

Poster (Painel)**1434-1 MALDI-TOF ICMS: Avanços na Identificação de Fungos**

Autores: Cledir Santos (IBB, MUM - IBB-Instituto Bioeng Biotec, Micoteca da Univ do Minho) ; Nelson Lima (IBB, MUM - IBB-Instituto Bioeng Biotec, Micoteca da Univ do Minho)

Resumo

O sistema mais antigo para a classificação das espécies de fungos, que incluem fungos filamentosos e leveduras, são baseados em dados morfológicos, principalmente naqueles ligados às estruturas reprodutivas. No entanto, este método de classificação apresenta limitações críticas, tais como as culturas de fungos que não desenvolvem estruturas reprodutivas, ou a semelhança morfológica entre membros de espécies diferentes. A incorporação de testes bioquímicos e moleculares em taxonomia de fungos tem ajudado a resolver esses problemas. Apesar destes avanços as principais limitações situam-se por (1) os testes fisiológicos rápidos e fiáveis e os dados das sequências estão disponíveis ainda apenas para um número limitado de taxa; (2) a aplicação de métodos moleculares à rotina é relativamente caro e exige mão-de-obra altamente especializada; (3) apresentam atrasos na identificação (que em alguns casos pode ser de semanas) bem como limites na discriminação de espécies relacionadas. A espectrometria de massa, pela técnica de MALDI-TOF ICMS, tem sido usada como uma abordagem fenotípica para a identificação rápida de fungos. Quando aplicada à identificação de fungos, esta técnica está fundamentada na análise das proteínas constituintes das células microbianas intactas, onde o espectro de massa das proteínas é gerado e interpretado como um fingerprint celular. Para tal, uma pequena quantidade da amostra do material biológico – cerca de 50 µg de biomassa – é transferida directamente da placa de cultura para a placa de MALDI-TOF e recoberta por uma matriz orgânica em solução aquosa e acidificada. A acidez desta solução é fundamental para uma extracção proteica óptima. Depois de evaporada a fase líquida, obtém-se um material cristalizado, necessário à ionização das moléculas. As amostras são, então, submetidas a um sistema de vácuo e irradiadas por um laser pulsado de nitrogénio a 337 nm. Esta irradiação conduz à ionização suave das moléculas, onde a matriz orgânica previne a fragmentação molecular. A nuvem de iões gerada durante a ionização é acelerada para dentro do tubo “TOF”, onde esses iões são separados de acordo com os seus tempos de voos individuais. O tempo de voo de cada ião ocorre em função da razão massa/carga (m/z) e os espectros finais são obtidos numa escala de 2 a 20 kDa. Finalmente, esses espectros são tratados numa base de dados contendo espectros teóricos e experimentais para as diferentes espécies de fungos. A presente técnica é bastante robusta na identificação de fungos até ao nível de espécie. Contudo, em alguns casos, é possível a diferenciação desses microrganismos até ao nível de estirpe. No presente trabalho serão apresentados os últimos avanços sobre a técnica de MALDI-TOF aplicada à identificação de fungos, desenvolvidos na Micoteca da Universidade do Minho (www.micoteca.deb.uminho.pt).