

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

USO DA ESPECTOMETRIA DE MASSA MALDI-TOF PARA IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE PATÓGENOS EM LEITE CONTAMINADO POR MASTITE SUBCLÍNICA

Flávio Emanuel Gomes SILVA*¹, Lívia Mara Vitorino da SILVA¹, Samuel Ferreira GONÇALVES¹, Geziella Aurea Aparecida Damasceno SOUZA¹, Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira XAVIER², Mauro Aparecido de Sousa XAVIER², Keicy Sandy Silvestre de SOUZA¹, Anna Christina de ALMEIDA¹.

*autor para correspondência: flavioemanuel2515@hotmail.com

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

²Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

Abstract: MALDI-TOF MS is a fast and effective technique that identifies genus and species of bacteria and fungi. One hundred and eleven samples of milk with subclinical mastitis were collected from properties in the North of Minas Gerais. Isolates were identified at the genus and species level by MALDI-TOF MS mass spectrometry. We determined the frequency analysis of the genera and species found in the isolates and the graphs were constructed by Excel. The proteomic technique identified 92% (102/111) of reliability at levels of genera and species previously analyzed by microbiological and biochemical tests. The most affected genera in the isolates were *Staphylococcus* sp, *Enterococcus* sp and *Enterobacter* sp and the high frequency species that MALDI-TOF MS detected were *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes* and *Enterococcus faecium*. The use of more accurate techniques helps to accurately diagnose the bacteria that spread in dairy herds and provides more effective treatments for the prevention of infectious diseases.

Palavras-chave: análise proteômica, bactérias, doenças infecciosas, produtos de origem animal

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Introdução

A infecção da glândula mamária em rebanhos leiteiros é provocada por vários agentes patogênicos (VAZQUEZ *et al.*, 2013).

Recentemente, foi lançada uma tecnologia para identificação de microrganismos, a técnica do MALDI- TOF, que através da ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)- tempo de voo (TOF) identifica de forma rápida e eficaz espécies que causam infecções (SINGHAL *et al.*, 2015).

Objetivou-se avaliar a eficácia da espectrometria de massa através do MALDI-TOF MS, como alternativa para identificação de patógenos presentes em leite contaminado por mastite subclínica.

Material e Métodos

Foram coletadas quinhentas amostras de leite contaminados por mastite subclínica em rebanhos leiteiros do Norte de Minas Gerais. Cento e onze isolados foram previamente identificados através das análises microbiológicas como a coloração de Gram e testes bioquímicos, incubados em estufa a 35-37°C por 24 horas, em aerobiose.

As bactérias foram passadas para ágar TSA em placas de petri descartáveis e enviados ao laboratório AQUACEN/RENAQUA da Escola de Veterinária da UFMG para identificação quanto ao gênero e espécie pela técnica do MALDI -TOF MS.

Uma única colônia fresca de cada cepa bacteriana foi transferida para uma placa de aço de noventa e seis poços. Para cada estirpe, 1µl de ácido fórmico (70%) e 1µl de matriz MALDI -TOF MS, constituída por uma solução saturada de α -ciano- 4- hidroxicinâmico foram aplicados no local e secados a temperatura ambiente (ASSIS *et al.*, 2017).

Antes das identificações, a calibração do equipamento foi precedida por um padrão de teste bacteriano *Escherichia coli* DHS alpha; Bruker Daltonics.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Os critérios de escore de identificação em tempo real utilizados foram aqueles recomendados pelo fabricante: escore $\geq 2,000$ indica identificação a nível de espécie, $\geq 1,700$ e $< 2,000$ indica identificação de gênero e escore $< 1,700$ indica identificação não confiável.

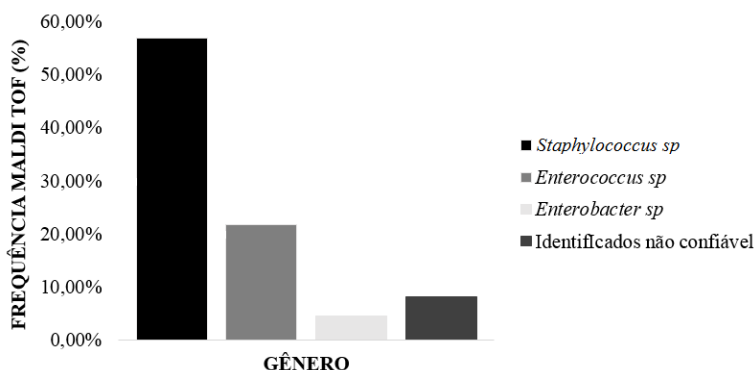
Os resultados foram interpretados por meio da análise de frequência e os gráficos foram construídos pelo Excel. Esse estudo foi aprovado pelo CEUA/UFMG sob Protocolo nº 145/2013.

Resultados e Discussão

Cento e onze amostras de leite contaminados por mastite subclínica coletados em propriedades do Norte de Minas Gerais, foram isolados em meio ágar TSA e levados para identificação a nível de gênero e espécie pela técnica MALDI – TOF MS.

Através das análises proteômicas, foram identificados três tipos diferentes a nível de gênero nos isolados com correta identificação de 92% (n= 102/111). O gênero mais encontrado foi o *Staphylococcus* sp (56,76%), seguido de *Enterococcus* sp (21,62%) e *Enterobacter* sp (4,50%). Os isolados que o MALDI-TOF MS, classificou como identificação não confiável, apresentaram uma frequência de 8,10% para espécie e gênero respectivamente (GRÁFICO 1).

Gráfico 1- Frequência dos isolados de leite identificado a nível de gênero pelo MALDI-TOF MS



Promoção e Realização:

Apoio Institucional:

Organização:

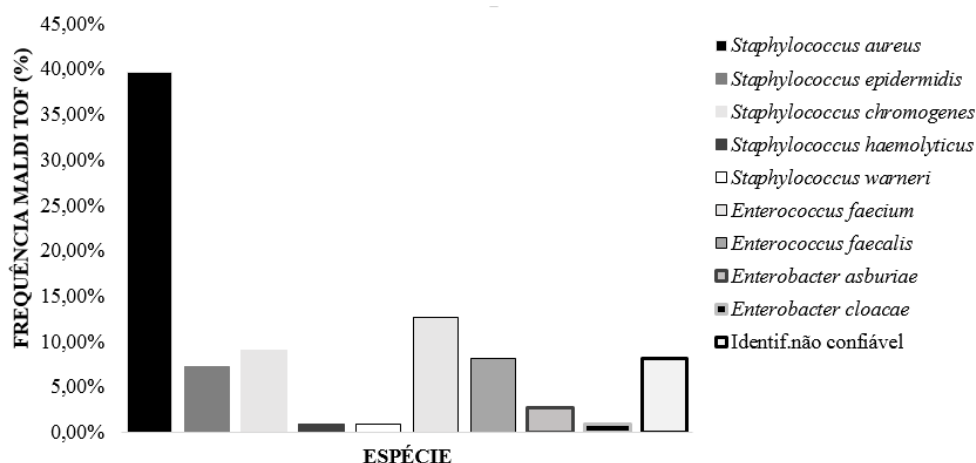
CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Através da utilização do sistema MALDI-TOF MS por Van Veen *et al.* (2010), observaram 95,1% a nível de gênero e 85,6% a nível de espécie nos isolados clínicos de bactérias e leveduras.

A nível de espécie encontrados pela técnica proteômica nos isolados de leite contaminado por mastite subclínica, a maior frequência observada foi para o *Staphylococcus aureus* (39,63%), *Staphylococcus epidermidis* (7,2%), *Staphylococcus chromogenes* (9,00%), *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus warneri* (0,9%) respectivamente.

Outras espécies de bactérias observadas pelo MALDI-TOF MS, foram *Enterococcus faecium* (12,6%), *Enterococcus faecalis* (8,10%), *Enterobacter asburiae* (2,70%) e *Enterobacter cloacae* (0,9%) (GRÁFICO 2).

Gráfico 2- Frequência dos isolados de leite identificado a nível de espécie pelo MALDI-TOF MS



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Conclusão

A utilização da técnica MALDI-TOF MS, possibilita a identificação a nível de gênero e espécie com rapidez e eficiência, o que garante maior confiabilidade nos resultados microbiológicos e tratamentos mais efetivos para combater bactérias patogênicas que acometem os rebanhos leiteiros.

Agradecimentos

A UFMG, FAPEMIG, CNPq, PROBIC/PIBIC e Capes.

Referências

ASSIS, G.B.N.; PEREIRA, F.L.; ZEGARRA, A.U.; TAVARES, G.C.; LEAL, C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of Gram-positive fish pathogens. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, n. 1492, p. 1-12, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28848512>>. Acesso em 04 maio. 2018.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, n. 791, p. 1-16. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>>. Acesso em 04 maio. 2018.

VAN VEEN, S.Q.; CLAAS, E.C.J.; KUIJPER, E. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.3, p. 900-907. 2010.

VAZQUEZ, H.C.; JAGER, S.; WALTER, W.; ZSCHOCK, M.; VAZQUEZ, M.A.C.; EL-SAYED, A. Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 377-382. 2013.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:

