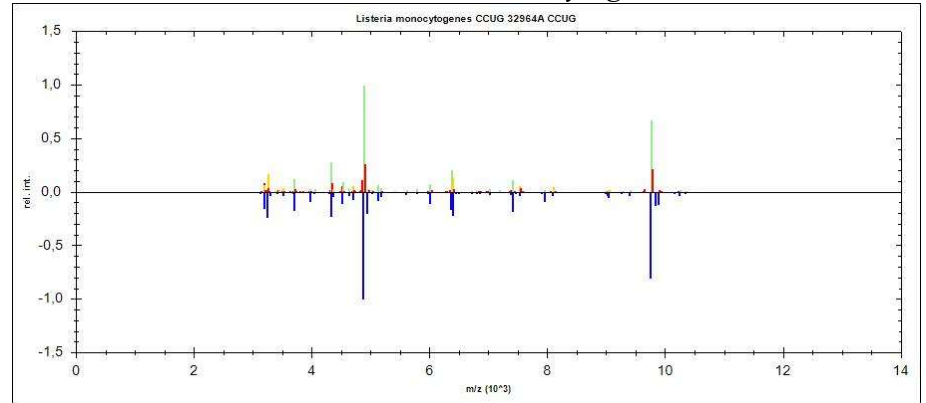
75538/21: *Listeria monocytogenes*



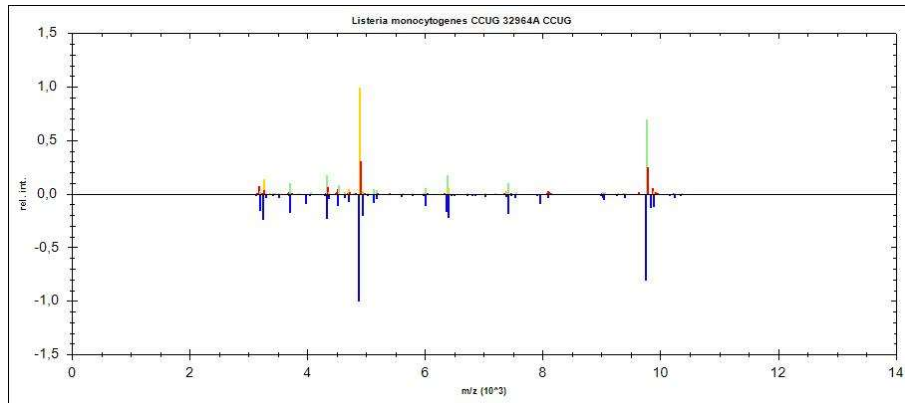
75541/21: *Listeria monocytogenes*



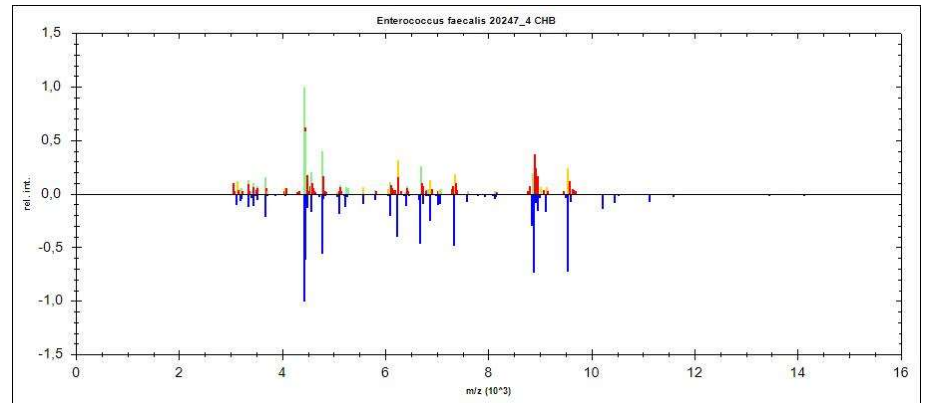
75550/21: *Listeria monocytogenes*



75551/21: *Listeria monocytogenes*

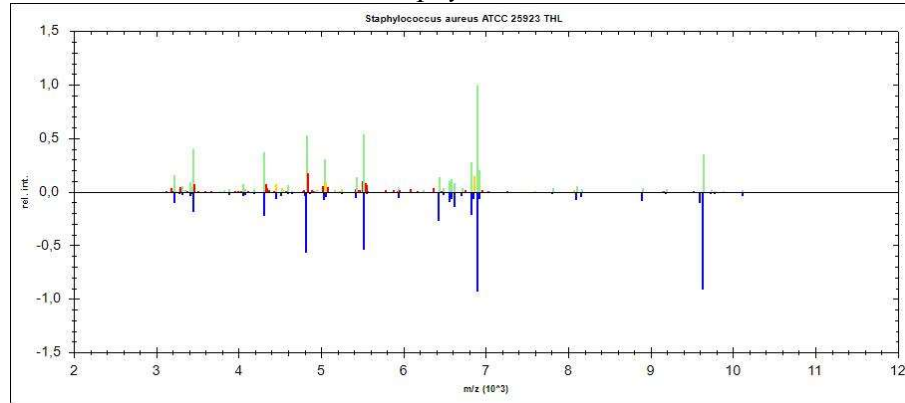


75562/21: *Enterococcus faecalis*

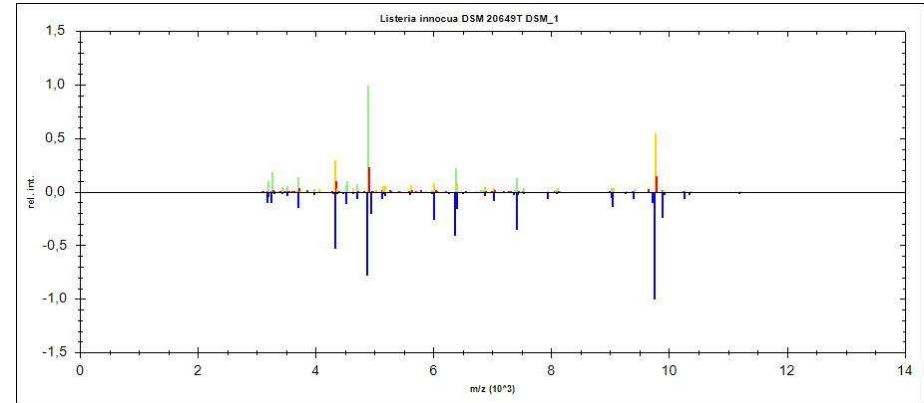




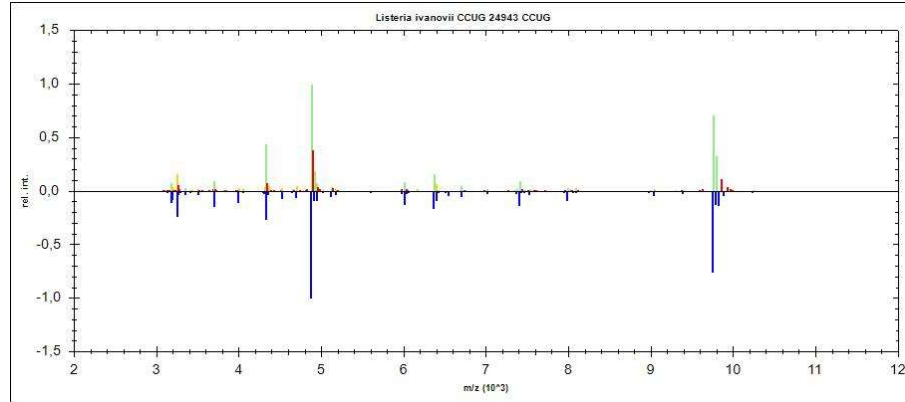
75563/21: *Staphylococcus aureus*



75565/21: *Listeria innocua*



75575/21: *Listeria ivanovii*



75576/21: *Listeria welshimeri*

