



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1011000-3 B1



(22) Data do Depósito: 14/07/2010

(45) Data de Concessão: 22/10/2019

(54) Título: MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE MICRÓBIOS QUE COMPREENDEM BACTÉRIAS E LEVEDURAS NO SANGUE

(51) Int.Cl.: C12Q 1/04; G01N 33/68; G01N 33/569.

(30) Prioridade Unionista: 16/07/2009 DE 10 2009 033 368.1.

(73) Titular(es): BRUKER DALTONIK GMBH.

(72) Inventor(es): THOMAS MAIER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010060098 de 14/07/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/006911 de 20/01/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/12/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE MICRÓBIOS QUE COMPREENDEM BACTÉRIAS E LEVEDURAS NO SANGUE A presente invenção refere-se principalmente 5 à identificação de patógenos por espectrometria de massa em culturas de sangue provenientes de infecções na corrente sanguínea (septicemia). A invenção proporciona um método com o qual patógenos microbianos podem ser separados na forma purificada a partir de sangue após um cultivo relativamente breve num frasco de hemocultura, sem qualquer interferência de proteínas humanas ou frações residuais de partículas sanguíneas, como eritrócitos e leucócitos, e podem ser diretamente identificados por medição por espectrometria de massa de seus perfis proteicos. O método é baseado no uso de tensoativos relativamente fortes para destruir as partículas sanguíneas, dissolvendo as membranas celulares fracas e a maior parte das estruturas internas das partículas sanguíneas, apesar do fato dos tensoativos serem considerados fortes inibidores de ionização em MALDI e outros processos de ionização necessários para medições por espectrometria de massa. Esse método permite que patógenos desconhecidos sejam obtidos em sua forma pura por centrifugação ou filtração e sejam identificados no nível taxonômico de espécie ou subespécie. Problemas com DNA provenientes de altas concentrações de leucócitos podem ser resolvidos por meios especiais. Após o (...).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE MICRÓBIOS QUE COMPREENDEM BACTÉRIAS E LEVEDURAS NO SANGUE"**.

Campo de Invenção

5 A presente invenção refere-se à identificação de patógenos por espectrometria de massa em hemoculturas provenientes de infecções na corrente sanguínea (septicemia).

Antecedentes da Invenção

Muitas espécies de microorganismos (denominados micróbios
10 abaixo), especialmente incluindo bactérias e fungos unicelulares (como leveduras ou bolor), mas também algas e protozoários podem ser identificadas por espectrometria de massa com um elevado grau de certeza, através da reprodução de uma colônia da maneira usual em um meio nutriente, posteriormente transferindo pequenas quantidades de micróbios da colônia para
15 uma placa de suporte para amostra de espectrometria de massa e medindo um perfil proteico diretamente com um espectrômetro de massa. O espectro de massa particularmente representa as massas e abundâncias das diferentes proteínas solúveis que estão presentes em concentração suficientemente alta nos micróbios. Esse perfil proteico dos micróbios é usado para determi-
20 nar sua identidade por meio de uma análise de similaridade com os espectros de referência de uma biblioteca de espectros.

Espectrômetros de massa especializados para esse fim e programas correspondentes de avaliação e de análise de similaridade estão disponíveis comercialmente. Atualmente, esse procedimento de identificação
25 está se revelando altamente bem sucedido e conquistando rapidamente os laboratórios de microbiologia de todo o mundo.

"Identificação" dos micróbios significa categorizá-los dentro do sistema taxonômico de classificação hierárquica: Domínio (eucariontes e procariontes), reino, filo, classe, ordem, família, gênero, espécie e subespécie. A identificação de uma amostra de micróbios envolve a determinação,
30 pelo menos, do gênero, geralmente da espécie e, se possível, da subespécie ou mesmo da cepa, o que é importante, por exemplo, se diferentes subespécies ou cepas tiverem diferentes patogenicidades. Em um sentido mais

geral, uma identificação também pode significar uma caracterização em termos de outras características mais individuais dos micróbios, por exemplo, a resistência de um microrganismo a antibióticos.

O meio nutriente para o cultivo de uma colônia é geralmente constituído de ágar em uma placa de Petri, o que normalmente resulta no crescimento de cepas puras na forma de colônias microbianas separadas em cerca de seis horas a alguns dias, dependendo da potência reprodutiva dos micróbios. Se as colônias se sobrepuserem ou se misturarem muito, colônias puras poderão ser obtidas em um segundo cultivo, novamente realizado da maneira usual. Em um método mais simples, sobre alguns micróbios transferidos com uma pequena haste flexível de uma colônia selecionada para o suporte para amostra de espectrometria de massa é então gotejada uma solução fortemente acidificada de uma substância matriz convencional (geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, HCCA, ou ácido 2,5-diidroxibenzoico, DHB) para uma ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). O ácido (geralmente ácido fórmico ou ácido trifluoroacético) ataca as paredes celulares e o solvente orgânico (geralmente acetonitrila) da solução matriz pode penetrar nas células microbianas e fazer com que a sua parede celular enfraquecida arrebente. A amostra é então seca por evaporação do solvente, o que faz com que o material dissolvido na matriz se cristalice. Proteínas solúveis e, em menor grau, outras substâncias das células são incorporadas aos cristais da matriz.

Os cristais de substâncias da matriz com moléculas do analito incorporadas são então bombardeados com flashes de luz laser UV em um espectrômetro de massa, criando íons das moléculas do analito no plasma quente da nuvem de vapor; esses íons podem então ser separados de acordo com sua massa e medidos no espectrômetro de massa. Espectrômetros de massa de tempo de voo MALDI (MALDI-TOF-MS) especializados são normalmente utilizados para essa finalidade. O espectro de massa é o perfil dos valores de massa desses íons do analito. Eles são predominantemente íons de proteínas, tendo os íons com as informações mais úteis massas entre 3000 e 15.000 daltons, aproximadamente. Nesse método, os íons de pro-

teína são predominantemente carregados apenas com uma unidade (número da carga $z = 1$), o que permite simplesmente fazer referência à massa m dos íons, em vez de sempre usar o termo "relação massa/carga", m/z , como é necessário e convencional com outros tipos de espectrometria de massa.

5 O perfil das proteínas é muito característico da espécie microbiana em questão, pois cada espécie microbiana produz seu próprio conjunto de proteínas geneticamente predeterminadas, cada uma com sua própria massa molecular característica. A abundância de proteínas com concentrações mais altas que podem ser detectadas por espectrometria de massa
10 também é amplamente controlada geneticamente e depende apenas ligeiramente das condições nutritivas ou da maturidade da colônia. Os perfis proteicos são igualmente característicos dos tipos de micróbios como as impressões digitais são características de cada ser humano. Atualmente, as bibliotecas confiáveis e validadas com espectros de massa de referência
15 bem documentados de micróbios estão sendo exaustivamente estendidas por muitos laboratórios de instituições de pesquisa públicas e privadas e de institutos microbiológicos de universidades. As bibliotecas de referência devem cumprir sólidos requisitos para serem admitidas segundo os preceitos da medicina e da lei.

20 Esse método de identificação provou ser extremamente bem sucedido. A certeza de uma identificação correta é muito maior do que a dos métodos de identificação microbiológica utilizados até hoje. Foi possível provar que a certeza da identificação foi muito superior a 95 por cento para centenas de diferentes tipos de micróbios. Na maioria dos casos de dúvida, onde havia alguns desvios provenientes dos resultados dos métodos de identificação microbiológica utilizados até hoje, o sequenciamento genético confirmou a exatidão da identificação por espectrometria de massa.
25

Se a biblioteca não contiver um espectro de massa de referência para uma espécie microbiana sob investigação (o que ocasionalmente ocorre devido as milhões de espécies microbianas e ao tamanho limitado das bibliotecas espectrais atuais), as buscas nas bibliotecas podem normalmente
30 produzir classificações valiosas sobre os níveis taxonômicos superiores de

gênero ou família dos micróbios, porque os micróbios relacionados frequentemente contêm uma série de tipos idênticos de proteína. No entanto, esses casos são cada vez mais raros; atualmente, os micróbios patogênicos foram praticamente todos registrados na forma de espectros de referência, podendo geralmente ser identificados com precisão até o nível de espécie microbiana.

O método brevemente descrito acima sobre o uso de uma pequena haste flexível para espalhar alguns micróbios provenientes de uma colônia em um ponto de amostra de um suporte para amostra de espectrometria de massa, sobre o qual é então gotejada uma solução matriz, é o mais simples e, até hoje, mais rápido tipo de preparação de amostras. Se uma colônia for visível apenas após o cultivo, levará apenas de uma a duas horas, no máximo, até que a identificação esteja completa, ainda que centenas de amostras tenham que ser analisadas ao mesmo tempo. Os suportes para amostras para espectrometria de massa com 48, 96 ou 384 pontos de amostra cada estão disponíveis comercialmente; a obtenção de espectros de massa a partir dessas quantidades de amostras leva cerca de meia hora a duas horas. Se a identificação for urgente, as amostras individuais de micróbios poderão ser identificadas em poucos minutos (embora após o cultivo, o que é sempre demorado).

Outros métodos de preparação de amostras também têm sido investigados, como a extração de proteínas após os micróbios terem sido destruídos por sonicação ou tratamento mecânico ou métodos para extrair as proteínas dos micróbios após as paredes celulares, que ocasionalmente são rígidas, terem sido enfraquecidas por ácidos agressivos. Esses métodos de desintegração são utilizados quando o método normal de esfregaço falha devido às paredes das células dos micróbios não terem sido destruídas por gotejamento com a solução da matriz. Se os métodos de esfregaço produzirem espectros de massa bons o suficiente para comparação e todos os métodos de desintegração fornecerem espectros muito semelhantes aos dos métodos de esfregaço, eles frequentemente exibirão pouca interferência nos espectros de massa.

Atualmente, espectros de massa de proteínas microbianas são geralmente obtidos no modo linear em espectrômetros de massa de tempo de voo MALDI (MALDI-TOF) porque eles possuem uma sensibilidade para detecção particularmente elevada, apesar da resolução de massa e da precisão de massa dos espectros de espectrômetros de massa de tempo de voo no modo refletor serem muito melhores. No entanto, no modo refletor, apenas cerca de um vigésimo dos sinais de íons aparecem e a sensibilidade de detecção é de uma a duas potências de dez pior. A alta sensibilidade é baseada no fato de que não apenas os íons estáveis, mas também os íons de fragmentos muito mais abundantes e até mesmo as partículas neutras de uma chamada decomposição "metaestável" que ocorre durante o voo dos íons são detectados no modo linear de um espectrômetro de massa de tempo de voo. Multiplicadores de elétrons secundários (SEM) são utilizados como detectores de íons, medindo íons moleculares, íons fragmentados e partículas neutras, porque todos eles geram elétrons secundários com o impacto. Todos os íons fragmentados e partículas neutras gerados após a aceleração na fonte de íons provenientes de uma espécie de íon parental têm a mesma velocidade que os íons parentais e, assim, chegam ao detector de íons ao mesmo tempo. O tempo de chegada é uma medida da massa dos íons que estavam originalmente íntegros.

A elevada sensibilidade de detecção é tão crucial para muitas aplicações que se aceitam muitas das desvantagens de operação de espectrômetros de massa de tempo de voo no modo linear, como uma resolução em massa significativamente inferior, por exemplo. A energia do laser ionizante e exercente de dessorção é aumentada para essas aplicações, algo que aumenta o rendimento de íons, mas também aumenta a sua instabilidade, embora isso não tenha importância aqui.

A obtenção de espectros de massa com espectrômetros de massa de tempo de voo geralmente exige que um número muito elevado de espectros individuais seja medido e digitalizado em rápida sucessão, sendo os referidos espectros individuais geralmente somados, somando-se pontos de medição com o mesmo tempo de voo para formar um espectro somado.

Os íons de cada espectro individual são gerados por um flash de laser a partir de um laser UV pulsante para cada espectro. Os espectros somados devem ser gerados dessa forma por causa do pequeno intervalo dinâmico de medição e grande ruído no sinal do espectro individual. Um mínimo de aprox. 50 e em alguns casos até 1000 ou mais espectros individuais são obtidos aqui; um espectro somado geralmente consiste de várias centenas de espectros individuais, os quais modernos espectrômetros de massa obtêm e somam em poucos segundos.

Para a identificação de micróbios, geralmente espectros de massa de cerca de 2000 daltons até elevadas extensões de massa de 20.000 daltons são medidos. No entanto, os sinais de massa do intervalo inferior de massa de até cerca de 3000 daltons não possuem um alto grau de confiabilidade, pois grande parte deles se origina a partir de peptídeos de membrana acoplados externamente aos micróbios, a partir de ácidos graxos, dependendo do tipo e disponibilidade de nutrientes, e a partir de uma variedade de outras substâncias que estão presentes apenas por acaso. Os melhores resultados de identificação são obtidos se apenas os sinais de massa do intervalo de massa entre 3000 e 15.000 daltons forem avaliados. A baixa resolução de massa, que ocorre pelas razões apresentadas, significa que os grupos isótopos cujos sinais de massa diferem, cada um, em um dalton não podem mais ser separados dentro desse intervalo de massa. Os sinais de massa, portanto, refletem a forma dos envoltórios dos grupos isótopos.

Esse método de identificação de micróbios requer uma cultura pura de microrganismos idênticos, um chamado "isolamento", a fim de obter um espectro de massa que não seja sobreposto por sinais de outros tipos de micróbios. Constatou-se, no entanto, que espectros de massa de misturas de duas espécies microbianas também podem ser avaliados por métodos especiais e que ambas as espécies microbianas podem ser identificadas. A certeza da identificação é apenas ligeiramente prejudicada. Se mais de duas espécies microbianas contribuírem para o espectro de massa, a probabilidade de identificação e a precisão da identificação diminuirão drasticamente.

A identificação de micróbios é particularmente importante para

micróbios infecciosos dentro da corrente sanguínea, o que é chamado de septicemia. Os micróbios são normalmente liberados no sangue de forma contínua ou em lotes a partir de focos de infecções desconhecidos. Neste ponto, é importante que espécies patogênicas sejam identificadas precocemente para iniciar o mais rapidamente possível um tratamento médico direcionado com os antibióticos corretos.

O método de identificação por espectrometria de massa compete com a análise de PCR, onde determinadas sequências genéticas do DNA do micróbio, que se caracterizam por operar seletivamente pares de primers, são replicadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Esses métodos são rápidos e podem levar a resultados dentro de algumas horas. No entanto, esses métodos de análise de PCR precisam de algum conhecimento prévio sobre espécies, gêneros, famílias ou classes de micróbios, a fim de selecionar pares de primers corretos. Em geral, apenas uma classificação "grosseira" é realizada de acordo com as características gram-positivas ou gram-negativas, por exemplo. A determinação sobre o nível de uma espécie microbiana só é possível em casos específicos e requer uma abordagem muito específica baseada em suposições. O método é geralmente limitado a patógenos particularmente perigosos, distintos e de ocorrência frequente, como *Staphylococcus aureus*, por exemplo. Identificações positivas de espécies microbianas individuais continuam sendo valiosos golpes de sorte. Em casos de identificação negativa, o conhecimento da exclusão de tais micróbios perigosos é, certamente, também valioso, mas não fornece uma base para uma terapia. A determinação precisa das espécies microbianas deve então ser deixada para os métodos microbiológicos convencionais, que podem, no entanto, muito facilmente levar de três a cinco dias.

No documento DE 10 2007 058 516 A1 (WPO 2009/065580 A1), é descrito um método que separa diretamente patógenos de fluidos corporais por centrifugação ou filtração, para que os micróbios possam ser transferidos dos depósitos (pellets de centrifugação ou filtração) para a placa de suporte para amostra. Um método ainda melhor, também descrito no documento, é desintegrar os micróbios dos depósitos após a remoção do sobre-

nadante ainda dentro do tubo de centrifugação, por exemplo, adicionando alguns microlitros de uma solução matriz fortemente acidificada, com posterior transferência da solução com as proteínas liberadas para a placa de suporte para amostra de espectrometria de massa. Com a centrifugação, essa
5 desintegração é possível mesmo quando nenhum pellet visível é produzido. O limite de visibilidade para um pellet de centrifugação é de cerca de 10^6 micróbios; em contrapartida, o limite de detecção, é atualmente cerca de 10^4 micróbios, mas poderá ser melhorado no futuro. 10^4 micróbios geralmente contêm mais de 100 picogramas de proteínas solúveis, sendo, porém, o limi-
10 te de detecção em espectrometria de massa muito inferior a isso. Uma vez que uma fase de cultivo não é necessária para infecções em fluidos corporais claros, a identificação no laboratório de espectrometria de massa com esse método de centrifugação direta dos fluidos corporais pode ser realizada dentro de alguns minutos.

15 Esse método de centrifugação ou filtração direta dos micróbios apresenta êxito, pois, na grande maioria dos casos (muito mais de 70 por cento), as infecções microbianas agudas nos fluidos corporais são causadas por apenas uma única espécie microbiana. Em uma baixa porcentagem de cerca de 15 por cento, duas espécies microbianas estão envolvidas; nesses
20 casos, geralmente ambas podem ser reconhecidas nos espectros de massa. Essa pureza de espécies de patógenos de infecções agudas apresenta nítido contraste com outras ocorrências de micróbios no interior ou exterior do corpo humano – o número aprox. de 10^{14} bactérias da flora intestinal de um intestino humano compreende, pelo menos, 400 espécies de bactérias que
25 vivem em equilíbrio umas com as outras, por exemplo. Mas o método de centrifugação direta só será bem sucedido se esses micróbios estiverem presentes em concentrações muito altas, de mais de 10^4 micróbios por mililitro, o que é muito raro para fluidos corporais internos. Fluidos corporais são geralmente estéreis, ou seja, eles geralmente não contêm micróbios.

30 Como descrito no documento citado, esse método de sedimentação dos micróbios em uma centrífuga ou microfiltro pode ser aplicado diretamente e com um alto grau de sucesso a todos os fluidos corporais claros,

como linfa, líquido sinovial ou líquido cefalorraquidiano (líquor), e até mesmo a fluidos corporais excretados, como urina ou fluido lacrimal. Para fluidos corporais que contêm partículas endógenas, como sangue total, por exemplo, as etapas intermediárias devem ser introduzidas primeiramente no crescimento dos micróbios através do cultivo do sangue, pois a concentração de micróbios permanece geralmente apenas no intervalo de 0,5 a 10 micróbios por mililitro, e, em segundo lugar, destruindo completa e exaustivamente as partículas sanguíneas, como eritrócitos ou leucócitos, para eliminar completamente todas as proteínas humanas. Nos documentos citados, essa destruição é exemplarmente feita por adição de água destilada. As membranas celulares muito delicadas das partículas humanas são facilmente destruídas pela pressão osmótica da água que entra, em contraste com as paredes celulares muito mais rígidas de bactérias. Pela adição repetida de água destilada e centrifugação, um pellet suficientemente puro deverá ser obtido, o qual não deverá mais conter resíduos das partículas humanas.

No entanto, experimentos realizados no laboratório do requerente com esse método de adição de água destilada não tiveram sucesso no fornecimento de depósitos de centrifuga suficientemente puros, mesmo quando os processos de lavagem e centrifugação foram repetidos algumas vezes. Ainda que os depósitos não mantiveram uma cor ligeiramente avermelhada, as sobreposições com sinais de proteína humana sempre interferiram nos sinais de proteína microbiana desses depósitos, a tal ponto que a identificação torna-se incerta.

A invenção procura fornecer um método rápido para a separação adequada dos patógenos de uma septicemia no sangue, sem quaisquer vestígios de proteínas humanas remanescentes, de modo que a identificação por espectrometria de massa até o nível de espécie ou subespécie e, além disso, outras investigações sobre os patógenos tornem-se possíveis.

Breve Descrição da Invenção

A invenção é baseada no método para deposição direta através de sedimentação ou peletização dos micróbios de fluidos corporais, por centrifugação ou filtração, conhecido a partir do documento DE 10 2007 058 516

A1 (WPO 2009/065580 A1), porém utiliza uma solução de uma forte substância tensoativa, ou seja, anfipática, em vez de água destilada pura para a destruição das partículas sanguíneas. O SDS (dodecil sulfato de sódio), um forte tensoativo aniônico que também é usado na biotecnologia como um agente desnaturante para proteínas, provou ser ideal, apesar dos fatos de que (1) traços de tensoativos são conhecidos por serem inibidores de ionização para proteínas e outras substâncias do analito em processos de ionização como MALDI; e (2) tensoativos fortes como o SDS são conhecidos por matar micróbios, ou seja, eles são bactericidas, destruindo sua capacidade reprodutiva.

Em uma modalidade particularmente simples, o tensoativo é adicionado diretamente e sem qualquer outro pré-tratamento em cerca de um mililitro de sangue de uma hemocultura e misturado bem por dez a trinta segundos em um agitador. Preferencialmente, o tensoativo é adicionado como uma solução, por exemplo, na forma de 10 µl a 200 µl de uma solução aquosa de SDS de concentração de 5 a 20%. Imediatamente após misturar, a mistura é centrifugada por dois minutos a 10.000 g e o sobrenadante é descartado. Se o pellet for visível, o depósito exibirá um branco surpreendentemente puro na maioria dos casos. Para remover qualquer vestígio do tensoativo, o pellet é lavado com um mililitro de água destilada e novamente centrifugado. O sobrenadante é novamente removido. O depósito poderá agora ser simplesmente recolhido com alguns microlitros de ácido fórmico e acetonitrila e um a dois microlitros da solução poderão ser transferidos para o suporte para amostra de espectrometria de massa, onde a solução matriz será adicionada, e secos.

Uma vez que todas essas etapas preparatórias podem ser realizadas muito rapidamente, as preparações de amostras na placa de suporte para amostra estão disponíveis para medições espectrométricas de massa após, no máximo, quinze minutos. A introdução da placa de suporte para amostra na fonte de íons operada sob vácuo do espectrômetro de massa e a medição também levam apenas alguns minutos, de modo que a identificação por espectrometria de massa esteja disponível em menos de meia hora.

Surpreendentemente, são obtidos espectros de massa limpos dos perfis proteicos dos micróbios sem sinais de interferência de proteínas humanas, resultando em medição altamente sensível, apesar do uso intermediário de tensoativos.

- 5 Esse método de sedimentação dos micróbios de uma amostra de sangue para identificação por espectrometria de massa pode ser realizado apenas se o sangue tiver uma alta concentração de micróbios, com mais de 10^4 micróbios por mililitro; geralmente, esse não é o caso do sangue original de um paciente. Na septicemia normal, a concentração de micróbios
- 10 vivos e ativos, medida em "unidades formadoras de colônias" (UFC), fica entre 0,5 e 10 UFC/mL; apenas crianças infectadas apresentam concentrações de até e acima de 100 UFC/mL. Os micróbios do sangue, portanto, devem ser cultivados com aditivos adequados, incubando o sangue em frascos adequados para hemocultura à temperatura ótima. Esse cultivo é bem conhecido e significativamente mais rápido do que o cultivo de culturas em placas de
- 15 Petri e, especialmente para infecções graves, geralmente fornece micróbios suficientes para a identificação dentro de algumas horas até alguns dias. Apenas micróbios com crescimento muito lento, por exemplo, algumas micobactérias, exigem períodos de cultivo de muitos dias a algumas semanas.
- 20 Esse método possui a vantagem exclusiva de classificar os micróbios sem qualquer conhecimento prévio até o nível de espécies ou até mesmo subespécies de micróbios. Nenhuma inspeção morfológica (ou microscópica), reação bioquímica básica ou outros tipos de testes prévios são necessários. Conhecendo a espécie microbiana, o médico que trata o paci-
- 25 ente poderá imediatamente iniciar uma terapia direcionada, porque, para a maioria dos micróbios, está disponível a informação sobre os antibióticos aos quais eles respondem. As resistências dessas espécies microbianas a antibióticos, que podem variar com a região ou com o hospital, geralmente são também conhecidas. O início precoce do tratamento direcionado de um
- 30 paciente que está em uma unidade de tratamento intensivo com uma septicemia não apenas é extremamente benéfico para o paciente (até salva vidas), mas também altamente econômico.

Embora a dissolução de partículas sanguíneas por tensoativos fortes, em especial por SDS, seja conhecida na microbiologia, o método geralmente não é aplicado. O documento U.S 4.753.749 A descreve agentes de limpeza microbicidas e ensina que detergentes mostram uma certa quantidade de
5 atividade microbicida que não é suficientemente alta para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. O documento U.S 5.336.671 A descreve o uso de tensoativos e antiespumantes em composições fungicidas. Tensoativos fortes como o SDS são considerados bactericidas; e a capacidade reprodutiva dos micróbios é importante para os métodos de identificação microbiológica. No
10 entanto, isso não se aplica ao método de identificação por espectrometria de massa. Porém, no método muito rápido conforme a invenção descrita acima, onde os micróbios são expostos ao SDS por apenas alguns minutos, no máximo, surpreendentemente muitos micróbios sobrevivem e mantêm a sua capacidade reprodutiva, apesar do efeito antibiótico do tensoativo, e assim o método
15 de separação e isolamento de micróbios a partir de sangue também pode ser usado para fornecer mais micróbios na forma isolada para outras investigações, como, por exemplo, testes de resistência.

A invenção é baseada especialmente na dissolução de diferentes tipos de corpúsculos sanguíneos rápida e completamente, sem destruir os mi-
20 cróbios. A delicada membrana celular das partículas sanguíneas é composta predominantemente de fosfolípidios, que formam uma membrana por meio de ligações não covalentes. Tensoativos fortes, especialmente o SDS, dissolvem todas as ligações não covalentes de proteínas e lipídios e destroem a estrutura quaternária e terciária das moléculas. As membranas celulares, portanto, dis-
25 solvem-se completamente. As estruturas internas das partículas sanguíneas também são destruídas pelo SDS e dissolvidas, incluindo a membrana do núcleo celular e os cromossomos dos leucócitos. Todos esses componentes dissolvidos são removidos com o fluido sobrenadante após a centrifugação ou por filtração. Algumas complicações com o DNA de leucócitos são discutidas abaixo.

30 Por outro lado, as paredes celulares de bactérias são muito estáveis; elas consistem principalmente de mureínas polimerizadas com ligações cruzadas. Essa malha com ligações covalentes resiste ao efeito dissol-

vente dos tensoativos. Para a subsequente identificação por espectrometria de massa, não é importante se os micróbios morrem (por exemplo, por desdobramento da estrutura terciária ou quaternária das proteínas internas) ou permanecem capazes de se reproduzir durante esse método, desde que as proteínas do interior não sejam perdidas ou alteradas em sua estrutura primária. No entanto, para muitos micróbios, esse método de curto prazo de separação e isolamento, de acordo com a invenção, ainda deixa micróbios suficientes, que podem ser reproduzidos na forma isolada em um cultivo posterior.

10 Breve Descrição das Figuras

Na figura 1, é apresentado o procedimento simples e básico, conhecido pelo sucesso com sangue de todos os pacientes com níveis normais de leucócitos.

15 A figura 2 exhibe um método para superar os problemas com aglutinação de DNA para altos níveis de leucócitos, mas a custo da diminuição da sensibilidade.

A figura 3 apresenta um procedimento com sensibilidade usual que pode ser aplicado a todas as amostras de sangue com altos níveis de leucócitos.

20 Modalidades preferidas

As modalidades preferidas descritas abaixo são baseadas em amostras de sangue que possuem uma concentração suficientemente elevada de micróbios, com mais de cerca de 10^4 micróbios por mililitro. Apenas em casos extremamente raros, o material utilizado poderá ser o sangue entregue no estado original, se o médico comunicar uma infecção extremamente aguda; normalmente, o método relaciona-se ao sangue proveniente de um cultivo de várias horas a alguns dias em frascos adequados para cultivo de sangue, que estão comercialmente disponíveis. O especialista sabe que o cultivo é normalmente realizado para pares de amostras de sangue em pares de frascos para cultivo de sangue, um para micróbios aeróbios e outro para micróbios anaeróbios. Os frascos já contêm anticoagulantes e nutrientes; após a adição do sangue, eles são incubados em uma incubadora a 37°

Celsius. Além disso, os frascos de cultivo de sangue já contêm inibidores ou material de adsorção para a maioria dos antibióticos. Mesmo que seja tentada uma identificação imediata do sangue original (o que pode se tornar possível com mais frequência no futuro, quando a sensibilidade de detecção da espectrometria de massa for suficientemente desenvolvida), é conveniente cultivar a porção não utilizada do sangue. Esse sangue serve como uma reserva no caso do método de identificação direta com o sangue original não resultar em uma identificação suficientemente garantida.

Existem vários tipos de frascos especiais para cultivo de sangue disponíveis comercialmente, com indicadores embutidos para detecção de um estado de crescimento suficiente de microorganismos. Na maioria dos casos, esses indicadores são baseados em uma medição do aumento da concentração de dióxido de carbono produzido pelos microorganismos. Esses frascos para cultivo de sangue são fáceis de manusear e indicam automaticamente por um sinal a reprodução suficiente de micróbios. No entanto, investigações nos laboratórios do requerente mostraram que esse sinal é dado um pouco tarde para identificações por espectrometria de massa. Identificações bem sucedidas já podem ser obtidas com sangue cultivado duas a quatro horas antes que o sinal indique a reprodução suficiente de micróbios. Portanto, em casos de septicemia perigosa e crítica, pode ser oportuno tentar uma identificação por espectrometria de massa dos micróbios do sangue cultivado a cada uma ou duas horas ou outros intervalos de tempo apropriados, não esperando pelo sinal.

Um método antigo para obtenção de micróbios diretamente a partir do sangue (sem cultura em sangue) para posterior cultivo em placas de Petri foi desenvolvido por G. L. Dorn por volta de 1976, utilizando lise das partículas sanguíneas e centrifugação suave. O desenvolvimento do método de lise-centrifugação resultou nos conhecidos tubos "IsolatorTM", disponibilizados comercialmente pela primeira vez pela DuPont (Wilmington, EUA), posteriormente pela Wampole Laboratories, Cranbury, NJ, EUA, e hoje também pela Oxoid Limited, Basingstoke Hunt, Inglaterra. IsoladorTM é uma marca comercial da Carter-Wallace, Inc., Nova Iorque, N.Y. 10105 EUA. Du-

rante os últimos trinta anos, muitos milhões de tubos Isolator™ foram utilizados em todo o mundo para separar micróbios, especialmente micobactérias liberadas do interior de macrófagos humanos, um tipo de leucócitos. De acordo com o "Wampole Isolator™ Manual", o tubo Isolator™ contém (a) saponina para lise da célula hospedeira, (b) polipropileno glicol como retardante de espuma, (c) polianetol sulfonato de sódio (SPS) como anticoagulante, (d) EDTA como anticoagulante, (e) Fluorinert, um plástico líquido imiscível em água para a concentração de bactérias (como proteção da centrifugação). Existem diferentes tipos de saponinas, todas elas são detergentes naturais (tensoativos) gerados por diferentes plantas. A saponina do interior do tubo Isolator™ é uma saponina detoxificada, capaz de dissolver as paredes celulares das partículas sanguíneas humanas sem matar os micróbios. Os tubos Isolator™ são usados para uma centrifugação suave a apenas 3000 g por um tempo bastante longo de 30 minutos, também com a intenção de não danificar os micróbios. O objetivo do método é a extração de micróbios ativos a partir do sangue para um recultivo dos micróbios em nutrientes adequados em placas de Petri.

Em contraste com esse método, a presente invenção visa a uma recuperação rápida de micróbios purificados a partir de sangue cultivado para uma identificação por espectrometria de massa, com a absoluta necessidade de eliminar todos os vestígios de proteínas humanas que, de outra forma, atrapalhariam a identificação. A capacidade reprodutiva dos micróbios, que é importante para os métodos de identificação microbiológica, não é necessária para o método de identificação por espectrometria de massa, pois se trata apenas da integridade estrutural das paredes celulares e da integridade química das moléculas proteicas internas, não da capacidade de reprodução, que deve ser mantida. Para a identificação por espectrometria de massa, não será desempenhado nenhum papel se as proteínas internas forem desnaturadas por desdobramento da sua estrutura terciária e quaternária. Porém, no método muito rápido conforme a invenção descrita acima, onde os micróbios são expostos ao SDS por apenas alguns minutos, no máximo, constata-se que muitos micróbios mantêm a sua capacidade reprodu-

tiva, apesar do efeito antibiótico do SDS, e assim o método de separação e isolamento de micróbios a partir de sangue também pode ser usado para fornecer mais micróbios na forma isolada para outras investigações, como, por exemplo, testes de resistência.

5 Uma modalidade muito simples, mas já muito bem sucedida, do método de isolamento e separação de micróbios a partir de sangue cultivado é apresentada na figura 1. Ela é iniciada com o preenchimento com quase um mililitro de sangue de cada um dos vários tubos de centrífuga especiais, adicionando-se uma solução de tensoativo e misturando-se bem. O tensoativo é preferencialmente adicionado como uma solução, na forma de 20 a 200
10 microlitros (preferencialmente 100 microlitros) de uma solução com 5 a 20 por cento de SDS (preferencialmente 10 por cento), por exemplo. O preenchimento de vários tubos de centrífuga permite que a centrífuga seja equilibrada e também torna possível obter imediatamente amostras de confirmação para uma identificação confiável. Após misturar por 10 a 30 segundos
15 em um agitador, a amostra de sangue é centrifugada nos tubos de centrífuga por dois minutos a 10.000 g. O líquido vermelho escuro sobrenadante é removido, por exemplo, com uma pipeta convencional com ponteiros removíveis. O depósito de micróbios é então recolhido e lavado com água destilada; após mais centrifugação, resta um depósito de micróbios isolados que,
20 se visível, é puramente branco. Apenas em casos críticos o procedimento de lavagem deve ser repetido para eliminar todos os vestígios de proteínas humanas; cada processo de lavagem prolonga o procedimento total por cerca de apenas dois a três minutos.

25 A manipulação da solução de SDS requer um pouco de cautela, pois a solução facilmente forma espuma e a espuma firme dura por horas ou mesmo dias, dificultando o uso do líquido. Preferencialmente, um inibidor de espuma (antiespumante) pode ser adicionado à solução de SDS. Existem vários tipos de antiespumantes no mercado. O princípio da aplicação de um
30 antiespumante já é conhecido em tubos Isolator™.

Após a última remoção do sobrenadante, as proteínas solúveis dos micróbios devem ser extraídas. Isso pode ser feito pela destruição das

paredes celulares por meio físico-químico e pela dissolução das proteínas. Geralmente, a extração é simplesmente realizada por adição de cerca de alguns microlitros de ácido fórmico a 70 por cento, o qual ataca agressivamente os peptidoglicanos (mureínas) das paredes celulares dos micróbios e destrói a estrutura celular. A mesma quantidade de acetonitrila é então adicionada, a fim de dissolver a maior quantidade de proteínas possível. Somente em casos raros, outros meios como sonicação ou destruição mecânica são necessários. A solução das proteínas solúveis é centrifugada, a fim de precipitar os componentes sólidos, como fragmentos de parede celular, por exemplo, e cerca de um microlitro do sobrenadante é pipetado para cada ponto de amostra de uma placa de suporte para amostra MALDI. Após a secagem, cerca de um microlitro de uma solução de substância matriz, preferencialmente HCCA ou DHB dissolvido em água e acetonitrila com uma pequena quantidade de ácido trifluoroetanoico, é adicionado a cada uma das preparações de amostra. Todos esses procedimentos devem ser realizados simultaneamente para vários tubos de centrifuga que foram preenchidos com amostras de sangue. Após a secagem, as preparações de amostras da placa de suporte para amostra estão prontas para a obtenção de espectros de massa. Se houver mais amostras de sangue para serem analisadas, será possível trabalhar com elas simultaneamente, depositando as preparações de amostra em outros pontos de amostra da mesma placa de suporte para amostra MALDI.

Existem diferentes tipos de placas de suporte para amostra MALDI disponíveis comercialmente, com 48, 96 e 384 pontos de amostra. Existem, por exemplo, placas de suporte para amostra que contêm locais para fixação hidrofílica de cerca de dois milímetros de diâmetro em um ambiente hidrofóbico. A solução transferida forma então uma gota hemisférica de dois milímetros de diâmetro sobre o local de fixação. Outras placas de suporte para amostras comercializadas contêm camadas pré-fabricadas de substância matriz (HCCA) sobre os pontos de amostra. As placas de suporte para amostra de uso único contêm anéis visíveis gravados a laser com dois milímetros de diâmetro, que detêm o espalhamento de gotas. Todas essas

placas de suporte para amostra podem ser utilizadas de forma adequada para a parte de medição em espectrometria de massa dos métodos conforme a invenção.

O método simples de preparação para amostras para medição
5 pode ser modificado em uma ampla variedade de maneiras. Uma opção é utilizar as placas de suporte para amostra que já possuem uma fina camada da substância matriz, HCCA, por exemplo. O sobrenadante de ácido fórmico e acetonitrila é então pipetado diretamente sobre essa camada fina. A camada fina possui a propriedade de adsorver imediatamente todas as proteí-
10 nas da superfície dos cristais da matriz, de modo que, após cerca de um minuto, o líquido remanescente poderá ser removido, por exemplo, por pipetagem ou simplesmente com um papel absorvente. Isso também remove as impurezas, como sais ou tensoativos residuais. A posterior adição opcional de uma gota de acetonitrila poderá inserir as proteínas nos pequenos cristais
15 da camada fina, aumentando assim a sensibilidade.

Em vez da sedimentação dos micróbios por centrifugação, eles também poderão ser depositados e lavados por microfiltração. Uma vez que a adição de tensoativos faz com que as membranas celulares das partículas
20 sanguíneas e sua estrutura interna praticamente dissolvam por completo, um isolamento puro dos micróbios também pode ser obtido por microfiltração.

Esses processos para separar os micróbios do sangue e para preparar as amostras para medição levam apenas cerca de 10 a 15 minutos no total. A placa de suporte para amostra com as preparações de amostra é então introduzida da forma usual através de um bloqueio de vácuo na fonte
25 de íons de um espectrômetro de massa disponível comercialmente. O espectrômetro de massa está operacional após cerca de cinco minutos. Em um espectrômetro de massa cujo laser UV pulsante opera a 200 hertz, leva apenas alguns segundos para a obtenção de um número suficiente de espectros individuais a partir de uma amostra para medição, a fim de obter um es-
30 pectro somado muito útil. A aquisição dos espectros de massa pode, portanto, ser concluída após um minuto. (Hoje em dia, espectrômetros de massa de MALDI-TOF estão comercialmente disponíveis com lasers de 2 quilo-

hertz).

Também estão comercialmente disponíveis programas de computador para a posterior identificação dos micróbios por meio de seus espectros de massa, por exemplo, o "Biotyper" (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). O tempo necessário para a identificação dos micróbios a partir de bons espectros de massa depende do desempenho do computador, do tamanho da biblioteca com espectros de referência e do algoritmo para a análise de similaridade. Com computadores contidos em espectrômetros de massa disponíveis comercialmente, a identificação dos espectros de massa das amostras, incluindo amostras de confirmação, demora apenas de segundos até alguns minutos, no máximo; a identificação dos micróbios fica, portanto, disponível em forma digital ou impressa meia hora após o fim de um cultivo com êxito dos micróbios em sangue.

Todos esses métodos simples para a obtenção de depósitos puros de micróbios e posterior identificação por espectrometria de massa funcionam com completo êxito com sangue de pacientes normais, sendo fornecidos pela primeira vez a um hospital. A taxa de sucesso de identificação dessa mais simples modalidade da invenção corresponde a mais de 95 por cento.

Existem, no entanto, hospitais muito especializados de último recurso, onde pacientes com doenças crônicas e muito pouco conhecidas finalmente passam por investigações aprofundadas e tratamento especial. Nesses tipos de hospital com pacientes com doenças raras e difíceis, até 40 por cento das amostras de sangue, após tratadas com uma solução de SDS, formam grandes coágulos mucosos flutuantes e invisíveis no líquido vermelho escuro. Esses plugs mucosos carregam uma porcentagem desconhecida dos micróbios. Uma pessoa qualificada pode pipetar um pouco de fluido dos arredores dos plugs para tratamento posterior, mas esse método é difícil e reduz o limite de detecção por fatores desconhecidos. Uma pesquisa sugere que esses coágulos mucosos consistem principalmente de DNA de quantidades muito altas de leucócitos, possivelmente misturados com proteínas coaguladas do sangue. Os pacientes geralmente apresentam níveis muito

altos de leucócitos no sangue.

Existem várias soluções para esse problema. Como uma primeira e muito simples solução, o sangue pode ser diluído por um fator entre dois e dez, preferencialmente cerca de cinco, em água destilada, antes que a
5 solução de SDS seja adicionada. A diluição por um fator de cinco aumenta a taxa de sucesso para mais de 90 por cento, mas também diminui a sensibilidade do método por um fator de cinco se os mesmos tubos de centrifugação de 1 mL forem utilizados. Em casos críticos, o prolongamento correspondente do tempo de cultivo, necessário para produzir mais micróbios, poderá ficar
10 intolerável.

Como uma segunda solução para o problema de coagulação, pode ser usado um método de centrifugação da amostra de sangue antes da adição da solução de SDS. A taxa de sucesso é melhorada provavelmente pela remoção de todas as proteínas de coagulação do sangue antes da adi-
15 ção da solução de SDS. Nessa grandemente preferida modalidade da invenção, que pode ser introduzida como um procedimento padrão em hospitais especiais, o sangue inicialmente contido nos tubos de centrífuga é centrifugado primeiramente sem a adição da solução de tensoativo. O plasma sanguíneo puro sobrenadante com suas centenas de proteínas, com nutrientes
20 e anticoagulantes adicionados, é então removido e apenas o depósito vermelho escuro é recolhido com uma solução de tensoativo, uma solução de 1 por cento de SDS, por exemplo, preenchendo o tubo até um mililitro no total. O depósito vermelho escuro, que contém não apenas os micróbios, mas normalmente também os 5 milhões de eritrócitos, 7 mil leucócitos e 200 mil
25 trombócitos provenientes de um mililitro de sangue, é misturado, em um agitador, com a solução de tensoativo adicionada, destruindo assim as membranas celulares dos corpúsculos sanguíneos e liberando as proteínas solúveis. A solução vermelho-escura é então novamente centrifugada, permanecendo, dessa vez, vermelho-escuro o sobrenadante e o depósito, se visível,
30 aparecendo puramente branco. O processo de remoção do sobrenadante, preencher com solução de tensoativo e centrifugar, pode então ser repetido para remover até os últimos resíduos de partículas sanguíneas. O processo

pode ser repetido com água destilada pura para remover o tensoativo, pois ele interferiria na ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Depois da última remoção do sobrenadante, o depósito, visível ou não, é desintegrado conforme descrito acima e as proteínas solúveis são transferidas para a placa de suporte para amostra.

Como uma terceira solução para o problema de coagulação do sangue, a solução de SDS pode ser preparada com anticoagulantes especiais para inibir a formação dos plugs mucosos. A solução para esse problema pode ser combinada com a solução para o segundo problema.

Como uma quarta solução, os plugs mucosos podem ser dissolvidos pela adição de uma ou mais nucleases.

Se o depósito estiver visível após a etapa final de lavagem, uma diferente modalidade da invenção poderá ser aplicada, a qual consiste na transferência, com o uso de uma haste flexível, de uma pequena quantidade dos micróbios então isolados para a placa de suporte para amostra, onde eles poderão ser preparados conforme usual. Os espectros de massa dessa técnica de esfregaço convencional são, em grande parte, semelhantes aos espectros de massa da técnica de desintegração, com uso de ácido no tubo de centrífuga. Se as diferenças forem evidentes, os espectros de massa de ambos os tipos de preparação de amostra poderão ser introduzidos como espectros de referência na biblioteca.

A invenção fornece um método para a identificação confiável de patógenos microbianos do sangue, sendo significativamente mais simples e mais rápido do que métodos microbiológicos anteriores, que são quase sempre realizados através do cultivo dos micróbios em géis em placas de Petri. A invenção proporciona micróbios purificados diretamente do sangue após um procedimento de cultivo, onde eles estão presentes em pureza específica suficiente, o que não é o caso de micróbios que ocorrem no interior ou sobre outros locais do corpo humano. Em contraste com métodos analíticos em PCR, a identificação pode ser realizada sem qualquer conhecimento prévio e leva diretamente a uma identificação em nível de espécie ou subespécie do micróbio. Nenhum outro método de identificação é tão rápido e con-

fiável.

A invenção é baseada, em especial, na destruição rápida e completa dos diferentes tipos de corpúsculos sanguíneos, de forma que os micróbios são obtidos numa forma muito pura e as proteínas endógenas

5 sanguíneas provenientes das partículas sanguíneas não interferem na identificação. A estrutura das células dos micróbios não é destruída no processo, em contraste com as partículas sanguíneas. A delicada membrana celular das partículas sanguíneas é composta predominantemente de fosfolipídios, que formam uma membrana por meio de ligações não covalentes. O efeito

10 dos tensoativos, particularmente do SDS, em proteínas e lipídios é baseado principalmente na quebra de todas as ligações não covalentes e, portanto, destrói a estrutura quaternária e terciária da membrana celular e das moléculas estruturais da célula. Assim, as membranas celulares e todas as estruturas celulares internas dissolvem-se completamente, atuando os tensoati-

15 vos como solubilizantes. Os fosfolipídios das membranas celulares são anfipáticos, ou seja, possuem características tensoativas e podem receber dissolução nanocoloidal por outros tensoativos, formando micelas. As estruturas internas das partículas sanguíneas, incluindo a membrana do núcleo celular e os cromossomos dos leucócitos, também são destruídas pelo SDS e

20 amplamente dissolvidas. Todos esses componentes dissolvidos são removidos com o sobrenadante após a centrifugação ou por microfiltração.

Por outro lado, as paredes celulares de bactérias são muito estáveis; elas consistem principalmente de mureínas (peptidoglicanos) com ligações covalentes cruzadas e, portanto, polimerizadas. Para bactérias

25 gram-positivas, há ligações cruzadas adicionais com ácidos teicoicos, que também são polimerizados. Essas malhas ligadas covalentemente suportam o efeito dissolvente dos tensoativos pelo menos pelo curto período de vários minutos. Para a subsequente identificação em espectrometria de massa, é irrelevante se os micróbios morrem ou não nesse método, desde que as pro-

30 teínas do interior não sejam liberadas ou alteradas em sua estrutura primária. No entanto, para muitos micróbios, esse método de curto prazo, de acordo com a invenção, ainda deixa micróbios suficientes vivos e capazes de

se reproduzir para um cultivo posterior.

O método é surpreendentemente simples. A identificação dos micróbios isolados assim obtidos segue os métodos convencionais, que, no entanto, normalmente são baseados no isolamento de um tipo de micróbio, cultivando-se uma colônia separada em um meio de cultivo. Neste ponto, o isolamento existe automaticamente porque, para infecções agudas, apenas uma ou no máximo duas espécies de micróbios são identificadas como patógenos. Isso significa que a separação desses micróbios a partir de sangue infectado fornece quantidades de micróbios que representam culturas de micróbios suficientemente puras (isoladas). Mesmo quando duas espécies de micróbios estão presentes, o método ainda funciona de forma satisfatória.

Para simplificar o método de identificação de micróbios do sangue, kits de análise com misturas de tensoativos e antiespumantes prontas para o uso podem ser produzidas e disponibilizadas comercialmente. As misturas podem conter adicionalmente anticoagulantes e nucleases; porções estéreis dessas misturas podem ser inseridas em vasos de centrifugação a vácuo, fáceis de serem preenchidos com amostras de sangue. O kit de análise pode ainda compreender soluções purificadas para a extração de proteínas a partir de micróbios depositados e soluções matrizes para a preparação de amostra sobre placas de suporte para amostra de espectrometria de massa. Mesmo placas unidirecionais de suporte para amostra de espectrometria de massa podem estar compreendidas nesse kit de análise.

Se o método de separação e isolamento dos micróbios for realizado com mais tubos de centrifuga do que o necessário para a identificação, com uma dúzia de tubos de centrifuga, por exemplo, alguns dos depósitos de micróbios isolados também poderão ser utilizados para outros fins de diagnóstico – para determinar a resistência dos micróbios, por exemplo, utilizando os métodos funcionais convencionais de cultivo experimental na presença de antibióticos.

O método de separação de acúmulos de micróbios a partir de células endógenas pode não apenas ser aplicado a sangue, mas também a abscessos ou outros focos de inflamação, uma vez que eles também contêm

células endógenas. Um exemplo disso é um foco supurativo, ou seja, um acúmulo de alguns micróbios vivos e alguns parcialmente digeridos em uma mistura com certos tipos de leucócitos que os combatem. Nesse caso também, as células endógenas podem ser dissolvidas por soluções tensoativas.

- 5 Um outro exemplo é o muco nasal de inflamação, o qual é obtido com um esfregaço da mucosa nasal e onde a identificação dos micróbios é de grande interesse. Esses tipos de amostra podem também ser obtidos a partir de outras membranas mucosas.

No método descrito acima, os espectros de massa dos micróbios
10 foram obtidos em espectrômetros de massa com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Essa é a maneira usual, mas não necessariamente a única. As soluções de proteínas solúveis provenientes de micróbios também podem ser ionizadas por eletrospray, por exemplo. Esse tipo de ionização gera fortes sobreposições de íons multiplamente carrega-
15 dos no intervalo de massa de cerca de 600 a 1600 daltons, o que necessariamente requer um espectrômetro de massa com alta resolução. Espectrômetros de massa de tempo de voo com injeção ortogonal dos íons (OTOF-MS) podem ser utilizados como espectrômetros de massa, assim como espectrômetros de massa por ressonância ciclônica de íons (ICR-MS) ou
20 outros espectrômetros de massa de alta resolução.

Os diferentes níveis de carga dos íons formados por ionização por eletrospray podem ser combinados matematicamente para a obtenção de um espectro de micróbio. No entanto, também é possível realizar uma redução física de carga. Isso envolve a reunião de íons de proteínas carregados positivamente e íons adequados carregados negativamente em um
25 reator para ionização localizado entre a fonte de íons do eletrospray e o analisador, resultando em uma desprotonação dos íons de proteínas. Esses são introduzidos no espectrômetro de massa, o qual deverá, porém, ser capaz de lidar com um grande intervalo de massas.

30 Outros métodos de ionização são também conhecidos e podem ser usados aqui. Um método vantajoso é a ionização química à pressão atmosférica (APCI), por exemplo. As moléculas são introduzidas para a ioniza-

ção química através de atomização de um líquido e vaporização das gotas ou por dessorção a laser fraca e não ionizante ("ablação a laser"). A ionização química fornece praticamente apenas íons carregados com uma unidade e é, portanto, muito favorável, mas também exige um espectrômetro de massa com intervalo de massa suficientemente extenso.

5 Pelo conhecimento da invenção, os métodos aqui descritos podem ser modificados por técnicos no assunto em uma grande variedade de maneiras. Algumas dessas modificações já foram descritas acima; existem também outros métodos que podem gerar os desejados espectros de massa

10 informativos dos micróbios para sua identificação na base fundamental da separação direta dos micróbios a partir do sangue, abscessos ou outro tecido inflamado.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a identificação por espectrometria de massa de micróbios que compreendem bactérias e leveduras no sangue, em que os micróbios são depositados por centrifugação ou por filtração, após o qual um espectro de massa é obtido a partir dos micróbios e tais micróbios são identificados pelo espectro de massa, caracterizado pela dissolução de partículas sanguíneas de uma amostra de sangue proveniente de uma cultura de sangue, adicionando-se um tensoativo antes da deposição dos micróbios.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que quantidades suficientes de micróbios do sangue são produzidas por cultivo.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que os micróbios depositados por centrifugação são lavados e novamente centrifugados.
4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o dodecil sulfato de sódio (SDS) é usado como tensoativo.
5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é adicionado como solução.
6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a solução tensoativa contém um antiespumante.
7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que um anticoagulante é adicionado à amostra de sangue.
8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que uma ou mais nucleases são adicionadas à amostra de sangue.
9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o sangue para a amostra de sangue é diluído com água destilada por um fator de diluição entre 1:2 e 1:10.
10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o sangue para a amostra de sangue é diluído com água destila-

da por um fator de diluição de 1:5.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a amostra de sangue é centrifugada e o sobrenadante é removido antes que a solução tensoativa seja adicionada.

5 12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que os micróbios depositados são desintegrados por sonicação ou tratamento mecânico.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que os micróbios depositados são desintegrados por solução contendo ácido fórmico ou ácido trifluoroetanoico e acetoni-
10 trila.

14. Método de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que a preparação de amostras de medição em uma placa de suporte para amostra de espectrometria de massa é realizada utilizando-se uma substância matriz para dessorção/ionização a laser assistida por ma-
15 triz, em cujos cristais as proteínas solúveis dos micróbios desintegrados são incorporadas.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a preparação de amostras de medição
20 consiste na transferência de alguns micróbios do depósito para um suporte para amostra de espectrometria de massa, onde uma solução com uma substância matriz para dessorção/ionização a laser assistida por matriz é adicionada.

16. Método de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que a medição por espectrometria de massa é realizada
25 em um espectrômetro de massa de tempo de voo com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI).

17. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a solução é constituída de 5 a 20% de dodecil sulfato de
30 sódio (SDS) aquoso.

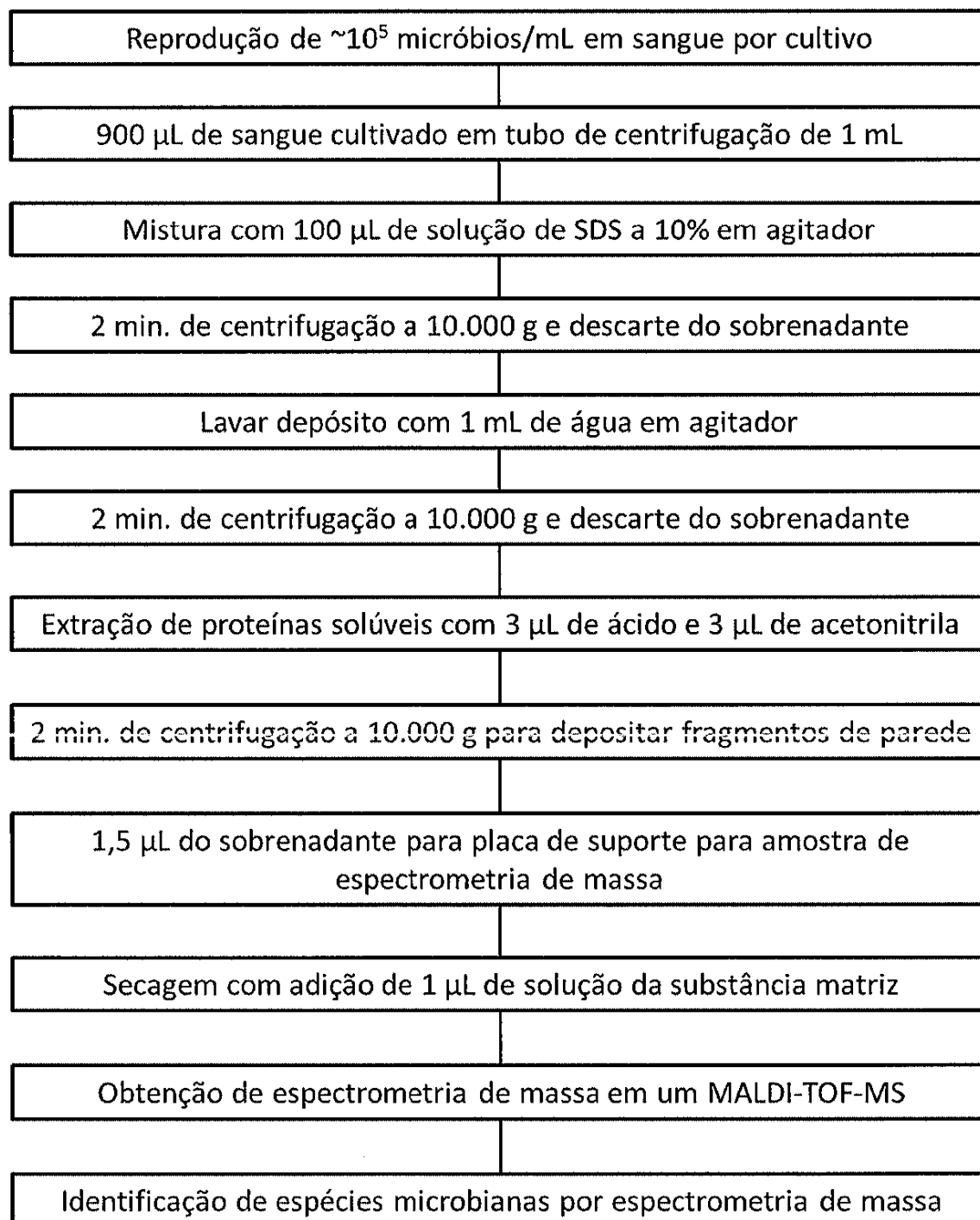


FIG. 1

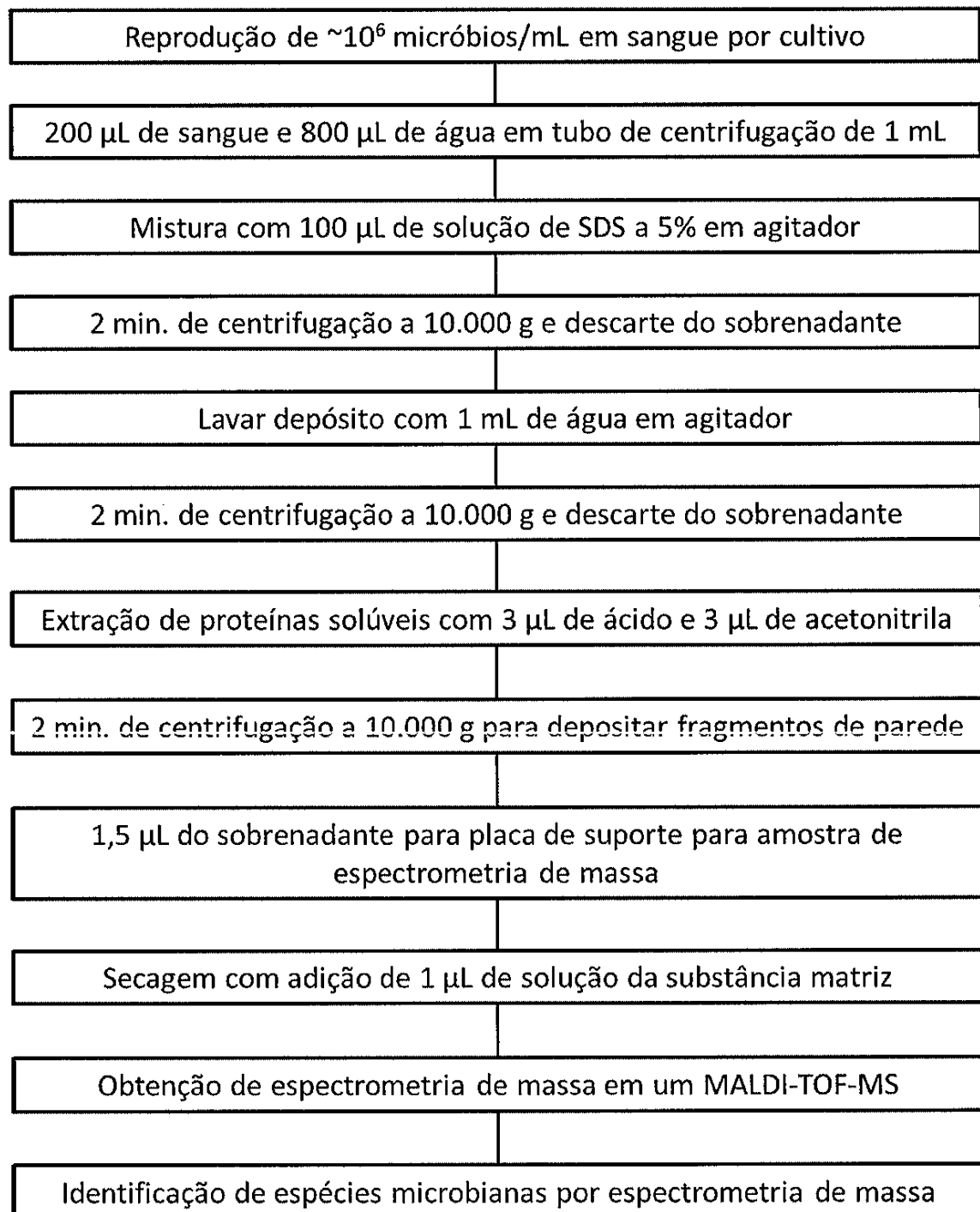


FIG. 2

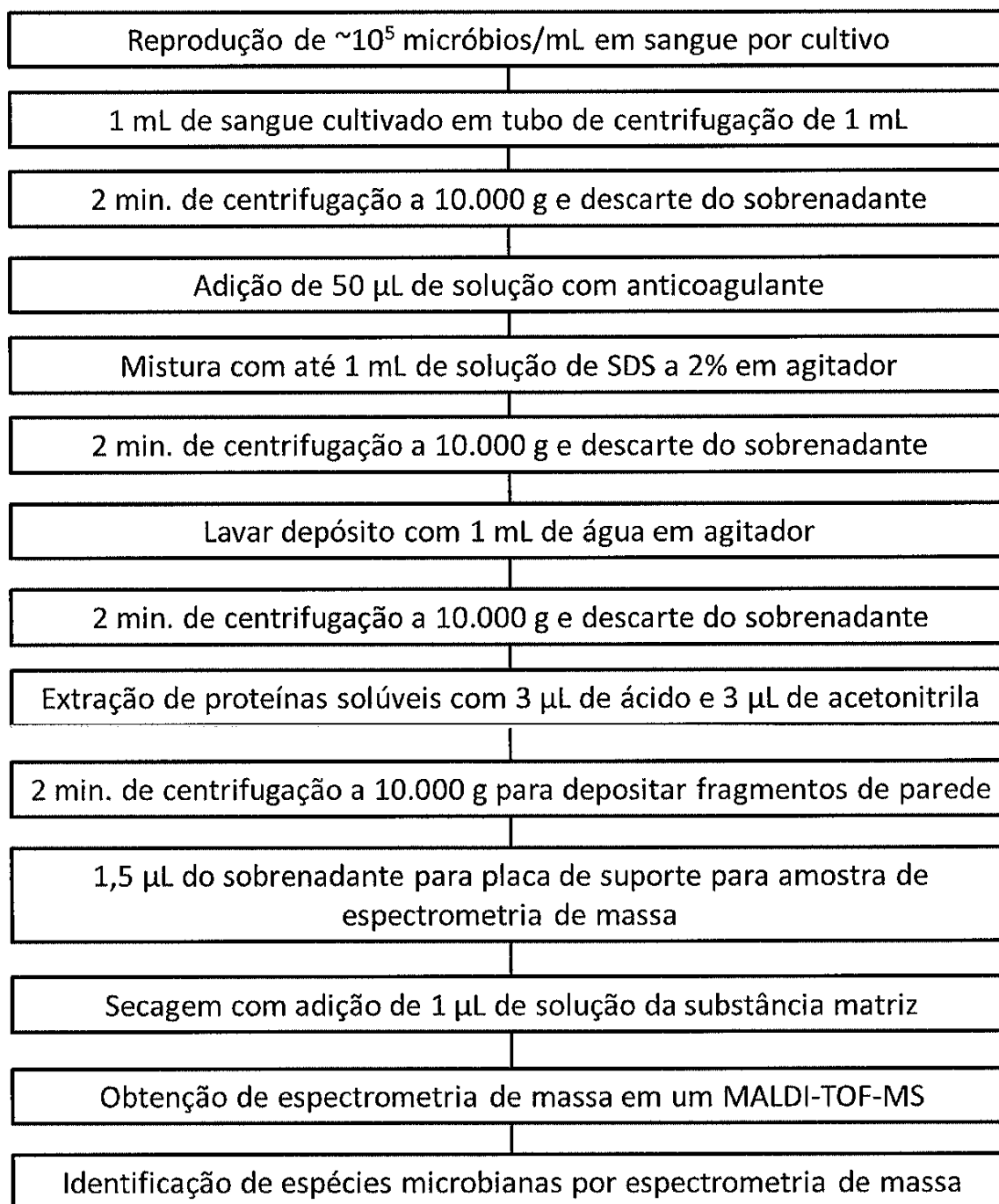


FIG. 3