JULIANA REGINA BARREIRO

**Identificação de patógenos causadores de mastite
subclínica por espectrometria de massas**

Pirassununga

2010

JULIANA REGINA BARREIRO

**Identificação de patógenos causadores de mastite
subclínica por espectrometria de massas**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2391
FMVZ

Barreiro, Juliana Regina

Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas / Juliana Regina Barreiro. -- 2011.
75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Mastite subclínica. 2. Espectrometria de Massas. 3. Bactéria.
4. MALDI-TOF MS. 5. Bovino. 6. Leite. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Fingerprinting por espectrometria de massas para diagnóstico de patógenos em mastite", protocolado sob o nº1821/2009, utilizando 100 (cem) amostras de leite de vacas das raças Gir e Holandesa, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/01/2010.

We certify that the Research "Fingerprinting for masses spectrometry for mastitis pathogens diagnosis", protocol number 1821/2009, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 01/20/2010.

São Paulo, 21 de janeiro de 2010

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARREIRO, Juliana Regina

Título: Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas.

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento _____

Aos meus pais **José Raimundo Barreiro** e **Regina Maria Leal Barreiro** por toda a dedicação, ensinamentos, paciência, apoio e compreensão. Sempre me incentivando nas minhas escolhas.

Ao meu irmão **José Raimundo Barreiro Júnior** que com seu apoio e incentivo sempre esteve presente em todos os momentos de minha vida.

Dedico este trabalho com muito amor
e gratidão

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar-me nesta e em todas as trajetórias de minha vida;

Agradeço as oportunidades proporcionadas pela Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pelo apoio incessante ao trabalho, aprimoramento pelo conhecimento profissional, acadêmico e científico;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão do auxílio à pesquisa;

Ao orientador Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, pela orientação, pelo profissionalismo, pelos ensinamentos, pela confiança e pela paciência;

À Christina Ramires Ferreira pela compreensão, humildade, amizade, atenção, dedicação e ensinamentos ao longo desta etapa;

Aos grandes amigos que se tornaram irmãos e irmãos que tiveram presentes em todos os momentos sendo eles bons ou ruins: Ju Diniz, Barbara Marques, Dani Beuron (Guria), Dani Geronimo, Nara Consolo (Magrela), Carol Malek, Elmeson (Mineirinho), Henrique (Branquelo), Amanda (Potranca), Ana Paula (Bodinha), Natália (Caiçara);

Aos meus queridos Ju Naves e Ailton pelo carinho, atenção, conselhos e alegria, fazendo com que esta etapa se tornasse mais branda;

À família Raspantini: Ester, Paulo Cesar, Paulinho, Débora e em especial Filipe que sempre presentes com carinho, alegria e companheirismo tornaram esta fase mais branda;

À todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP): Dr. Ricardo Albuquerque, Dr. Paulo Henrique Mazza, Dr. Alexandre Gobesso, Dr. Anibal de Sant'Anna Moretti, Dra. Angélica Simone Cravo Pereira, Dr. Romualdo Shigueo Fukushima, Dr. Augusto Hauber Gameiro, Dr. Luís Felipe Prada e Silva, Dr. Francisco Palma Rennó, Dra. Maria de Fátima pelos ensinamentos ao longo dessa etapa e profissionalismo;

Aos colegas e amigos de mestrado pelos momentos inesquecíveis e ensinamentos eternos: Milton Maturana, Paulinha Duarte, Dani Donatto, Ju Pinheiro, Claudinha, Carol Tobias, Henry, Anaí Naves, Rafa (bizão), Tarley, Rinaldo, Marília, Marina, Tenente Ribeiro, Fernando (Boi), Cris Cortinhas, Lenita, José Esler (Zé), Jefferson e Erika Gandra, Bruno Botaro, Marco Aurélio, Juliano, Cássia, Fernanda, Maria Fernanda, Francine, Esther, Mayara, Larissa, Flávio “Perna”, Ana Paula, Bia (Beatriz), Iaçanã, João (Pé), Maurício (Xibungo), Eduardo (Frodo), Paula Pieruzzi, Lara, Tiago Tomazi;

Aos funcionários da Secretaria do VNP, Sr. José Francisco M. Ferreira e Sra. Alessandra de Cássia T. da Silva, Sr. João Paulo de Oliveira Barros pelo apoio e atenção dispensadas;

Sr. José Franchini Garcia Moreno e Sra. Lucinéia Mestieri, funcionários do Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal FMVZ-USP, pelo auxílio na realização das análises laboratoriais, amizade e carinho;

Aos funcionários competentes do Setor de Bovinocultura de Leite da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga – PCAPS, Srs. Carlos Alberto Schimmitt, João Paulo Pagotti, Valmir Donizetti Botteon e José Antônio Coelho pelo apoio, atenção, alegria e amizade dispensadas;

Ao Sr. Gilmar Edson Botteon (Sr. Gigi), funcionário dedicado, atencioso e amigo;

Às queridas moças da faxina, pelo bom humor diário, amizade e carinho.

“Minhas ideias levaram as pessoas a reexaminar a física de Newton. Naturalmente alguém um dia irá reexaminar minhas próprias ideias. Se isto não acontecer haverá uma falha grosseira em algum lugar.”
(Albert Einstein)

RESUMO

BARREIRO, J. R. **Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas.** [Identification of subclinical mastitis pathogens causing by mass spectrometry.]. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

O diagnóstico rápido e eficiente da mastite subclínica é importante para reduzir a persistência da doença e os prejuízos decorrentes. O objetivo do estudo foi avaliar a técnica de espectrometria de massas (MS) por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo-de-vôo (MALDI-TOF) para identificação de bactérias causadoras de mastite subclínica bovina por dois métodos: 1) a partir de bactérias isoladas por cultivo microbiológico; 2) a partir da recuperação de bactérias diretamente do leite, visando eliminar completamente a necessidade de cultivo microbiológico para identificação dos patógenos. O estudo foi composto por dois experimentos (1 e 2), no experimento 1 foram utilizadas 33 amostras de leite provenientes de animais das raças Gir e Holandesa de quatro fazendas leiteiras para a identificação microbiológica e MALDI-TOF MS. As amostras com resultados conflitantes foram confirmadas por sequenciamento do gene 16S rRNA. Os resultados de cultura microbiológica foram *Staphylococcus aureus* (n = 13), *Streptococcus agalactiae* (n = 10) e Estafilococos coagulase negativo (ECN) (n = 10). Para todas as amostras de *Streptococcus agalactiae*, resultados similares foram observados para a identificação microbiológica e por MALDI-TOF MS. De 13 isolados de *Staphylococcus aureus*, 11 foram igualmente identificados por MALDI-TOF, 1 isolado foi identificado como *Staphylococcus haemolyticus* por sequenciamento do gene 16S rRNA, e o outro isolado com resultado conflitante foi caracterizado como cultura mista de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Em relação às amostras de ECN, todas as amostras do grupo foram identificadas por MALDI-TOF em nível de gênero (*S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. Haemolyticus*, *S. Chromogens* e *S. aureus* coagulase negativa). No experimento 2 foi avaliado o método de recuperação de bactérias presentes em leite e sua identificação por MALDI-TOF MS utilizando o método de contaminação experimental de leite com *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. A identificação de patógenos recuperados diretamente do leite foi possível

quando a concentração de *E. faecalis* e *S. aureus* foi de 10^6 ufc/mL, e de 10^7 ufc/mL para *E.coli*. Concluimos que o uso de MALDI-TOF MS pode acelerar a identificação de patógenos causadores de mastite subclínica bovina podendo contribuir para a adoção de medidas de controle e tratamento mais adequado.

Palavras-chave: Mastite subclínica. Espectrometria de Massas. Bactéria. MALDI-TOF MS. Bovino. Leite.

ABSTRACT

BARREIRO, J. R. Identification of subclinical mastitis pathogens causing by mass spectrometry. [Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas]. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Rapid and efficient diagnosis of subclinical mastitis is important to reduce the persistence of the disease and its losses. This study aimed to evaluate the technique of mass spectrometry (MS) and desorption ionization by matrix assisted laser time-of-flight (MALDI-TOF) for identification of bacteria causing bovine subclinical mastitis by two methods: 1) from bacteria isolated by microbiological culture, 2) from bacteria recovered directly from milk, to eliminate completely the need for microbiological culture for identification of pathogens. The study consisted of two experiments (1 and 2). In experiment 1, 33 milk samples from Gir and Holstein animals collected in four dairy farms were used for microbiological identification and MALDI-TOF MS. The samples with different results were confirmed by sequencing the 16S rRNA. These samples were identified by microbiological culture as *Staphylococcus aureus* (n = 13), *Streptococcus agalactiae* (n = 10) and *Staphylococcus* coagulase negative (SCN) (n = 10). For all strains of *Streptococcus agalactiae*, similar results were observed for microbiological identification and MALDI-TOF MS. From 13 isolates of *Staphylococcus aureus*, 11 were also identified by MALDI-TOF, one isolate was identified as *Staphylococcus haemolyticus* by 16S rRNA sequencing, and the other discrepant sample was characterized as a mixed culture of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Regarding the SCN samples, all samples of this group were identified by MALDI-TOF at genus level (*S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. Chromogens* and *S. aureus* coagulase negative). In experiment 2, we evaluated the method of recovery of bacteria present in milk and their identification by MALDI-TOF MS using experimental method of contamination of milk with *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. The identification of pathogens recovered directly from milk was possible when the concentration of *E. faecalis* and *S. aureus* was 10^6 ufc/mL and 10^7 ufc/mL for *E. coli*.

We conclude that the use of MALDI-TOF MS can accelerate the identification of pathogens causing bovine subclinical mastitis may contribute to the adoption of control measures and appropriate treatment.

Keywords: Mastitis. Mass Spectrometry. Bacterium. MALDI-TOF MS. Milk. Bovine

LISTA DE TABELA E QUADRO

Tabela 1 - Frequência de microrganismos isolados de amostras de leite de quartos mamários de quatro fazendas comerciais pelo método microbiológico.....	47
Quadro 1 - Identificação de agentes causadores de mastite subclínica por cultura microbiológica e por MALDI-TOF MS.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das etapas da análise por MS. Moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa na fonte de íons, os quais são atraídos e filtrados pelos analisadores de massas. Os íons atingem o detector, onde têm seu sinal amplificado e processado para formar o espectro de massas.....	29
Figura 2– Representação esquemática da ionização por fonte de MALDI.....	32
Figura 3 - Representação do fluxo de preparo de amostra para identificação de bactérias por MALDI.....	39
Figura 4- Esquema comparativo dos procedimentos para identificação microbiológica e por MALDI-TOF MS.....	40
Figura 5- Espectros MALDI-TOF MS de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , na faixa de 3.000 a 12.000 m/z.	48
Figura 6- Análise pelo algoritmo do programa computacional Biotyper, indicando a identificação de cultura mista (<i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>).	49
Figura 7- Espectros MALDI-TOF MS de isolados de Estafilococos coagulase negativa.....	50
Figura 8- MALDI-TOF MS: espectros na faixa de 4.000 a 22.000 m / z, obtidos após a contaminação experimental de leite integral (a) 10^3 , (b) 10^4 , (c) 10^5 , (d) 10^6 , (e) 10^7 (f) 10^8 , e (g) 10^9 por <i>E. coli</i> /mL ⁻¹ . Os mesmos experimentos foram realizados com <i>E. Faecalis</i> e <i>S. aureus</i>	53

Figura 9- Espectros de massas obtidos a partir do processamento de amostras contendo concentrações iniciais de 10^2 a 10^5 <i>E. coli</i> mL ⁻¹ , em (a) 10^2 , (b) 10^3 , (c) 10^4 e (d) 10^5	54
Figura 10- Planilha de resultados fornecida pelo programa computacional Biotyper após coleta e processamento dos espectros de massas.	55
Figura 11- MALDI-TOF MS: espectros obtidos a partir da identificação de microorganismos instantânea de leite em etanol 75%. A quantidade de leite de cada amostra foi de 300 µL (a) 10^7 , (b) 10^8 e (c) 10^9 mL de <i>E. coli</i> ¹ , e (d) 10^7 e (e) 10^8 do <i>E. faecalis</i> mL ⁻¹	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion
CCS	Contagem de Células Somáticas
CHCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinamínico
CI	Ionização Química
CMBT	Ácido 5-cloro-2-mecaptobenzothiazole
CMT	Califormia Mastitis Test
DESI	Ionização por Dessorção de Spray de Elétrons
DHB	Ácido Diidróxido Benzóico
DO	Densidade Óptica
EC	Condutividade Elétrica
ECN	Estafilococos coagulase negativa
EI	Ionização Eletrônica
EM	Multiplicadores de Fótons
ESI	Ionização por Spray de Elétrons
FAB	Ionização por Bombardeamento Rápido
FT	Transformada de Fourier
IM	Analizadores de Mobilidade de Íons
IQPA	Ionização Química a Pressão Atmosférica
IT	Armadilha de Íons
KOH	Hidróxido de Potássio
LB	Caldo Lysogeny
MALDI	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
PCR	Reação em Cadeia pela Polimeras
SA	Ácido Sinapínico
TOF	Tempo-de-vôo
TFA	Ácido Trifluoroacético
TSA	Agar Trypticase de Soja
VS	<i>Streptococcus viridans</i>
WMT	Wisconsin Mastitis Test

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
3	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	23
3.1	MASTITE SUBCLÍNICA: CONCEITOS, MÉTODOS DIAGNÓSTICOS E PRINCIPAIS AGENTES	23
3.2	ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)	28
3.3	APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IONIZAÇÃO E DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ (MALDI-TOF MS) NA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	EXPERIMENTO I – IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA E POR MALDI-TOF MS DE BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE CULTIVO DE AMOSTRAS DE LEITE DE ANIMAIS PORTADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA	37
4.1.1	Coleta de amostras de leite para identificação de patógenos causadores de mastite subclínica	37
4.1.2	Cultura microbiológica	37
4.1.3	Preparo de amostras para MALDI-TOF MS	38
4.1.4	Coleta de espectros de massa	39
4.1.5	Sequenciamento do gene 16S rRNA para identificação bacteriana	40

4.1.6	Processamento dos dados.....	41
4.2	EXPERIMENTO 2 – IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE A PARTIR DO LEITE POR MALDI-TOF MS	42
4.2.1	Cepas Bacterianas.....	42
4.2.2	Contaminação bacteriana experimental do leite.....	43
4.2.3	Incubação de leite experimentalmente contaminado.....	44
4.2.4	Leite contaminado total tratado com etanol para a inativação de bactérias e armazenamento da amostra.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE SUBCLÍNICA.....	46
5.2	EXPERIMENTO I - IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE SUBCLÍNICA POR MALDI-TOF MS	47
5.3	EXPERIMENTO II – IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA A PARTIR DE LEITE PELO MALDI-TOF MS	51
5.3.1	Identificação direta de bactérias presentes no leite.....	51
5.3.2	Incubação do leite experimentalmente contaminado.....	53
5.3.3	Identificação direta de bactérias em amostras de leite com etanol.....	55
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ANEXO A68

ANEXO B69

1 INTRODUÇÃO

O leite é uma mistura complexa, nutritiva e estável de gordura, proteínas e outros elementos, os quais se encontram em suspensão ou solubilizados em água e constituem parâmetros que definem a qualidade do leite (GIANOLA et al., 2004). Segundo Dingwell et al. (2004), a qualidade do leite está diretamente relacionada com saúde, alimentação e manejo dos animais, assim como com a qualidade da mão-de-obra, manejo adequado dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha e transporte até a indústria. Todos esses fatores influenciam a composição original e as características sensoriais do leite, certificando ou não a qualidade do produto.

A mastite (do grego *mastos*) bovina é uma doença de grande importância epidemiológica e econômica. A maioria dos casos de mastite ocorre na forma subclínica, ou seja, sem sinais. No entanto, a mastite causa sérios prejuízos econômicos e os animais infectados servem de fonte de infecção para o restante dos rebanhos. A mastite ocorre em resposta à infecção intramamária por bactérias, mas pode ser também micoplasmática, fúngica, ou causada por algas. Entretanto, a maioria dos casos de mastites é causada por infecções bacterianas da glândula mamária (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

O diagnóstico da mastite clínica pode ser feito pela observação de sintomas clínicos, como a inflamação do úbere, a secreção láctea com grumos, sangue, pus, ou outras alterações. Segundo Radostits et al. (2002) o diagnóstico clínico da mastite é extremamente simples, visto que, qualquer vaca com úbere inflamado, difuso ou focalmente, ou doloroso em um ou mais quartos e sem alterações anatômicas, mas secretando leite com sangue, pus, grumos tem mastite. Entretanto, mastites subclínicas podem reduzir a capacidade funcional da glândula mamária, causam prejuízos econômicos e não são diagnosticadas pelo exame clínico: inspeção do animal, leite e palpação.

Para diagnosticar a mastite subclínica, é necessário o uso de exames complementares baseados no conteúdo celular ou em alterações bioquímicas da composição do leite. Além disso, para identificar o agente causador da mastite, é necessário a cultura microbiológica e isolamento do agente etiológico, visando estabelecer métodos de tratamento, estratégias de controle e profilaxia adequados (PANKEY; DRECHSLER; WILDMAN, 1991).

A técnica de espectrometria de massas (MS) com fonte de ionização do tipo ionização e dessorção a laser assistida por matriz – MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization*) e analisador de massas do tipo tempo-de-vôo (TOF) tem sido utilizada para a caracterização de microrganismos por meio de seus *fingerprintings*, devido a capacidade da técnica para detectar moléculas de massas elevadas presentes em misturas complexas de biomoléculas em sua forma monoprotonada, e ainda possui alta sensibilidade mesmo em reduzida quantidade de amostra (SIUZDAK, 2006). Essa técnica possui um tipo de ionização branda, que permite a dessorção de peptídeos e proteínas a partir de cultivos ou extratos bacterianos (RUELLE et al., 2004). Os íons são separados de acordo com sua massa molecular e número de cargas, cada íon corresponde a uma espécie molecular desprendida da superfície celular durante a dessorção e ionização a laser (HOLLAND et al., 2006; SIUZDAK, 2006).

A utilização de MALDI-TOF MS está se tornando frequente em microbiologia clínica humana, mas não foi aplicada para estratégias de avaliação microbiológica pertinentes à mastite bovina. A técnica de MALDI-TOF MS permite a reprodutibilidade de espectros, um fator crítico na identificação de bactérias por comparação de seus *fingerprintings* de massas (ZHANG et al., 2004). Com a utilização desse método, bactérias podem ser identificadas por comparação do espectro de massas (obtido em poucos segundos), com os de referência de cepas conhecidas, utilizando-se processamento de dados por análise estatística multivariada, o que pode proporcionar o diagnóstico do patógeno causador da mastite com mais rapidez do que os métodos convencionais.

2 OBJETIVOS

Avaliar o uso da técnica de MALDI-TOF MS para identificação de bactérias causadoras de mastite subclínica bovina a partir de:

- A) Microrganismos isolados de meio de cultura após 24 ou 48 horas;
- B) Amostras de leite experimentalmente contaminado, sem prévio cultivo microbiológico.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 MASTITE SUBCLÍNICA: CONCEITOS, MÉTODOS DIAGNÓSTICOS E PRINCIPAIS AGENTES

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária, a qual frequentemente tem origem bacteriana, classificada em relação a forma de apresentação em subclínica e clínica (PEELER et al., 2003; SANTOS et al., 2004). Mais de 80 diferentes espécies de microrganismos foram identificadas como agentes causadores de mastite bovina, sendo que as espécies mais frequentemente isoladas são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium sp*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (HOLTENIUS, 2004). Santos et al. (2004) relataram que a colonização da glândula mamária bovina por bactérias patogênicas resulta em alterações na composição do leite, seguida pelo aumento marcante no número de células somáticas.

Santos e Fonseca (2007) afirmaram que a mastite inicia-se quando os microrganismos invadem a glândula mamária atravessando o canal do teto e multiplicam-se no interior dos tecidos. A invasão microbiana pode ocorrer por diversas formas, como a colonização da pele e do canal do teto entre as ordenhas, flutuações de vácuo durante a ordenha que introduzem os microrganismos para dentro do teto e introdução de cânulas contaminadas no momento do tratamento intramamário. Após a invasão, ocorre intensa migração de leucócitos do sangue para o leite, com o objetivo de eliminar o agente patogênico, além de alterações da permeabilidade vascular e outros sinais de inflamação. Os autores também citam quatro fatores principais que envolvem a ocorrência da mastite, como a resistência da vaca, o agente patogênico, o ambiente e o estágio de lactação.

A mastite pode resultar na substituição de células epiteliais secretoras por tecido conjuntivo, ocasionando queda na produção de leite, pois para as células somáticas alcançarem o interior dos alvéolos e combater as bactérias, passam entre duas células secretoras de leite e podem acabar destruindo estas células (SOMMERHAUSER et al., 2003).

Um programa de controle da mastite tem como objetivos eliminar infecções existentes, monitorar a saúde da glândula mamária e minimizar a incidência de novas infecções (DOHOO; LESLIE, 1991; SANTOS; FONSECA, 2007). Medidas de controle da mastite incluem o uso do *pré-dipping* e *pós-dipping* (imersão dos tetos em solução desinfetante), terapia de vaca seca com antibiótico de longa duração, segregação e abate de animais com mastite crônica e controle ambiental. O *pós-dipping* previne novas infecções intramamárias causadas por patógenos contagiosos, durante o período de ordenha. A terapia de vaca seca aumenta a resistência da vaca (por meio da dieta, vacinação e prevenção ao estresse) diminuindo a incidência de mastite causada por patógenos ambientais (SARGEANT et al., 2001). Detectar a infecção intramamária é de grande importância para manter o padrão de qualidade do leite e a saúde do rebanho. Os principais métodos de diagnóstico da mastite são: condutividade elétrica (CE), contagem de células somáticas (CCS), *Califórnia Mastitis Test* (CMT), teste da caneca, *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) e cultura microbiológica (SANTOS; FONSECA, 2007; KAMPHUIS et al., 2008).

O aumento na contagem de células somáticas (CCS) é a principal característica utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica, pois é um bom indicador da probabilidade de ocorrência de uma infecção intramamária. Quanto maior a CCS maior é a probabilidade de que a vaca esteja infectada. O leite de um quarto não infectado apresenta CCS menor que 100.000 cel/ml, enquanto a CCS de um quarto infectado é geralmente superior a 200.000 cel/ml, indicando a ocorrência de mastite subclínica ou que o quarto está se recuperando da infecção (ESSLEMONT; KOSSAIBATI, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007).

A CCS é geralmente usada como critério de diagnóstico indireto para identificação da mastite (SCHEPERS et al., 1997). Segundo Berglund et al. (2007) a infecção intramamária é a principal causa do aumento da CCS. Prestes, Filappi e Cecim (2002) afirmaram que agentes contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Estafilococos* coagulase negativa (ECN), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis*) levam ao aumento da CCS, por outro lado, os microrganismos ambientais (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Streptococcus uberis* e *Pseudomonas aeruginosa*) podem ou não alterar os valores da CCS devido às diferenças das respostas imunológicas e do agente etiológico envolvido na infecção intramamária.

O CMT (*Califórnia Mastitis Test*) é um dos testes mais conhecidos e práticos para o diagnóstico da mastite subclínica. Seu princípio baseia-se na estimativa da contagem de células somáticas no leite. O resultado do teste é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais de leite e reagente, sendo o teste realizado em bandeja apropriada. Os resultados são expressos em cinco escores: negativo, traços, um, dois e três sinais positivos, os quais apresentam correlação relativamente boa com a contagem de células somáticas em vacas da raça Holandesa (ESSLEMONT; KOSSAIBATI, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007).

O CMT é capaz de detectar o processo inflamatório na glândula mamária e é aceito internacionalmente para o diagnóstico indireto da mastite subclínica em condições de campo (COSTA et al., 1996). O teste da caneca telada ou de fundo escuro deve ser realizado a cada ordenha nos primeiros jatos de leite. A visualização de grumos no leite decorrentes de alterações por depósito de leucócitos permite o diagnóstico de formas clínicas de mastite. O contraste do fundo negro da caneca com os grumos facilita a visualização de alterações e o diagnóstico precoce. Adicionalmente, sinais clínicos da infecção como edema, vermelhidão, rubor, dor, alterações da consistência do tecido mamário ou presença de nódulos podem ser observados (HIRSH; ZEE, 2003; SANTOS; FONSECA, 2007).

A cultura bacteriológica do leite é considerada um teste qualitativo e para que um resultado seja positivo é preciso o isolamento de pelo menos um microrganismo viável. No entanto, qualquer contaminação externa pode gerar um resultado falso-positivo ou erros na preparação das amostras e dos meios de cultura podem gerar resultados falso-negativos. Por ser considerado um teste caro e pouco viável como exame de rotina na fazenda; outros testes de diagnóstico da mastite devem ser empregados (URECH et al., 1999).

O diagnóstico microbiológico para identificação e quantificação dos agentes causadores em amostras do leite é um método auxiliar no monitoramento das mastites contagiosas, entretanto, apresenta algumas limitações como o tempo necessário para o diagnóstico, limitação do crescimento de alguns agentes, e os procedimentos de conservação e transporte das amostras. O diagnóstico molecular, baseado na técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), possibilita a identificação do agente sem a necessidade do mesmo estar viável na amostra (SANTOS, 2006).

A reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de seqüências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA - *deoxyribonucleic acid*.) ou de ácido ribonucléico (RNA - *ribonucleic acid*), sendo este último realizado a partir da síntese de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA - *complementary deoxyribonucleic acid*). É uma técnica com alta especificidade e aplicabilidade, com centenas de métodos descritos. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pouca quantidade de material. Para a realização da PCR, existe a necessidade da obtenção de ácidos nucleicos, sendo que na literatura existem varias técnicas descritas com essa finalidade, utilizando substâncias e estratégias diferentes (MESQUITA et al., 2001).

Os ECN vivem na pele do teto e podem infectar a glândula mamária. As infecções causadas por este patógeno desenvolvem pequeno aumento da contagem de células somáticas. Casos clínicos são comumente observados (COSTA et al., 1995) e tanto a taxa de cura espontânea quanto a resposta ao tratamento com antibióticos são eficazes. Vacas adultas e novilhas apresentam alta prevalência de mastite causada por esse tipo de agente após o parto, com rápido declínio dos casos após a segunda semana de lactação (SANTOS; FONSECA, 2007).

A principal fonte de eliminação de *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, dentro do rebanho, é a própria glândula mamária infectada. Porém, os microrganismos ambientais, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e coliformes; quando isolados de amostras de leite, do tanque especialmente, podem ser oriundos de outras fontes externas e não específicas da glândula mamária (BRITO et al., 1998).

A infecção por *S. agalactiae* frequentemente se apresenta na forma subclínica com acentuado aumento da CCS. Entretanto, a infecção causada por essa bactéria apresenta boa resposta ao tratamento antibiótico intramamário durante a lactação. Vacas infectadas por *Streptococcus agalactiae* apresentaram maior taxa de cura quando tratadas, do que vacas infectadas por outros tipos de patógeno (WILSON et al., 1999). Vacas com mastite por esse patógeno tornam-se reservatórios da bactéria no rebanho e a ordenha é considerada o momento de maior risco de transmissão da bactéria. Essa espécie bacteriana reside somente no úbere de vacas infectadas e elimina elevado número de bactérias no leite, podendo influenciar a contagem bacteriana total do leite do tanque. Devido ao estreito habitat do

Streptococcus agalactiae e a maior taxa de cura seguida de tratamento, algumas fazendas optam por erradicar o patógeno do rebanho. O programa de controle de *Streptococcus agalactiae* é baseado em cultura microbiológica e tratamento com antibiótico de todos os quartos do úbere infectados pelo patógeno. Vacas não responsivas a segunda fase de tratamento devem ser separadas do rebanho ou descartadas (SANTOS; FONSECA, 2007).

Infecções causadas por *Streptococcus* ambientais têm natureza variada devido a distintas características de dois constituintes desse grupo, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*. Diferentes linhagens de *Streptococcus uberis* apresentam não somente padrão epidemiológico ambiental como também padrão contagioso. O *S. dysgalactiae* também mostra padrões alternados e o aumento de sua prevalência nos rebanhos leva à necessidade de desenvolver estratégias específicas de controle (SANTOS; FONSECA, 2007). Na rotina de isolamento microbiológico, os *Enterococcus* spp. são muitas vezes classificados como parte do grupo dos *Streptococcus* ambientais (ou não *agalactiae*). As bactérias do gênero *Enterococcus* spp. são mais resistentes aos antimicrobianos e sobrevivem em ambientes pouco favoráveis, o que pode afetar a prevalência e a taxa de cura dos estreptococos (SANTOS et al., 2007).

A infecção por *S. aureus* apresenta geralmente caráter subclínico e resposta imune branda, condição que contribui para sua habilidade de estabelecer infecções intramamárias crônicas (BANNERMAN et al., 2004). Além disso, o *S. aureus* possui grande capacidade de invasão, instalando-se em partes profundas da glândula mamária. A taxa de cura desse tipo de infecção durante a lactação tende a ser bastante reduzida. Tratamentos de maior duração foram associados a maiores chances de cura, porém é necessário avaliar o custo-benefício de tal estratégia. Visando maximizar a cura, o tratamento durante a lactação deve ser realizado em animais jovens com infecção recente tendo apenas um quarto comprometido (HENSEN et al., 2000).

Casos de mastite causada por bactérias Gram negativas envolvem principalmente *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. Os casos clínicos desse grupo de bactérias, em geral, apresentam-se de forma aguda. A destruição da bactéria pelo sistema imune causa a exposição de fatores estimulantes da inflamação que desencadeiam os típicos sinais clínicos da infecção (BANNERMAN et al., 2004). A quantidade de estímulo ao sistema imune determina a gravidade da infecção, e em

cerca de 40% dos casos severos o animal pode apresentar bacteremia (WENZ et al., 2001).

3.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

A MS é uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, por meio da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, (ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por m/z (*mass-to-charge ratio*). Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula e seus fragmentos, é possível inferir sua composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura. A MS pode ser utilizada em análises quantitativas, mas tem se destacado também em análises qualitativas, como na identificação de compostos em misturas complexas e, principalmente, na caracterização estrutural de compostos desconhecidos, que pode ser alcançado através da formação de íons-molécula e de seus respectivos íons-fragmentos (SOUZA, 2008)

Devido à elevada sensibilidade, exatidão e resolução proporcionadas por essa técnica na identificação de proteínas, MS pode ser considerada a principal ferramenta analítica no campo da proteômica. Métodos tradicionais exigem um grande número de amostras biológicas e diversas etapas de purificação de amostra são exigidas para a identificação das proteínas (FERNANDEZ-LIMA et al., 2005).

Um espectrômetro de massas apresenta uma fonte de íons, um ou mais analisadores de massas e um detector. A fonte de íons é parte do espectrômetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, formação íons em fase gasosa; os analisadores de massas são parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com sua relação massa-carga (m/z) por meio de campos elétricos e magnéticos. Os detectores recebem os íons provenientes dos analisadores de massas e amplificam seu sinal, gerando correntes elétricas que são

processadas por meio de um programa computacional e transformadas em espectro de massas (Figura 1) (WATSON; SPARKMAN, 2007).

Figura 1 - Representação esquemática das etapas da análise por MS. Moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa na fonte de íons, os quais são atraídos e filtrados pelos analisadores de massas. Os íons atingem o detector, onde têm seu sinal amplificado e processado para formar o espectro de massas.

A ionização é o processo físico-químico de conversão de um átomo ou molécula em um íon, por meio de adição ou remoção de cargas. Este processo funciona de maneira diferente dependendo se um íon positivo ou negativo está sendo produzido. Um íon de carga positiva é produzido quando um elétron ligado a um átomo (ou molécula) absorve energia suficiente para escapar da barreira elétrica que o limitava, desfazendo assim o vínculo com o núcleo, sendo expelido para fora da eletrosfera. A quantidade de energia necessária é chamada de potencial de ionização. Um íon negativamente carregado é produzido quando um elétron livre choca com um átomo e é então capturado, ficando no interior da barreira do

potencial elétrico. Em alguns casos, um próton pode ser adicionado ou subtraído da molécula, rendendo os íons $[M^+H]^+$ ou $[M^+H]^-$, respectivamente. Em outros casos, os íons são formados através da interação com adutores, como metais alcalinos (por exemplo, Li^+ , Na^+ , K^+), formando íons positivos, ou então com ânions como Cl^- , rendendo íons com cargas negativas (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Tendo em vista que os processos de ionização são fundamentais para a análise por MS, diversas fontes de ionização foram desenvolvidas ao longo da sua história, como Ionização Eletrônica (EI), Ionização Química (CI), Ionização por Bombardeamento Rápido de Átomos (FAB), Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI), Ionização por Spray de Elétrons (ESI), Ionização Química a Pressão Atmosférica (IQPA), Ionização por Dessorção de Spray de Elétrons (DESI), entre outras técnicas de ionização.

Segundo Watson e Sparkman (2007) a fonte de ionização é a parte do espectrômetro de massas que produz os íons a partir dos analitos, e realiza sua transferência para a fase gasosa (há casos onde a ionização ocorre em fase gasosa, como a partir de amostras voláteis). Estes íons são então levados para dentro do espectrômetro, sob um ambiente de vácuo, e então conduzidos até o detector. A base da MS é a separação destes íons por suas diferenças de m/z . Para atender esta necessidade, foram desenvolvidas diferentes formas para controlar a trajetória desses íons através espectrômetro, que são realizadas por campos elétricos e magnéticos, chamados de analisadores de massas (na realidade são analisadores de íons, ou m/z), e são quase tão diversificados quanto às fontes de íons. Sendo os mais conhecidos os analisadores quadrupolares (Q – *Quadrupole*), armadilhas de íons (IT – *ion Trap*, ou QIT – *Quadrupole ion Trap*), tempo-de-vôo (TOF – *Time-of-Flight*), Analisadores com Transformada de Fourier (FT – *Fourier – Transform*) e Analisadores de Mobilidade de Íons (IM – *ion Mobility*).

Os detectores compreendem a porção final dos espectrômetros de massas; sua função é detectar os íons que chegam até eles e amplificar o sinal. Os detectores funcionam pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser armazenados e traduzidos em imagens, e dentre eles se destacam os detectores Faraday crup e os Multiplicadores de Elétrons (EM – *Electron Multiplier*), Multiplicadores de Fótons, entre outros (WATSON; SPARKMAN, 2007).

A técnica de MS com fonte de ionização do tipo MALDI tem sido amplamente utilizada para a caracterização de microrganismos devido à sua capacidade de analisar moléculas de massas elevadas, misturas complexas de biomoléculas, e ainda por apresentar alta sensibilidade mesmo em reduzida quantidade de amostra (SIUZDAK, 2006). Essa técnica possui um tipo de ionização branda, que permite a dessorção de peptídeos e proteínas a partir de cultivos bacterianos ou extratos bacterianos (RUELLE et al., 2004). Os íons são separados e detectados de acordo com sua massa molecular e número de cargas. Cada pico de massa corresponde a um fragmento molecular desprendido da superfície celular durante a dessorção à laser (HOLLAND et al., 2006; SIUZDAK, 2006). Utilizando esse método, bactérias podem ser identificadas comparando seu espectro de massas, com espectros referência de cepas por meio de análise estatística multivariada.

Na ionização por MALDI, a amostra deve ser misturada a uma matriz específica que auxiliará na sua ionização. A amostra é misturada a uma determinada matriz que quando seca, cristaliza-se juntamente com o analito. A transferência de energia por MALDI ocorre através da irradiação pulsada de laser, a matriz energizada converte a energia do laser em energia para a excitação do analito, promovendo sua ionização (Figura 2). Esta forma de transferência de energia é eficiente na obtenção de moléculas intactas, já que elas não sofrem incidência direta da excessiva energia do laser, o que poderia causar sua decomposição. Este processo ocorre em uma câmara sob vácuo e os íons formados na fase gasosa são acelerados por campos eletrostáticos em direção ao analisador (ARDREY, 2003; DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Existe uma grande variedade de matrizes que podem ser utilizadas em MALDI, constituídas principalmente de compostos aromáticos. As fontes de laser também podem variar. No entanto, a mais comum é a de N_2 , com comprimento de onda de 337 nm. Os íons formados apresentam-se de modo geral protonados monocarregados em modo positivo, desprotonados em negativo. Contudo, é comum de serem formados íons com duas ou mais cargas, ou com adutores como Na^+ ou K^+ (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Fonte: Adaptado de <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/maldi-mechanism.gif>

Figura 2– Representação esquemática da ionização por fonte de MALDI.

Analísadores do tipo TOF são baseados no princípio de que os íons com a mesma carga têm energias cinéticas iguais, e sua velocidade será inversamente proporcional à raiz quadrada da sua massa. Dessa forma, se dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, são acelerados através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão dependentes de suas massas, e eles atingirão o detector com “tempos de voo” diferentes. Assim, o íon de menor valor de m/z atingirá o detector primeiro, enquanto que o de maior massa levará mais tempo para chegar ao detector (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

O potencial de aplicação da MS para estudos biológicos tem sido bastante estendido devido aos impressionantes avanços observados nos últimos anos em aplicações nas áreas de genômica, transcriptoma, metabolômica, proteômica, lipidoma e outras plataformas “*omics*”, e ao desenvolvimento extraordinário dos equipamentos (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; FENG et al., 2008). A MS é

atualmente a técnica de escolha para identificação de proteínas e para o estudo de modificações protéicas pós-traducionais em diferentes condições fisiológicas. Além disso, a MS vem sendo utilizada no monitoramento e caracterização de diversos processos industriais como, por exemplo, em processos fermentativos (ROYCE, 1993) e até mesmo na análise de microorganismos intactos (CLAYDON et al., 1996; FENSELAU; DEMIREV, 2001).

Hettick et al. (2006) relataram a discriminação e a caracterização de micobactérias por MALDI-TOF MS. A técnica foi usada também para quimiotaxonomia bacteriana (CLAYDON et al., 1996; SMOLE et al., 2002; RUELLE et al., 2004).

A MS também é utilizada na determinação de razões isotópicas. Por exemplo, a análise de uma amostra de solução NaCl, os íons Na^+ e Cl^- estarão dissociados, e quando analisados em modo de detecção de íons positivos, será obtido apenas um íon de m/z 23 referente ao Na^+ . Entretanto, quando analisamos esta mesma solução em modo de detecção de íons negativos veremos o aparecimento de dois íons, um de m/z 35 sendo este o íon base (aquele aparece representando 100%) e outro de m/z 37, que deverá representar cerca de 1/3 do íon base. Estes resultados devem-se à relação isotópica apresentada pelos íons analisados (SOUZA, 2008).

3.3 APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IONIZAÇÃO E DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ (MALDI-TOF MS) NA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

A identificação rápida das espécies patogênicas e não patogênicas de microorganismos é de grande importância para a área de saúde humana e animal, prevenção contra armas biológicas e contra o bioterrorismo, assim como aplicações em bioengenharia, e a indústria farmacêutica. A MS, é um método rápido e sensível para a identificação e tipificação de microorganismos (TANG; STRATTON, 2006). Em 1975, Anhalt e Fenselau usaram pela primeira vez MS para caracterizar bactérias. Essa abordagem vem ganhando popularidade como ferramenta de caracterização de microorganismos (FENSELAU; DEMIREV, 2001). Embora o

número de estudos ainda seja limitado, a MS tem se mostrado confiável para diferenciar enorme variedade de bactérias Gram negativas e Gram-positivas, as cianobactérias, fungos e protozoários em diferentes níveis taxonômicos (LI; LIU; CHEN, 2000; VAN BAAR, 2000; FASTNER; ERHARD; VON DOHREN, 2001; ISHIDA et al., 2003; DICKINSON et al., 2004; DIECKMANN et al., 2005).

Técnicas de dessorção e ionização a laser, dessorção de plasma, e bombardeamento de átomos rápidos em MS foram aplicadas para a identificação de microorganismos. No entanto, a técnica de MALDI apresenta diversas vantagens em relação à outras técnicas de ionização, devido à sua sensibilidade, eficiência de ionização, e a capacidade de ionizar moléculas de alto peso molecular sem fragmentá-las (ROSS; NEIHOF; CAMPANA, 1986; HELLER, et al., 1987; EASTERLING, et al., 1998; CAROFF; DEPRUN; KARIBIAN, 1993; ZARROUK et al., 1997).

Métodos tradicionais microbiológicos com base na morfologia e nas características bioquímicas são demorados (em média três a sete dias), são propensos a erros, e laboriosos. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos rápidos e eficazes para identificação das espécies bacterianas é necessário. A MS é uma poderosa ferramenta analítica, que vem se tornando rotineira em estudos biológicos. Essa técnica constitui-se em uma alternativa interessante aos métodos tradicionais para identificação bacteriana. Ilna et al. (2009) utilizaram a espectrometria de massas para identificação de espécies de *Neisseria*. Fujita et al. (2005a,b) e empregaram a técnica para identificação de espécies de Micobactérias, confirmando a utilidade da técnica.

Vários métodos manuais e automatizados baseados nas características fenotípicas têm sido desenvolvidos para a identificação de estafilococos. Infelizmente, estes sistemas têm suas limitações, principalmente devido às diferenças fenotípicas entre estirpes da mesma espécie. Ao longo dos últimos 10 anos, muitos métodos genotípicos baseados na análise de determinados alvos de DNA foram concebidos para a identificação de espécies de *Staphylococcus Coagulase Negativo* em isolados. Dubois et al. (2010) utilizaram a MALDI-TOF MS, e análise dos fingerprintings ou das "impressões digitais", para a identificação de 152 cepas de *Staphylococcus* de origem clínica e ambiental. Assim como no presente trabalho, esse grupo também avaliou a aplicação do programa computacional Biotyper (Bruker Daltonics, EUA) para a identificação rápida dos *fingerprintings* por

meio de comparação com o banco de dados do programa computacional, concluindo que essa abordagem é uma excelente alternativa aos métodos tradicionais e pode ser utilizado para a análise das relações clonais e/ou taxonômica.

Carbonelle et al. (2007) descreveram a aplicação do MALDI TOF-MS para a identificação de espécies. Vinte e três cepas de referência de espécies clinicamente relevantes ou subespécie foram selecionadas. Para cada cepa de referência, o perfil de MALDI-TOF MS foi analisado e comparado ao perfil de 196 cepas testadas. Em todos os casos, o conjunto de íons de referência foi comum à mesma espécie da estirpe testada, demonstrando assim que os 23 íons selecionados puderam ser incorporados ao banco de dados do Biotyper (Bruker Daltonics, USA) para a identificação rápida de espécies de ECN.

A utilização do MALDI-TOF MS foi avaliada por Nagy et al. (2009) para a identificação das espécies de 277 amostras clínicas do gênero *Bacteroides*. A identificação das espécies foi realizada com MALDI software Bruker Biotyper Daltonik (Bruker Daltonics EUA), comparando o espectro de massas de cada linhagem com os espectros de massas da referência. Os resultados de identificação fenotípica convencional dos isolados foram utilizados como referência. O seqüenciamento do gene 16S rRNA foi realizado em uma seleção das cepas que apresentaram resultados discrepantes. Os autores concluíram que o poder de discriminação e identificação precisos de MALDI-TOF MS mostrou-se superior aos testes bioquímicos para *Bacteróides*.

Nove cepas de bactérias anaeróbias foram caracterizadas por MALDI-TOF MS e aplicou-se o método para identificação com sucesso dessas bactérias em amostras de 75 pacientes que apresentaram infecção periodontal. Os autores sugeriram que a técnica de MALDI-TOF MS venha a se tornar um método útil para a identificação de bactérias anaeróbicas, especialmente aquelas que não podem ser prontamente identificadas por análise bioquímica. Essa técnica pode se tornar um sistema atrativo até mesmo para a identificação de rotina de amostras clínicas (STINGU et al., 2008).

Streptococcus viridans (VS) são responsáveis por várias doenças sistêmicas, como endocardite, abscessos e septicemia. Porém, a identificação das espécies pelos métodos convencionais, parece ser mais difícil do que identificação de espécies de outros grupos de bactérias. Friedrichs et al. (2007) avaliaram o uso de MALDI-TOF MS para a rápida identificação de 10 espécies diferentes de VS em 99

isolados clínicos, 10 cepas de referência e 20 estirpes do microorganismo. Para a análise, todas as cepas foram identificadas em paralelo por métodos fenotípicos e genotípicos. A comparação dos resultados de identificação das espécies obtidas pelas análises MALDI-TOF MS com os sistemas de identificação fenotípica/genotípica mostrou 100% de consistência em nível de espécie.

Illina et al. (2010) usaram a técnica de MALDI-TOF MS para identificação de bactérias *Helicobacter pylori*, 17 espécies clínicas e duas laboratoriais de *H. pylori*. Apesar da heterogeneidade protéica evidente de *H. Pylori*, os espectros de massas coletadas sob várias condições de cultivo foram altamente reprodutíveis. Além disso, todas as amostras clínicas foram perfeitamente identificadas como espécies de *H. pylori* por meio da análise comparativa dos espectros de *fingerprinting*. Teramoto et al. (2007) obtiveram resultados promissores por MALDI-MS na identificação da *Pseudomonas putida*, afirmando que a classificação pelo método proposto foi muito semelhante às estratégias que se baseiam o seqüenciamento de DNA .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTO I – IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA E POR MALDI-TOF MS DE BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE CULTIVO DE AMOSTRAS DE LEITE DE ANIMAIS PORTADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA

4.1.1 Coleta de amostras de leite para identificação de patógenos causadores de mastite subclínica

As amostras de leite foram coletadas a partir de quartos mamários de vacas com histórico de mastite subclínica, das raças Gir e Holandesa de quatro fazendas comerciais, localizadas na região de Pirassununga/SP. As amostras de leite foram coletadas durante 2 meses, totalizando 774 amostras.

Antes da ordenha os tetos foram imersos em solução de iodo (0,5%), decorridos 20 segundos, foram enxutos com papel toalha descartável. Em seguida, as amostras de leite foram coletadas individualmente de cada um dos quartos mamários para cultura microbiológica. As amostras de leite foram transportadas em caixas de isotérmicas com gelo (à 4,5°C), para o Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VNP-FMVZ/USP).

4.1.2 Cultura microbiológica

Para o procedimento de isolamento e identificação de patógenos, utilizou-se a metodologia proposta por NMC (2004). Para o isolamento primário de microrganismos, foi utilizado o meio de cultura Agar-sangue (contendo 5% de sangue bovino) em placas de Petri descartáveis e estéreis (90x15 mm), nas quais as amostras de leite foram inoculadas com auxílio de alça de platina calibrada. As placas foram incubadas a 37°C e observadas às 24 e 48 horas quanto à presença de crescimento bacteriano. Decorrido o tempo de incubação, as colônias bacterianas

foram classificadas de acordo suas características morfológicas (cor, aspecto, tamanho e presença de hemólise).

Após a coloração de Gram, foram utilizadas as seguintes provas bioquímicas para identificação das bactérias: hidróxido de potássio (KOH), catalase, coagulase, CAMP, esculina, indol, citrato, hipurato, tolerância ao sal e bile esculina.

Para cada isolado, após a identificação microbiológica, as bactérias foram criopreservadas em meio BHI (Brain Heart Infusion) suplementado com glicerina (2%) para conservação da amostra sob congelação (-20°C).

4.1.3 Preparo de amostras para MALDI-TOF MS

Foram selecionados aleatoriamente um total de 33 amostras, em seguida as amostras de bactérias criopreservadas foram descongeladas e ressuspensas por 24 horas em meio BHI. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (todas as centrifugações ocorreram a 13.000 Xg por 2 min) para obtenção de um *pellet* de bactérias.

Foi utilizado o protocolo de lise bacteriana para análise por MALDI MS descrito por Lartigue et al. (2009) e ilustrado na figura 3. O *pellet* de bactérias obtido foi diluído em 1200 μL de solução de etanol 75% (300 μL de água deionizada e 900 μL de etanol) visando à inativação das bactérias. O sedimento bacteriano foi centrifugado o sobrenadante foi descartado por meio da inversão do tudo. Foi realizada uma segunda centrifugação para remover o restante de etanol presente na amostra e retirou-se o sobrenadante com auxílio de uma pipeta. Após secagem do *pellet* em temperatura ambiente, foi adicionada solução de 70% de ácido fórmico, em quantidade suficiente para recobrir o *pellet* ($\sim 30\text{-}50\mu\text{L}$) e lisar as células bacterianas. Após homogeneização do conteúdo, foi adicionado o mesmo volume de acetonitrila 100% ($\sim 30\text{-}50\mu\text{L}$). Na etapa final do preparo, foi feita a centrifugação para separar os sedimentos de células bacterianas do sobrenadante contendo proteínas bacterianas, principalmente proteínas ribossomais (RYZHOV; FENSELAU, 2001), dos quais se obteve os espectros de MALDI-MS utilizado para a identificação bacteriana.

Figura 3 - Representação do fluxo de preparo de amostra para identificação de bactérias por MALDI.

4.1.4 Coleta de espectros de massas

O volume de 1,0 µL do extrato bacteriano foi colocado em placa (96 MSP; Bruker Daltonics, EUA), seguida de secagem ao ambiente. O sobrenadante seco foi coberto com 1,0 uL de solução de matriz, composta de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) diluída em acetonitrila 50% e de ácido trifluoroacético 2,5%. Utilizou-se um espectrômetro de massa MALDI-TOF LT Microflex Bruker equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa computacional FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics, EUA). Espectros de massas foram coletados na faixa de massas de 2.000-20.000m/z.

Os espectros obtidos foram em seguida analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, EUA) com as configurações padrão para obtenção da identificação bacteriana. O algoritmo utilizado pelo MALDI Biotyper confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras referência contidas em um banco de dados de referência. O procedimento de análise leva em consideração as massas e as intensidades relativas dos espectros desconhecidos (LARTIGUE et al., 2009).

A figura 4 compara o fluxo de análise utilizado para a identificação de bactérias por meio de testes microbiológicos tradicionais e por MALDI-TOF MS com utilização de um programa computacional de comparação de espectros de massas.

Figura 4- Esquema comparativo dos procedimentos para identificação microbiológica e por MALDI-TOF MS.

4.1.5 Sequenciamento do gene 16S rRNA para identificação bacteriana

Em casos de discrepância de resultados entre a identificação microbiológica e a identificação por MALDI-TOF, as amostras foram submetidas ao sequenciamento do gene 16S rRNA (FERRONI et al., 2002; BECKER et al., 2004; CLOUD et al., 2004).

Para amplificação do fragmento do gene 16S rRNA (FERRONE et al., 2002; MELLMANN et al., 2008), foram utilizados primers universais. O sequenciamento foi realizado com a ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, versão 3.1 e a ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster

City, CA, EUA). Os dados da sequência do 16S rRNA foram comparados com os do GenBank banco de dados usando o software BLAST (<http://www.sepsitest-blast.de/de/index.html>). Um nível de homologia superior a 98% foi considerado adequado para a identificação de espécies.

4.1.6 Processamento dos dados

Para o processamento de dados, foi utilizado um programa computacional (Biotyper (Bruker Daltonics, EUA) cujo funcionamento é específico para identificação de microorganismos por comparação com um banco de dados (MELLMANN et al., 2008; ILINA et al., 2009; NAGY et al., 2009; DUBOIS et al., 2010; ILINA et al., 2010). O programa computacional possui atualmente mais de 4.000 espectros referências, os quais abrangem a taxonomia proposta pelo NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A plataforma permite também criar bancos de dados próprios do usuário ou permite que os microorganismos pouco representados no banco de dados do *software* sejam enviados à empresa Bruker Daltonics para a atualização do *software*, que ocorre a cada quatro meses.

O programa computacional Biotyper incorpora funcionalidades para o processamento de espectros de massa, bem como para identificação e classificação. A correspondência de padrões para a identificação de microrganismos desconhecidos é realizada por meio da comparação das listas de íons geradas por uma biblioteca de espectros armazenados, os quais contêm as informações de espectros característicos das espécies e subespécies. Os espectros de biblioteca são gerados por meio da combinação de espectros de massas de espécies e estirpes bacterianas de referência (ATCC) ou sequenciadas. Dessa maneira, o programa computacional agrupa automaticamente listas de íons de todo o conjunto de espectros e extrai os íons típicos, que estão presentes em um certo número de espectros a partir de uma espécie. Para o agrupamento e geração de uma árvore genealógica, o programa computacional Biotyper oferece uma variedade de funcionalidades. Primeiro, é possível calcular a similaridade de todos os espectros principais em uma biblioteca com cada um dos outros espectros neste conjunto de correspondência de padrão ou a similaridade pode ser calculada com base nos

resultados do dendrograma de similaridade. Com base nos componentes principais calculados, uma variedade de algoritmos de agrupamento e visualizações está disponível (MAIER; SCHWARZ; KOSTRZEWA, 2010).

O programa computacional Biotyper apresenta os resultados por meio de um valor ou *escore* na faixa de 0 – 3.0, calculado através da comparação da lista de íons para um isolado desconhecido com a referência no banco de dados. Um *escore* $\geq 1,7$ é indicativo de identificação em nível de gênero e *escore* $\geq 2,0$ é o limiar definido para uma identificação em nível de espécie (NAGY et al., 2009).

4.2 EXPERIMENTO 2 – IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE A PARTIR DO LEITE POR MALDI-TOF MS

Nessa etapa do estudo, foi avaliada uma metodologia para recuperação de bactérias causadoras de mastite no leite para sua identificação por MALDI-TOF MS sem necessidade de cultivo microbiológico. O protocolo foi baseado no método de identificação de bactérias presentes em amostras de sangue (MOUSSAOUI et al., 2010).

4.2.1 Cepas Bacterianas

Para a contaminação experimental do leite foram utilizadas cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Esses microorganismos foram selecionados devido à sua frequência em casos de mastite (*S. aureus*), e às suas características bioquímicas: *E. faecalis* é uma bactéria gram-positiva e *Escherichia coli* é gram-negativa.

Todas as amostras foram incubadas a 37 °C em agar-sangue em condições aeróbias para crescimento.

4.2.2 Contaminação bacteriana experimental do leite

O protocolo foi desenvolvido e otimizado utilizando-se leite pasteurizado e homogeneizado (com gordura 3,5%). Todas as etapas de centrifugação foram realizados à velocidade de 13.000 X g por 2 minutos.

Após 24 horas de incubação das cepas bacterianas (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*), as colônias de bactérias foram removidas da placa de agar com o auxílio de uma alça flexível de plástico estéril e cuidadosamente diluídas em água destilada. A concentração bacteriana em água destilada foi determinada pela densidade óptica (DO) por espectrofotometria (Biochrom Libra S22 UV/Vis espectrofotômetro) no comprimento de onda 600 nm. Após a calibração com água destilada pura, a solução bacteriana foi diluída novamente em proporção 1:20 para mensuração da DO. Uma unidade de DO corresponde à concentração de 3×10^8 bactérias mL⁻¹.

O volume correspondente a 10^9 ufc/mL ou 10^8 ufc/mL de bactérias suspensas em água destilada foi colocado em um microtubo de 1,5 mL, o qual foi centrifugado (Biofuge Hearaeus, Gera, Alemanha), a fim de obter um *pellet* contendo 10^9 ou 10^8 bactérias. Após descartar o sobrenadante, 1 mL de leite foi adicionado no microtubo contendo o *pellet* bacteriano, de modo a obter a concentração de 10^9 ou 10^8 bactérias mL⁻¹ de leite. Diluições seriadas de 1:10 foram realizadas a fim de obter amostras contendo de 10^7 a 10^3 bactérias mL⁻¹.

A extração de bactérias foi realizada a partir de 1,0 mL de amostra de leite experimentalmente contaminada por meio da adição de 200 mL de solução "Lise 1" (Bruker Daltonics, EUA). Essa solução contém detergentes e osmolaridade otimizados para que as células e proteínas presentes na amostra sejam solubilizadas ao mesmo tempo em que as bactérias não sejam destruídas e possam ser recuperadas por centrifugação. Após a primeira etapa de centrifugação, foi possível identificar o sedimento de bactérias no fundo do tubo na concentração de bactérias 10^9 a 10^7 mL⁻¹ (sem o tratamento "Lise 1", não era possível visualizar o *pellet*).

Observamos a formação de uma grossa camada de lipídios provenientes do leite na superfície do microtubo, que foi removida com o auxílio de uma alça de plástico estéril flexível da capacidade de 10 µL. O sobrenadante foi cuidadosamente

descartado com o auxílio de pipeta de 1000 µL, e posteriormente por pipeta de 200 µL, a fim de evitar a resuspensão do sedimento formado.

Foram adicionados ao *pellet* 1 mL de água destilada e 200 µL de solução "Lise 1" foi novamente adicionado, cuidadosamente homogeneizado com o *pellet* de bactérias, seguido por uma segunda etapa de centrifugação. Após a remoção cuidadosa da camada lipídica e descarte do sobrenadante com o auxílio das pipetas, 1mL de solução de "Lise 2" (Bruker Daltonics, EUA) foi adicionado cuidadosamente e uma terceira etapa de centrifugação foi realizada. Após a remoção do sobrenadante, foi realizado o procedimento de lise bacteriana descrito anteriormente (item 4.1.3), seguida da análise por MALDI-TOF MS (item 4.1.4) e o processamento dos dados (item 4.1.6).

4.2.3 Incubação de leite experimentalmente contaminado

A incubação de 900 µL de leite experimentalmente contaminados com *E. coli* a 37 ° C por 4 horas com agitação contínua (900 rpm), a fim de aumentar a carga bacteriana foi realizada com concentrações iniciais de 10^3 a 10^5 bactérias mL⁻¹.

4.2.4 Leite contaminado total tratado com etanol para a inativação de bactérias e armazenamento da amostra

Uma vez que para aplicações de campo e na indústria, pode haver a necessidade de inativação de bactérias, para o transporte e armazenamento das amostras, adaptamos o protocolo desenvolvido para aplicá-lo à análise de amostras de leite colhidas de vacas com mastite subclínica.

O volume de 300 µL de leite cru foi colocado em microtubos de 1,5 mL, seguido pela adição de 900 µL de etanol absoluto. É possível perceber que a solução torna-se granulada, devido à coagulação de proteínas. O passo inicial para a preparação das amostras envolveu a centrifugação da amostra e descarte do sobrenadante. Em seguida, cuidadosamente foi feita a ressuspensão do *pellet*,

realizada pela adição de 1200 μL de Lise1 (17%), a fim de dissolver completamente o *pellet*. Após a centrifugação, a placa de lipídios é formado na superfície do microtubo, sendo retirado com o auxílio de uma alça de plástico estéril flexível da capacidade de 10 μL , seguido pela remoção do sobrenadante com o auxílio de pipetas de 1000 μL e de 200 μL , a fim de evitar perturbar o sedimento. A segunda etapa de lavagem foi realizada pela adição de 1 mL de solução de Lise 2, seguida de centrifugação. Após a remoção do sobrenadante, 300 μL de água foi adicionado e cuidadosamente misturado, seguido pela adição de 900 μL de etanol absoluto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE SUBCLÍNICA

Foram identificados pelo método microbiológico 774, isolados de bactérias provenientes de animais portadores de mastite subclínica. O agente mais frequente foi *Estafilococos coagulase negativa* (ECN) (32,8%), seguido por *Staphylococcus aureus* (26,2%), *Corynebacterium spp.* (24,9%), *Streptococcus agalactiae* (5,1%) e *Streptococcus uberis* (3,1%) (Tabela 1). Sargeant et al. (2001) relataram que o agente mais frequentemente isolado foi o ECN (49,7%), como observado por este estudo. Souto et al. (2008) descreveram o *Corynebacterium spp.* (11,24%) como agente mais freqüente seguido pelo grupo *Staphylococcus spp.* (9,2%) e *Streptococcus spp.* (5,34%), como agentes mais isolados. Entretanto, diferentemente, Malinowski et al. (2006) encontraram maior frequência de *Streptococcus sp.* (15,7%), seguido por ECN (14,6%), *Staphylococcus aureus* (8,6%) e *Corynebacterium spp.* (3,8%); enquanto Piepers et al. (2007) encontraram maior prevalência de *Estafilococcus coagulase negativa* (57,2%), seguido por *Staphylococcus aureus* (18,4%), *Streptococcus uberis* (15,9%) e *Corynebacterium spp.* (0,8%).

Tabela 1- Frequência de microrganismos isolados de amostras de leite de quartos mamários de quatro fazendas comerciais pelo método microbiológico.

Microrganismos Identificados	Nº de isolados (Fazenda)				
	A	B	C	D	Total
<i>Estafilococos coagulase negativa</i>	79	33	55	87	254 (32,8%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	75	12	74	203 (26,2%)
<i>Corynebacterium sp.</i>	70	32	57	34	193 (24,9%)
<i>Streptococcus agalactae</i>	5	-	-	35	40 (5,1%)
<i>Streptococcus uberis</i>	16	2	4	2	24 (3,1%)
<i>Bacillus</i>	5	-	3	5	13 (1,6%)
<i>Arcanobacterium sp.</i>	2	-	-	10	12 (1,5%)
<i>Streptococcus dysgalactae</i>	2	3	5	2	12 (1,5%)
<i>S. coagulase positivo acetoina negativo</i>	-	-	-	12	12 (1,5%)
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	-	-	-	3	3 (0,38%)
<i>Streptococcus acidominimus</i>	-	-	-	2	2 (0,25%)
<i>Staphylococcus hyicus</i>	-	-	-	2	2 (0,25%)
<i>Enterococcus sacaroliticus</i>	-	-	-	1	1 (0,12%)
<i>Levedura</i>	-	-	-	1	1 (0,12%)
<i>Prototeca sp</i>	-	1	-	-	1 (0,12%)
<i>Nocardia</i>	-	-	-	1	1 (0,12%)
Total	221	146	136	271	774

5.2 EXPERIMENTO I - IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE SUBCLÍNICA POR MALDI-TOF MS

Os resultados da identificação por cultura microbiológica MALDI-TOF MS das 33 amostras estudadas estão apresentadas no quadro 2. Para todas as amostras de *Streptococcus agalactiae*, foram observados resultados similares para a identificação microbiológica e MALDI-TOF MS. Em relação ao *Staphylococcus aureus*, de 13 isolados, 11 apresentaram resultados de mesma identificação. Um isolado de *S. aureus* foi identificado por MALDI-TOF como *S. Haemolyticus*. Por inspeção visual é possível observar as diferenças entre *S. aureus* e *S. haemolyticus* por perfis de proteínas bacterianas conservadas (proteínas ribossomais) (Figura 5), e este resultado foi confirmado por sequenciamento do gene 16S rRNA (Anexo A).

Nº amostras	Identificação Microbiológica	MALDI-TOF MS
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> * ¹
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> * ²
10	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1	<i>Etafilococos</i> coagulase negativa	<i>Staphylococcus simulans</i>
2	<i>Etafilococos</i> coagulase negativa	<i>Staphylococcus aureus</i> * ²
5	<i>Etafilococos</i> coagulase negativa	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1	<i>Etafilococos</i> coagulase negativa	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
1	<i>Etafilococos</i> coagulase negativa	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>

*1 – 16S rRNA, resultado do seqüenciamento correspondente à identificação MALDI-TOF MS

*2 – Cultura mista

Quadro 1– Identificação de agentes causadores de mastite subclínica por cultura microbiológica e por MALDI-TOF MS.

Figura 5- Espectros MALDI-TOF MS de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus*, na faixa de 3.000 a 12.000 m/z.

Para o segundo caso de discrepância no grupo de amostras de *S. aureus*, a análise pelo Biotyper indicou *E. faecalis*. O espectro obtido desta amostra foi diferente do espectro de *S. aureus*, indicando uma possível presença de cultura mista de bactérias. Foi aplicado um algoritmo, ferramenta do programa

computacional Biotyper para identificação de cultura mista de bactérias. O algoritmo indicou presença de cultura mista de *E. faecalis* e *S. aureus* (Figura 6). Estes resultados sugerem que a presença de *S. aureus* foi suficiente para a reação de coagulase positiva deste isolado e não seria possível por meio de análise microbiológica tradicional detectar a presença de cultura mista.

Figura 6- Análise pelo algoritmo do programa computacional Biotyper, indicando a identificação de cultura mista (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*).

O grupo dos ECN é composto por grande número de espécies de bactérias do gênero *Staphylococcus*, e são agentes causadores de mastite. Rotineiramente, a diferenciação das espécies não é determinada pelo exame microbiológico, mas essa identificação mais detalhada foi possível por MALDI-TOF MS (Figura 7) (DUBOIS et al., 2010, SZABADOS et al., 2010). A presença de *S. aureus* no grupo ECN não foi esperada, já que cepas de *S. aureus* apresentam reação positiva ao teste de coagulase (MLYNARCZYK et al., 1998). Entretanto de acordo com Catry (2003) foi descrito a ocorrência de *S. aureus* coagulase negativa, em estudos de caracterização molecular (PCR por espaçador intergênico tRNA), de isolados de rebanhos leiteiros na Bélgica. Dentre 26 isolados de *S. chromogenes* foi encontrado um *S. aureus* que apresentou reação negativa à coagulase, e que, portanto só foi caracterizado por PCR (CATRY, 2003). Os espectros de ECN caracterizados por MALDI-TOF MS neste trabalho foram de espécies coagulase negativa, como *S. simulans*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, que pode ser facilmente identificado por

MALDI-TOF MS. Esses perfis foram facilmente relacionados ao gênero de bactérias e das espécies do banco de dados Biotyper.

Figura 7- Espectros MALDI-TOF MS de isolados de Estafilococos coagulase negativa.

Alguns resultados discordantes entre a cultura microbiológica e o MALDI-TOF MS apresentados neste trabalho estão relacionados às diferentes estratégias de identificação da estirpe bacteriana utilizados pelos procedimentos clássicos (morfologia da colônia, coloração e reações enzimáticas) e a estratégia de perfil de proteínas conservadas utilizada por MALDI-TOF MS. Métodos moleculares têm sido reconhecidos como ferramentas necessárias na microbiologia (KOLBERT; PERSING, 1999), o que tem sido confirmado com a utilização de MALDI-TOF MS em diversos estudos (FERRONE et al., 2002; MELLMANN et al., 2008).

Por meio dos resultados obtidos amostras utilizadas como prova de conceito para a introdução da técnica de MALDI-TOF MS na área de microbiologia do leite, concluímos que a identificação de bactérias por suas "impressões digitais protéicas" representa uma ferramenta valiosa. Desta forma, o uso do MALDI-TOF MS pode abrir uma nova era em microbiologia, quando métodos fenotípicos convencionais e demorados poderão ser substituídos por métodos moleculares precisos para

análises taxonômicas e filogenéticas (LAY, 2000). É necessário estabelecer um método universal de preparação de amostra para diferentes microorganismos, a fim de facilitar a uniformidade entre os testes laboratoriais. A técnica deve ser reprodutível e fornecer picos nos espectros de MALDI suficiente para construir um banco de dados com perfis característicos de vários tipos de bactérias para banco de dados rápido e preciso (JACKSON et al., 2005; VARGHA et al., 2006; LIU, et al., 2007).

Além da vantagem única da economia de tempo proporcionada pela técnica, a mesma é de interessante custo-benefício (preparo simples e barato de amostras e placas de MALDI reutilizáveis) e de alto desempenho (a coleta do espectro de massas e comparação com banco de dados do Biotyper demora menos de 2 minutos por amostra).

5.3 EXPERIMENTO II – IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA A PARTIR DE LEITE PELO MALDI-TOF MS

Embora o diagnóstico da mastite clínica seja simples, a forma subclínica não é diagnosticada pelos métodos rotineiros. O diagnóstico microbiológico com a identificação dos agentes causadores demora de cinco a sete dias, o que dificulta a aplicação rápida de medidas de controle e tratamento. A mastite bovina pode representar um problema de saúde pública em função da ocorrência de toxinas bacterianas e do aumento no risco da presença de resíduos de antibióticos no leite. Inicialmente, a infecção não é facilmente perceptível (mastite subclínica), de forma que pode se disseminar rapidamente pelo rebanho. Dessa forma, avaliamos um método para diagnóstico sem necessidade de cultivo *in vitro* de bactérias presentes em amostras de leite utilizando MALDI-TOF MS.

5.3.1 Identificação direta de bactérias presentes no leite

Para a avaliação da metodologia proposta, foi utilizado um protocolo adaptado para a detecção direta de bactérias presente em sangue (MOUSSAOUI et al., 2010), o qual foi otimizado para o processamento de amostras de leite. Os resultados obtidos mostraram que é possível recuperar bactérias (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) diretamente do leite, ou seja, sem cultura in vitro para obter crescimento e isolamento de bactérias, e identificá-las por MALDI-TOF MS se houver quantidade de 10^6 ufc/mL de *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, e 10^7 ufc/mL para *Escherichia coli* na amostra. A concentração de bactérias na amostragem é um fator que interfere na identificação dos patógenos causadores de mastite, assim como interfere na detecção de microrganismos no sangue (MOUSSAOUI et al., 2010). Christner et al. (2010) e Szabados et al. (2010) sugeriram que a contagem bacteriana deve ser entre 10^7 e 2×10^9 ufc/mL para garantir a identificação.

Observamos que a capacidade de detecção dos patógenos pode ser diferente dependendo do tipo de cepas de bactérias, conforme descrito por Moussaoui et al. (2010). A figura 8 mostra os espectros de massas obtidos após contaminação experimental em leite com 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 por *E.coli* mL⁻¹ e aplicação do protocolo de recuperação de bactérias para identificação por MALDI-TOF MS. O efeito positivo da concentração inicial de bactérias presentes na amostra sobre a qualidade do espectro pode ser visualmente observado, uma vez que os íons mais numerosos e intensos estão presentes entre m/z 4.000 e 10.000 Da (Figura 8 a-g).

O MALDI-TOF MS permite a identificação da maioria das bactérias patogênicas cultivadas em placas de ágar a partir de colônias isoladas em poucos minutos, e com eficiência e reprodutibilidade. A identificação de patógenos por meio de análise direta do leite pode proporcionar uma identificação praticamente instantânea, uma vez que não foi necessário o cultivo microbiológico. Desta forma, o uso deste método pode proporcionar uma intervenção rápida e precisa no controle e tratamento da mastite no rebanho.

Figura 8- MALDI-TOF MS: espectros na faixa de 4.000 a 22.000 m / z, obtidos após a contaminação experimental de leite integral (a) 10^3 , (b) 10^4 , (c) 10^5 , (d) 10^6 , (e) 10^7 (f) 10^8 , e (g) 10^9 por *E. coli*/mL⁻¹. Os mesmos experimentos foram realizados com *E. Faecalis* e *S. aureus*.

5.3.2 Incubação do leite experimentalmente contaminado

Foi utilizado leite, que representa naturalmente um excelente meio de cultura para microorganismos. Dessa maneira, hipotetizamos que o simples procedimento de incubar a 37°C o volume de 1 mL de leite por poucas horas (4 horas), sob agitação a fim de permitir a replicação natural das bactérias e sua identificação a partir de uma concentração inicial menor na amostra. Para este efeito, o leite foi experimentalmente contaminado com bactérias na concentração de 10^2 - 10^5 mL⁻¹. O método foi capaz de melhorar a identificação com este simples procedimento, pois a partir da carga inicial de 10^4 ufc/mL espectros de alta qualidade foram obtidos (Figura 9) com identificação por correspondência do banco de dados (Figura 10).

Com este procedimento simples, o limite de detecção de identificação bacteriana instantânea foi diminuído para uma concentração inicial de 10^4 ufc/mL para *E. coli*.

Figura 9- Espectros de massas obtidos a partir do processamento de amostras contendo concentrações iniciais de 10^2 a 10^5 *E. coli* mL⁻¹, em (a) 10^2 , (b) 10^3 , (c) 10^4 e (d) 10^5 .

10 ⁵	culture_Ecoli_10e5	Escherichia coli	2.094	Escherichia coli	2.074
	culture_Ecoli_10e5	Escherichia coli	2.085	Escherichia coli	2.052
	culture_Ecoli_10e5	Escherichia coli	2.045	Escherichia coli	2.036
10 ⁴	culture_Ecoli_10e4	Escherichia coli	1.945	Escherichia coli	1.915
	culture_Ecoli_10e4	Escherichia coli	1.994	Escherichia coli	1.967
	culture_Ecoli_10e4	Escherichia coli	2.019	Escherichia coli	2.012
10 ³	culture_Ecoli_10e3	not reliable identification	1.364	not reliable identification	1.359
	culture_Ecoli_10e3	not reliable identification	1.509	not reliable identification	1.407
	culture_Ecoli_10e3	not reliable identification	1.446	not reliable identification	1.364
10 ²	culture_Ecoli_10e2	not reliable identification	1.536	not reliable identification	1.484
	culture_Ecoli_10e2	not reliable identification	1.632	not reliable identification	1.538
	culture_Ecoli_10e2	not reliable identification	1.465	not reliable identification	1.441

Figura 10- Planilha de resultados fornecida pelo programa computacional Biotyper após coleta e processamento dos espectros de massas.

5.3.3 Identificação direta de bactérias em amostras de leite com etanol

A fim de permitir a aplicação da técnica de modo prático na rotina de um laboratório de microbiologia, foi avaliado um protocolo no qual amostras de leite contaminado contendo bactérias inativadas, poderiam ser transportadas em temperatura ambiente sem risco biológico, ou poderia ser armazenados para posterior análise. O volume de 0,3 mL de leite experimentalmente contaminado com *E.coli*, *E. faecalis* e *S. aureus* foi colocado em microtubo de 1,5 mL. Para a inativação das bactérias adicionou-se 0,9 mL de etanol absoluto. Denominamos esta amostra de *pellet* de leite e etanol. Para a *E. coli*, embora espectros com os íons intensos foram obtidos para 10⁷ ufc/mL (Figura 11 a-c), o sucesso de identificação com escore aceitável (superior a 1,7) fornecido pelo Biotyper foi obtido para concentrações iguais ou superiores para *E.coli* 10⁸ ufc/mL, para *E. faecalis* e para identificação de *S. aureus* confiável já foi possível para concentrações iguais ou superiores a 10⁷ ufc/mL (Figura 11 d-e).

Observamos que nesse tipo de amostra, a presença de proteínas precipitadas causada pelo excesso de etanol necessário para inativar as bactérias pode ter contribuído para dificultar a recuperação das bactérias e ter causado a redução de três vezes a capacidade observada em etanol + leite em relação ao leite cru.

Figura 11- MALDI-TOF MS: espectros obtidos a partir da identificação de microorganismos instantânea de leite em etanol 75%. A quantidade de leite de cada amostra foi de 300 μ L (a) 10^7 , (b) 10^8 e (c) 10^9 mL de *E. coli*⁻¹, e (d) 10^7 e (e) 10^8 do *E. faecalis* mL⁻¹.

Esses resultados indicam que é necessário que a amostras de leite conservada em 75% etanol tenha aproximadamente três vezes mais carga bacteriana para a realização com sucesso da identificação de microorganismos sem necessidade de cultivo.

Considerando-se que o volume de amostragem de leite possa ser bastante estendido (em vez de 300 μ L ou 1mL podemos usar 10 mL ou 50 mL de leite), há

boas perspectivas de que os métodos desenvolvidos para leite in natura e leite conservado em solução 75% etanol possam ter sucesso em amostras reais.

O desenvolvimento e aplicação de novas biotecnologias frequentemente requer colaborações interdisciplinares para o desenvolvimento e aplicação de novos métodos. Este trabalho foi resultado de uma colaboração entre as áreas de química e medicina veterinária para aplicação da técnica de MALDI-TOF MS para o diagnóstico microbiológico do leite. Como o Brasil é um país de intensa atividade e importância agropecuária, é fundamental que tais iniciativas sejam apoiadas e desenvolvidas de modo pioneiro. A utilização de MALDI-TOF MS é considerada atualmente revolucionária em microbiologia humana, com inúmeras publicações de alto impacto, comprovando a confiabilidade para uso em microbiologia clínica humana (LARTIGUE et al., 2009; MARKLEIN et al., 2009; MELLMANN et al., 2009; DUBOIS et al., 2010; ILINA et al., 2010; SEIBOLD et al., 2010). Na área de microbiologia veterinária, essa tecnologia ainda é incipiente, mas espera-se que seja igualmente revolucionária.

Acreditamos que essa técnica possa se tornar fundamental em abordagens visando melhorar o monitoramento da qualidade do leite e controle da mastite bovina.

6 CONCLUSÃO

O MALDI-TOF MS juntamente com o protocolo estudado se mostrou capaz de identificar os patógenos causadores de mastite após cultura microbiológica, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e espécies de Estafilococos coagulase negativa.

O método para recuperação de bactérias experimentalmente inoculadas em amostras de leite e identificação por MALDI-TOF MS sem necessidade de cultivo para isolamento de colônias, foi possível para 10^6 ufc/mL de *E. faecalis* e *S. aureus*, e 10^7 ufc/mL para *E. Coli*. A incubação por 4 horas do leite aumentou em 10 vezes a capacidade de detectar o patógeno pelo método de recuperação de bactérias. O método pode ser aplicado em amostras de leite conservadas em 75% etanol, com perda de capacidade de detecção aproximada de três vezes.

O uso de MALDI-TOF MS pode acelerar a identificação de patógenos causadores de mastite subclínica bovina podendo contribuir para a adoção de medidas de controle e tratamento mais adequado. Na indústria de laticínios, MALDI-TOF MS também pode fornecer uma identificação mais rápida, e confiável de microrganismos presentes no leite para um controle de qualidade microbiológico mais abrangente.

REFERÊNCIAS

- ARDREY, R. E., **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-mass spectrometry: an Introduction**. Chichester, UK.: John Wiley & Sons, 2003.
- ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.47, p. 219-225, 1975.
- BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; LEE, J. W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 463-47, 2004.
- BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 4988–4995, 2004.
- BERGLUND, I.; PETTERSSON, G.; OSTENSSON, K.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Quarter Milking for improved detection of increase SCC. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 4, p. 427-432, 2007.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.
- CARBONNELLE, E.; BERETTI, J.; COTTYN, S.; QUESNE, G.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Rapid Identification of Staphylococci Isolated in Clinical Microbiology Laboratories by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 7, p. 2156–2161, 2007.
- CAROFF, M.; DEPRUN, C.; KARIBIAN, D. 252Cf plasma desorption mass spectrometry applied to the analysis of underivatized rough-type endotoxin preparations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 12321–12324, 1993.
- CATRY, B.; DEVRIESE, L. A.; LAESENS, H.; DE VliegHER, S.; VANEECHOUTTE, M.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. Antibiotic susceptibility and resistance of *Staphylococcus chromogenes* from bovine mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavia**. v. 44, p. 89, 2003.
- CLAYDON M.; DAVEY S.; EDWARD-JONES V.; GORDON D. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1584–1586, 1996.
- CLOUD, J. L.; CONVILLE, P. S.; CROFT, A.; HARMSSEN, D.; WITEBSKY, F. G.; CARROLL, D K. C. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for

identification of nocardia species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 578–584, 2004.

COSTA E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; VIANI, F. C.; MASCOLLI, R.; OLIVEIRA, P. J. Mastite bovina: CMT *versus* microbiológico. **Hora Veterinária**, v. 15, n. 89, p. 53-54, 1996.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 156-158, 1995.

CHRISTNER, M.; ROHDE, H.; WOLTERS, M.; SOBOTTKA, I.; WEGSCHEIDER, K.; AEPFELBACHER, M. Rapid identification of bacteria from positive 1 blood culture bottles using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 48, p. 1584–1591, 2010.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken, 2007.

DICKINSON, D. N.; LA DUC, M. T.; HASKINS, W. E.; GORNUSHKIN, I.; WINEFORDNER, J. D.; POWELL, D. H.; VENKATESWARAN, K. Species differentiation of a diverse suite of *Bacillus* spores by mass spectrometry-based protein profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 70, p. 475–482, 2004.

DIECKMANN, R.; GRAEBER, I.; KAESLER, I.; SZEWZYK, U.; VON DOHREN, H. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). **Applied and Environmental Microbiology**, n. 67, p. 539, 2005.

DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E.; SCHUKKEN, Y. H.; SARGEANT, J. M.; TIMMS, L. L.; DUFFIELD, T. F.; KEEFE, G. P.; KELTON, D. F.; LISSEMORE, K. D.; CONKLIN, J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, p. 75-89, 2004.

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, n. 3, p. 225-237, 1991.

DUBOIS, D.; LEYSSENE, D.; CHACORNAC, J. P.; KOSTRZEWA, M.; SCHMIT, P. O.; TALON, R.; BONNET, R.; DELMAS, J. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 941–945, 2010.

EASTERLING, M. L.; COLANGELO, C. M.; SCOTT, R. A.; AMSTER, I. J. Monitoring protein expression in whole bacteria cells with MALDI time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 704–709, 1998.

ESSLEMONT, D.; KOSSAIBATI, M. Mastitis: how to get out of the dark ages. **Veterinary Journal**, v. 164, p. 85-86, 2002.

FASTNER, J.; ERHARD, M.; VON DOHREN, H. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5069–5076, 2001.

FENG, X.; LIU, X.; LUO, Q.; LIU, B.F. Mass spectrometry in systems biology: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 27, n. 6, p. 635-60, 2008.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. Characterization of intact microorganism by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 157-171, 2001.

FERNANDEZ-LIMA, F. A.; PONCIANO, C. R.; PEDRERO, E.; DA SILVEIRA, E. F. Acoplamento das espectrometrias de mobilidade iônica e de massa MALDI-TOF. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 24, n. 2, p. 74-80, 2005.

FERRONI, A.; SERMET-GAUDELUS, I.; ABACHIN, E.; QUESNE, G.; LENOIR, G.; BERCHE, P. B.; GAILLARD, J. L. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of non fermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3793–3797, 2002.

FRIEDRICH, C.; RODLOFF, A. C.; CHHATWAL, G. S.; SCHELLENBERGER, W.; ESCHRICHT, K. Rapid Identification of Viridans Streptococci by Mass Spectrometric Discrimination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2392–2397, 2007.

FUJITA, Y.; NAKA, T.; DOI, T.; YANO, I. Direct molecular mass determination of trehalose monomycolate from 11 species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Microbiology**, n. 151, p. 1443–1452, 2005a.

FUJITA, Y.; NAKA, T.; MCNEIL, M. R.; YANO, I. Intact molecular characterization of cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) from nine species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Microbiology**, n. 151, p. 3403–3416, 2005b.

GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G.; CHANG, Y. M. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livestock Production Science**, v. 88, p. 251-261, 2004.

HELLER, D. N.; COTTER, R. J.; FENSELAU, C.; UY, O. M. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 2806–2809, 1987.

HENSEN, S. M.; PAVICIC, M. J.; LOHUIS, J. A.; DE HOOG, J. A.; POUTREL, B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, p. 1966-1975, 2000.

HETTICK, J. M.; KASHON, M. L.; SLAVEN, J. E.; MA, Y.; SIMPSON, J. P.; SIEGEL, P. D.; MAZUREK, G. N.; WEISSMAN, D. N. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. **Proteomics**, v. 6, p. 6416–6425, 2006.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446 p.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. **Mass Spectrometry – Principles and Applications**. 3rd ed. falta local: Wiley-Interscience, 2007.

HOLLAND, R. D.; WILKES, J. G.; RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; PERSONS, C. C.; VOORHEES, K. J.; LAYJR., J. O. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.10, p.1227–1232, 2006.

HOLTENIUS, K.; PERSSON WALLER, K.; ESSEN-GUSTAVSSON, B.; HOLTENIUS, P.; HALLEN SANDGREN, C. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. **Vet. J. POR EXTENO O TÍTULO DA REVISTA**, v. 168, p. 65-73, 2004.

ILINA, E. N.; BOROVSKAYA, A. D.; MALAKHOVA, M. M.; VERESHCHAGIN, V. A.; KUBANOVA, A. A.; KRUGLOV, A. N.; SVISTUNOVA, T. S.; GAZARIAN, A. O.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; GOVORUN, V. M.. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, p. 75–86, 2009.

ILINA, E. N.; BOROVSKAYA, A. D.; SEREBRYAKOVA, M. V.; CHELYSHEVA, V. V.; MOMYNALIEV, K. T. M.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; GOVORUN, V. M. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 328–334, 2010.

ISHIDA, Y.; NAKANISHI, O.; HIRAO, S.; TSUGE, S.; URABE, J.; SEKINO, T.; NAKANISHI, M.; KIMOTO, T.; OHTANI, H. Direct analysis of lipids in single zooplankton individuals by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, n. 75, p. 4514–4518, 2003.

JACKSON, K. A.; EDWARDS-JONES, V.; SUTTON, C. W.; FOX, A. J. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiological Methods**, n. 62, p. 273–284, 2005.

KAMPHUIS, C.; SHERLOCK, R.; JAGO, J.; MEIN, G.; HOGVEEN, H. Automatic detection of clinical mastitis is improved by In-line monitoring of somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4560-4570, 2008.

KOLBERT, C. P.; PERSING, D. H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. **Current Opinion Microbiology**. v. 2, p. 299–305, 1999.

LARTIGUE, M. F.; HERY-ARNAUD, G.; HAGUENOER, E.; DOMELIER, A. S.; SCHMIT, P. O.; VAN DER MEE-MARQUET, N.; LANOTTE, P.; MEREGHETTI, L.; KOSTRZEWA, M.; QUENTIN, R. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 2284–2287, 2009.

LAY, J. O. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, n. 19, p. 507–516, 2000.

LI, T. Y.; LIU, B. H.; CHEN, Y. C. Characterization of *Aspergillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, n. 14, p. 2393–2400, 2000.

LIU, H.; DU, Z.; WANG, J.; YANG, R. Universal Sample Preparation Method for Characterization of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1899–1907, 2007.

MAIER, T.; SCHWARZ, G.; KOSTRZEWA, M. Microorganism Identification and Classification Based on MALDI-TOF MS Fingerprinting with MALDI Biotyper. **Application Note**, Bruker Daltonik GmbH, 2010.

MALINOWSKI, E.; LASSA, H.; KŁOSSOWSKA, A.; MARKIEWICZ, H.; KACZMAROWSKI, M.; SMULSKI, S. Relationship between mastitis agents and somatic cell count in foremilk samples. **Bulletinn of the Veterinary Institute Pulawy**, v. 50, n. 3, p. 349–352, 2006.

MARKLEIN, G.; JOSTEN, M.; KLANKE, U.; MÜLER, E.; HORRE, R.; MAIER, T.; WENZEL, T.; KOSTRZEWA, M.; BIERBAUM, G.; HOERAUF, A.; SAHL, H. G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 2912–2917, 2009.

MELLMANN, A.; CLOUD, J.; MAIER, T.; KECKEVOET, U.; RAMMINGER, I.; IWEN, P.; DUNN, J.; HALL, G.; WILSON, D.; LASALA, P.; KOSTRZEWA, M.; HARMSSEN, D. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of non fermenting bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1946–1954, 2008.

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 314–319, 2001.

MLYNARCZYK, G.; KOCHMAN, M.; LAWRYNOWICZ, M.; FORDYMACKI, P.; MLYNARCZYK, A.; JELJASZEWICZ, J. Coagulase-negative variants of methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* strains isolated from hospital specimens. **Journal Zentralbl Bakteriologie**, v. 288, p. 373–381, 1998.

MOUSSAOUI, W.; JAULHAC, B.; HOFFMANN, A. M.; LUDES, B.; KOSTRZEWA, M.; RIEGEL, P.; PRE`VOST, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 16, p. 1631–1638, 2010.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. (NMC). Microbiological Procedures for the Diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4. ed. Madison, WI: **NMC Inc.**, 2004. p. 47.

NAGY, E.; MAIER, T.; URBAN, E.; TERHES, G.; KOSTRZEWA, M.. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 796–802, 2009.

PANKEY, J. W.; DRECHSLER, P. A.; WILDMAN, E. E. Mastitis Prevalence in Primigravid Heifers at Parturition. **Journal of dairy Science**, n. 74, p. 1550-1552, 1991.

PEELER, E. J.; GREEN, M. J.; FITZPATRICK, J. L.; GREEN, L. E. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 169-180, 2003.

PIEPERS, S.; MEULEMEESTER, L. D.; KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; VLIEGHER, S. D. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 4, p. 478-483, 2007.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à Mastite: Fatores que Influenciam - uma Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 118-132, 2002.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD D.C.; GAY, C.C. **Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

ROSS, M. M.; NEIHOF, R. A.; CAMPANA, J. E. Direct fatty acid profiling of complex lipids in intact algae by fast atom bombardment mass spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, v. 181, p. 149–157, 1986.

ROYCE, P.N. A discussion of recent developments in fermentation monitoring and control from a practical perspective. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p. 117-149, 1993.

RUELLE, V.; EL MOUALIJ, B.; ZORZI, W.; LEDENT, P.; DE PAUW, E. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrixassisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 2013–2019, 2004.

RYZHOV, V.; FENSELAU, C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. **Analytical Chemistry**, v. 73, 746-50, 2001.

SANTOS, C. D. M. ***Staphylococcus* sp e *Enterobactérias* isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.** 2006. p.69. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L.; BALLOU, M. A.; HIGGINBOTHAM, G. E.; KIRK, J. H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 31-45, 2004.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L. F. L. **Principais agentes causadores da mastite. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** 1. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 3, p. 24-37.

SARGEANT, J. M.; LESLIE, K. E.; SHIRLEY, J. E.; PULKRABEK, B. J.; LIM, G. H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2018-2024, 2001.

SEIBOLD, E.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; ZEMAN, E.; SPLETTSTOESSER, W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. **Journal Clinical Microbiology**, n. 48, p. 1061-1069, 2010.

SCHEPERS, A. J.; LAM, T.; SCHUKKEN, Y. H.; WILMINK, J. B. M. E.; HANEKAMP, W. J. A. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1833-1840, 1997.

SIUZDAK, G. **The expanding role of mass spectrometry in biotechnology.** 2. ed. San Diego: MCC Press, 2006. 257 p.

SMOLE, S. C.; KING, L. A.; LEOPOLD, P. E.; ARBEIT, R. D. Sample preparation of gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight. **Journal of Microbiology Methods**, v. 48, p. 107–115, 2002.

SOMMERHAUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, n. 96, p. 91-102, 2003.

SOUTO, L. I. M.; MINAGAWA, C. Y.; TELLES, E. O.; GARBUGLIO, M. A.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. Relationship between occurrence of mastitis pathogens in dairy cattle herds and raw-milk indicators of hygienic-sanitary quality. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 1, p. 121-127, 2008.

SOUZA, M. S. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 2008. p.182. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

STINGU, C. S.; RODLOFF, A. C.; JENTSCH, H.; SCHAUMANN, R.; ESCHRICHT, K. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 372–376, 2008.

SZABADOS, F.; MICHELS, M.; KAASE, M.; GATERMANN, S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 10, p. 1469- 0691, 2010.

TERAMOTO, K.; SATO, H.; SUN, L.; TORIMURA, M.; TAO, H.; YOSHIKAWA, H.; HOTTA, Y.; HOSODA, A.; TAMURA, H. Phylogenetic classification of pseudomonas putida strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. **Analytical Chemistry**, n. 79, p. 8712-8719, 2007.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHA" LLIBAUM, M. Changes in Milk Protein Fraction as Affected by Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2402-2411, 1999.

VAN BAAR, B. L. M. Characterisation of bacteria by matrixassisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 24, p. 193–219, 2000.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation**. Wiley: England, 2007. p. 860.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B.; MCSWEENEY, K. D.; DINSMORE, R. P.; GOODELL, G.; CALLAN, R. J. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 976-981, 2001.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; CASE, K. L.; GARRISON, L. L.; GRÖHN, Y. T. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.1664-1670, 1999.

ZARROUK, H.; KARIBIAN, D.; BODIE, S.; PERRY, M. B.; RICHARDS, J. C.; CAROFF, M. Structural characterization of the lipids A of three *Bordetella*

bronchiseptica strains: variability of fatty acid substitution. **Journal Bacteriological**, v. 179, p. 3756–3760, 1997.

ZHANG, Z.; WANG, D.; HARRINGTON, P. B.; VOORHEES, K. J.; REES, J. Forward selection radial basis function networks applied to bacterial classification based on MALDI-TOF-MS. **Talanta**, v. 63, p. 527–532, 2004.

ANEXO A

Seqüenciamento do 16S rRNA de amostras selecionadas na Tabela 2.

Site de busca: <http://www.sepsitest-blast.de/de/index.html>

Amostra 2, Table 2 :

CATGCAAGTCGAGCGAACAGACAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGG
 GTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT
 AATATTTTGAACCGCATG
 GTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATT
 AGCTAGTTGGTAAGGTA
 ACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
 CTGGAACTGAGACACGGTC
 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTG
 AGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATACGTG
 TAAGTAACTGTGCACGTC
 TTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAA

Positive. Similar sequence(s) found in database.

Family of BLAST hit with highest sequence identity: Staphylococcaceae

Staphylococcus haemolyticus

(Family = **Staphylococcaceae**; Sequence identity = 99.8%; Alignment length = 464 (100.0%); E-Value = 0.0; Accession = X66100)

ANEXO B

J. Dairy Sci. 93:5661–5667
doi:10.3168/jds.2010-3614
© American Dairy Science Association®, 2010.

Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

J. R. Barreiro,* C. R. Ferreira,†¹ G. B. Sanvido,† M. Kostrzewa,‡ T. Maier,‡ B. Wegemann,‡ V. Böttcher,‡ M. N. Eberlin,† and M. V. dos Santos*¹

*University of São Paulo, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Pirassununga 13635-900, Brazil

†ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas–UNICAMP Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil

‡Bruker Daltonik GmbH, Bremen D-28359, Germany

ABSTRACT

Subclinical mastitis is a common and easily disseminated disease in dairy herds. Its routine diagnosis via bacterial culture and biochemical identification is a difficult and time-consuming process. In this work, we show that matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) allows bacterial identification with high confidence and speed (1 d for bacterial growth and analysis). With the use of MALDI-TOF MS, 33 bacterial culture isolates from milk of different dairy cows from several farms were analyzed, and the results were compared with those obtained by classical biochemical methods. This proof-of-concept case demonstrates the reliability of MALDI-TOF MS bacterial identification, and its increased selectivity as illustrated by the additional identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species and mixed bacterial cultures. Matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry considerably accelerates the diagnosis of mastitis pathogens, especially in cases of subclinical mastitis. More immediate and efficient animal management strategies for mastitis and milk quality control in the dairy industry can therefore be applied.

Key words: bacteria identification, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), subclinical mastitis diagnosis

Subclinical mastitis, an udder infection without clinical signs that is commonly encountered in cows, is a major problem in the dairy industry. The disease af-

fects both milk quality and yield, and may lead to rapid transmission of the infection to healthy cows in the herd. Microbiological methods routinely used to diagnose subclinical mastitis are based on changes in milk composition caused by bacterial growth and enzymatic and immunological reactions in the infected dairy cows (Peeler et al., 2003; Santos et al., 2004).

Many microorganisms have been identified as agents of mastitis infection. In Germany, for instance, 5 bacterial species (*Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Escherichia coli*) have been shown responsible for the majority (approximately 80%) of cases (Barkema et al., 1998). In Brazil, a recent survey showed that the 3 major pathogens causing mastitis are *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus* spp. (Souto et al., 2010).

Routine microbiological methods applied to microorganism identification have remained nearly unchanged over the last century. These methods still employ classical approaches based on sample streaking, colony growth using various culture media, and morphological and biochemical characterization of the isolated bacterial species. On average, routine milk microbiological procedures take from 5 to 8 d to be completed and require the use of various biochemical tests and the evaluation of experts (NMC, 1999).

Recently, bacterial identification at the molecular level has been investigated using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Fenselau and Demirev, 2001). Many microorganisms have been identified by MALDI-TOF MS via characteristic “chemical signatures” in a high-throughput fashion using straightforward extraction and sample work-up protocols. After initial bacterial growth that requires 1 d on average, and using crude bacterial extracts or lysate supernatants of whole cells, bacterial determination has been performed by MALDI-TOF MS in a few minutes (Holland et al., 1996,

Received July 9, 2010.

Accepted August 31, 2010.

¹Corresponding authors: mveiga@usp.br and christina@iqm.unicamp.br

Mellmann et al., 2008). This technique has therefore revolutionized the field of bacterial screening by providing a much faster, more reliable, and highly sensitive technique for bacteria identification. These features are particularly attractive for bacterial isolates screening in contaminated milk at subclinical levels.

Matrix-assisted laser desorption/ionization is a “soft” ionization technique that allows for the detection of intact molecular species from pure compounds or complex mixtures. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS of bacteria identifies protein “fingerprints,” a group of mainly ribosomal proteins unique to each bacterial species (Ieven et al., 1995; Claydon et al., 1996; Keys et al., 2004; Carbonnelle et al., 2007; Barbuddhe et al., 2008). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS bacterial identification has also shown high interlaboratory reproducibility (Mellmann et al., 2009), and is rapidly being incorporated into human clinical microbiological routines. This technique requires little MS expertise, the use of simple instruments, and relatively fast operator training. When compared with DNA analysis-based technologies, MALDI-TOF MS requires smaller amounts of biological material and involves simpler sample preparation protocols with no initial assessment, such as Gram staining, (Fenselau and Demirev, 2001; Ilina et al., 2009; Mellmann et al., 2009; Ilina et al., 2010).

In this work, we tested the applicability of MALDI-TOF MS for bacterial screening of subclinical mastitis in cows. Clinical samples of 33 bacterial strains isolated from samples of milk were collected from dairy cows on various farms in São Paulo State, Brazil. For comparison, these bacterial strains were also submitted to classical routine biochemical identification testing.

To isolate bacteria from milk samples, 10 μ L of sampled milk was streaked onto blood agar plates and incubated at 37°C for 24 h to allow for bacterial growth. The biochemical identification of the species was performed by means of catalase production, coagulase test, spore staining, and (for some samples) Gram staining.

To prepare the samples for MALDI-TOF MS, the bacterial strains isolated from milk were thawed and cultured for 24 h in a brain heart infusion broth. The bacterial culture was centrifuged, inactivated in 75% ethanol, and submitted to bacterial extraction, which was performed as detailed in the literature (Barbuddhe et al., 2008; Lartigue et al., 2009; Ilina et al., 2010). By this protocol, the microtube containing isolated bacteria in 75% ethanol solution was centrifuged (all centrifugation steps were at 13,000 $\times g$ for 2 min), and the supernatant was removed by carefully pouring it from the microtube. A second centrifugation step was performed and the remaining liquid was carefully re-

moved with a pipette tip. Bacterial pellets were allowed to air dry at room temperature for 5 to 10 min. A solution of 70% formic acid was added to lyse bacterial cells and to release the inner-cell proteins, predominantly the ribosomal proteins that produce diagnostic ions in MALDI fingerprinting (Ryzhov and Fenselau, 2001). The 70% formic acid solution was added proportionally to the size of pellet to completely dissolve it. Subsequently, 100% acetonitrile was added to each sample in volumes equal to the 70% formic acid solution added, thus producing a bacterial extract in a 1:1 ratio of 70% formic acid and acetonitrile. A final centrifugation step was performed to separate bacterial cell debris from the supernatant containing the inner-cell proteins used for the MALDI-TOF MS identification.

To prepare the MALDI target plates, 1 μ L of bacterial extract was placed onto a steel target plate (MSP 96 polished-steel target; Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and allowed to air dry. The dried supernatant, overlaid with 1 μ L of matrix solution, consisted of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid diluted in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid. The MALDI-TOF MS was performed in a Bruker Microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer operated in the linear mode and equipped with a 337-nm nitrogen laser using FlexControl 3.3 software (Bruker Daltonik). The mass spectra were collected within the mass range of 2,000 to 20,000 m/z . Two hundred forty laser shots were accumulated to generate each spectrum. Spectra were analyzed with MALDI Biotyper 2.0 software (Bruker Daltonik) at default settings. For each sample, the automatic analysis generated a peak list, which was used to match a reference library by the integrated pattern-matching algorithm. The result was given by means of a log score with a maximum value of 3.0. Score values higher than 1.7 were considered reliable for genus identification, and scores higher than 2.0 were considered probable for species identification. In this study, only scores higher than 2.0 were considered. In general, the MALDI Biotyper pattern-matching algorithm considers the matches of the unknown sample spectrum against the reference database and the reverse matches of the main spectrum with the unknown spectrum; it also compares the relative intensities of unknown and database spectra (Lartigue et al., 2009).

Table 1 summarizes the results of biochemical and MALDI-TOF MS characterization of the 33 samples studied. The isolated bacteria were identified by classical microbiological routine protocols as *Staph. aureus* ($n = 13$), *Strep. agalactiae* ($n = 10$) or CNS ($n = 10$). Samples displaying divergent results for each identification technique used were sent for 16S rRNA gene sequencing for a more reliable identification. Figure 1 presents a comparison of the analysis workflow of

Table 1. Biochemical identification and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) identification of bacterial strains isolated from different milk samples from cows presenting subclinical mastitis

Samples, n	Biochemical identification	MALDI-TOF MS
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staph. aureus</i>
1	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. haemolyticus</i> ¹
1	<i>Staph. aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> / <i>Staph. aureus</i> ²
10	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Strep. agalactiae</i>
1	CNS	<i>Staph. simulans</i> ¹
2	CNS	<i>Staph. aureus</i> ¹
5	CNS	<i>Staph. epidermidis</i> ¹
1	CNS	<i>Staph. chromogenes</i> ¹
1	CNS	<i>Staph. haemolyticus</i> ¹

¹The 16S ribosomal RNA sequencing result matched the MALDI-TOF MS identification.

²Algorithm-detected mixed bacterial culture.

routine microorganism biochemical identification and MALDI-TOF MS.

The MALDI-TOF MS and biochemical identifications were performed for all 13 *Staph. aureus* samples. Each sample was cultured twice and similar results were observed. Eleven out of 13 bacterial isolates presented the same results through both identification methods. All *Strep. agalactiae* samples yielded the same results for both biochemical and MALDI-TOF MS identification procedures. Superposed spectra of *Strep. agalactiae* (Figure 2, in red, from the Biotyper database) present the same ions observed in the investigated samples (Figure 2, in light blue). From the data shown in Figure 2, it is clear that MALDI-TOF MS (based on conserved protein profiles) provides characteristic protein profiles that allow for identification of different species from the same bacterial genus (i.e., *Strep. agalactiae* and *Strep. dysgalactiae*). The MALDI Biotyper Database comprises data from strain collections (e.g., American Type Culture Collection, ATCC) and sequenced bacterial strains, and has been optimized for *Strep. agalactiae* identification (Lartigue et al., 2009).

To confirm some identification results provided by MALDI-TOF MS as compared with the classical microbiology results (Table 1), the 16S rRNA gene of certain samples was sequenced (see Table 1). One sample was identified as *Staph. aureus* by the biochemical procedures previously mentioned, whereas the samples identified by MALDI-TOF MS were identified as a *Staph. haemolyticus* (compare with Figure 3, for *Staph. aureus* and *Staph. haemolyticus*, respectively). The 16S rRNA gene sequencing confirmed the MALDI-TOF MS identification as *Staph. haemolyticus*. Matrix-assisted laser desorption/ionization-MS is also able to identify mixed bacterial cultures, as exemplified by 1 of the samples identified as *Staph. aureus* by biochemical testing. The MALDI-TOF MS displayed a protein signature corresponding to a mixture of *Enterococcus faecalis* and

Staph. aureus (Table 1). This mixed bacterial culture may explain the positive coagulase reaction of this isolate.

Many coagulase-negative *Staphylococcus* species are classified as coagulase-negative and are commonly involved in mastitis infections. Routinely, CNS species are not further determined by biochemical procedures, but further identification was achieved by MALDI-TOF MS (Figure 4; Dubois et al., 2010). The coagulase-negative *Staph. aureus* was not expected, although *Staph. aureus* strains displaying negative reaction in the coagulase tube test do exist (Mlynarczyk et al., 1998). Similarly, the presence of coagulase-negative *Staph. aureus* has been reported in 1 out of 26 *Staph. chromogenes* (a coagulase-negative *Staphylococcus*) isolated from 44 subclinical mastitis isolates from dairy herds in Belgium. The 1 isolate identified as a *Staph. aureus* strain by molecular characterization via transfer RNA intergenic spacer PCR failed to be identified microbiologically as it showed no positive coagulase reaction (Catry et al., 2003). Note that characteristic MALDI-TOF MS of CNS were obtained from coagulase-negative species, such as *Staph. simulans*, *Staph. epidermidis*, and *Staph. chromogenes*. This information, easily obtained by MALDI-TOF MS, is important for a better characterization of pathogens causing mastitis in cows and increases the prospective applications of this technique in dairy science.

Four ATCC strains were also cultured and submitted to MALDI Biotyper identification: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staph. aureus* ATCC 29213, and *Escherichia coli* ATCC 25922. Because these ATCC strains also were present in the MALDI Biotyper 2.0 database, these strains could be identified unequivocally (data not shown).

The 16S rRNA gene polymorphism is widely accepted as the “gold standard” for bacteria identification with ambiguous biochemical profiles (Relman et al., 1990,

Figure 1. Schematics comparing the workflow of classical routine microorganism biochemical identification and the workflow normally used in matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for clinical isolates identification. After initial growth of the microorganism (for 24 h after sample streaking), microorganism identification is performed in a few minutes by MALDI-TOF MS compared with 5 to 7 d for the classical biochemical methodologies. High-throughput MALDI-TOF MS can also be performed for 96 or 384 samples on each target plate.

Figure 2. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry at the ranges of (A) 5,300 to 5,450 m/z and (B) 6,100 to 6,500 m/z from reference spectra of *Streptococcus agalactiae* (red lines), reference spectra of *Streptococcus dysgalactiae* (dark blue lines), and the spectra obtained *Strep. agalactiae* samples (light blue lines). Note that the 10 *Strep. agalactiae* samples are clearly matched with the *Strep. agalactiae* from the reference spectra.

Figure 3. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry of 3 bacterial isolates. Note the characteristic protein profiles obtained for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Staphylococcus haemolyticus*.

1992). It is highly conserved within species and among species of the same genus; therefore, this method usually provides more accurate and faster results compared with conventional biochemical protocols (Ferroni et al., 2002; Becker et al., 2004; Cloud et al., 2004).

Some unexpected results presented in this work are related to the different methods of bacterial strain identification used in the classical biochemical procedures (colony morphology, staining, and enzymatic reactions) compared with the MALDI-TOF MS approach, which

Figure 4. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-time-of-flight mass spectrometry CNS isolates. Note the identification of CNS isolates. These profiles have been readily related to a bacterial genus and species by data treatment with the MALDI Biotyper Database.

is based on chemical signatures provided by protein profiles. The classical biochemical procedures for bacteria identification are more susceptible to incorrect human evaluation or errors during sample work-up, as indicated by the identification of *Strep. uberis* isolated from cow mastitis samples (Odierno et al., 2006). Approaches at the molecular level have long been recognized as important tools in microbiology (Kolbert and Persing, 1999), and MALDI-TOF MS employing "molecular fingerprints" seems to provide a reliable tool for microorganism identification. This seems to open a new era in microbiology screening in which conventional phenotypic methods will shift to molecular methods capable of providing faster and more accurate responses and similar genome-related methods of taxonomic and phylogenetic analysis.

The results presented herein, supported by similar and extensive data for clinical human microbiology (Barbuddhe et al., 2008; Mellmann et al., 2008, 2009; Sauer et al., 2008; Iliina et al., 2009; Lartigue et al., 2009; Marklein et al., 2009; Nagy et al., 2009; Dubois et al., 2010; Iliina et al., 2010; Seibold et al. 2010), show that MALDI-TOF MS provides faster detection (1 d vs. 5–8 d) and therefore the possibility of an earlier treatment of subclinical and clinical mastitis with appropriate antibiotics. In the dairy industry, MALDI-TOF MS can also provide a faster, cheaper, and more reliable identification of microorganisms for a more comprehensive microbiological quality control of milk.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Simone Stumpf and Thomas Wenzel (both of Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) for their collaboration in this work, to Carol H. Collins (University of Campinas, Campinas, SP, Brazil) and Beatrice Razzo (University of Pennsylvania, PA) for English review, and to the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasilia, DF, Brazil) and the São Paulo State Science Foundation (FAPESP, Sao Paulo, SP, Brazil) for funding.

REFERENCES

- Barbuddhe, S. B., T. Maier, G. Schwarz, M. Kostrzewa, H. Hof, E. Domann, T. Chakraborty, and T. Hain. 2008. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5402–5407.
- Barkema, H. W., Y. H. Schukken, T. J. Lam, M. L. Beiboer, H. Wilmink, G. Benedictus, and A. Brand. 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 81:411–419.
- Becker, K., D. Harmsen, A. Mellmann, C. Meier, P. Schumann, G. Peters, and C. von Eiff. 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 42:4988–4995.
- Carbonnelle, E., J. L. Beretti, S. Cottyn, G. Quesne, P. Berche, X. Nassif, and A. Ferroni. 2007. Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 45:2156–2161.
- Catry, B., L. A. Devriese, H. Laevens, S. De Vliegher, M. Vaneechoutte, G. Opsomer, and A. de Kruif. 2003. Antibiotic susceptibility and resistance of *Staphylococcus* chromogenes from bovine mastitis. *Acta Vet. Scand.* 44(Suppl. 1):89.
- Claydon, M. A., S. N. Davey, V. Edwards-Jones, and D. B. Gordon. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 14:1584–1586.
- Cloud, J. L., P. S. Conville, A. Croft, D. Harmsen, F. G. Witebsky, and K. C. Carroll. 2004. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nocardia species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J. Clin. Microbiol.* 42:578–584.
- Dubois, D., D. Leyssene, J. P. Chacornac, M. Kostrzewa, P. O. Schmit, R. Talon, R. Bonnet, and J. Delmas. 2010. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48:941–945.
- Fenselau, C., and P. A. Demirev. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 20:157–171.
- Ferroni, A., I. Sermet-Gaudelus, E. Abachin, G. Quesne, G. Lenoir, P. Berche, and J. L. Gaillard. 2002. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. *J. Clin. Microbiol.* 40:3793–3797.
- Holland, R. D., J. G. Wilkes, F. Raffi, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees, and J. O. Lay, Jr. 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10:1227–1232.
- Ieven, M., J. Verhoeven, S. R. Pattyn, and H. Goossens. 1995. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative *Staphylococci*. *J. Clin. Microbiol.* 33:1060–1063.
- Iliina, E. N., A. D. Borovskaya, M. M. Malakhova, V. A. Vereshchagin, A. A. Kubanova, A. N. Kruglov, T. S. Svistunova, A. O. Gazarian, T. Maier, M. Kostrzewa, and V. M. Govorun. 2009. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *J. Mol. Diagn.* 11:75–86.
- Iliina, E. N., A. D. Borovskaya, M. V. Serebryakova, V. V. Chelysheva, K. T. Momynaliev, T. Maier, M. Kostrzewa, and V. M. Govorun. 2010. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24:328–334.
- Keys, C. J., D. J. Dare, H. Sutton, G. Wells, M. Lunt, T. McKenna, M. McDowall, and H. N. Shah. 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect. Genet. Evol.* 4:221–242.
- Kolbert, C. P., and D. H. Persing. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:299–305.
- Lartigue, M. F., G. Hery-Arnaud, E. Haguenoer, A. S. Domelier, P. O. Schmit, N. van der Mee-Marquet, P. Lanotte, L. Mereghetti, M. Kostrzewa, and R. Quentin. 2009. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 47:2284–2287.
- Marklein, G., M. Josten, U. Klanke, E. Muller, R. Horre, T. Maier, T. Wenzel, M. Kostrzewa, G. Bierbaum, A. Hoerauf, and H. G. Sahl. 2009. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 47:2912–2917.

- Mellmann, A., F. Bimet, C. Bizet, A. D. Borovskaya, R. R. Drake, U. Eigner, A. M. Fahr, Y. He, E. N. Ilina, M. Kostrzewa, T. Maier, L. Mancinelli, W. Moussaoui, G. Prevost, L. Putignani, C. L. Seachord, Y. W. Tang, and D. Harmsen. 2009. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 47:3732–3734.
- Mellmann, A., J. Cloud, T. Maier, U. Keckevoet, I. Ramminger, P. Iwen, J. Dunn, G. Hall, D. Wilson, P. Lasala, M. Kostrzewa, and D. Harmsen. 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 46:1946–1954.
- Mlynarczyk, G., M. Kochman, M. Lawrynowicz, P. Fordymacki, A. Mlynarczyk, and J. Jeljaszewicz. 1998. Coagulase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* strains isolated from hospital specimens. *Zentralbl. Bakteri.* 288:373–381.
- Nagy, E., T. Maier, E. Urban, G. Terhes, and M. Kostrzewa. 2009. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:796–802.
- NMC. 1999. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4th ed. NMC Inc., Madison, WI.
- Odierno, L., L. Calvino, P. Traversa, M. Lasagno, C. Boggi, and E. Reinoso. 2006. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. *J. Dairy Sci.* 89:3886–3890.
- Peeler, E. J., M. J. Green, J. L. Fitzpatrick, and L. E. Green. 2003. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 59:169–180.
- Relman, D. A., J. S. Loutit, T. M. Schmidt, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1990. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N. Engl. J. Med.* 323:1573–1580.
- Relman, D. A., T. M. Schmidt, R. P. MacDermott, and S. Falkow. 1992. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N. Engl. J. Med.* 327:293–301.
- Ryzhov, V., and C. Fenselau. 2001. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal. Chem.* 73:746–750.
- Santos, J. E. P., R. L. A. Cerri, M. A. Ballou, G. E. Higginbotham, and J. H. Kirk. 2004. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 80:31–45.
- Sauer, S., A. Freiwald, T. Maier, M. Kube, R. Reinhardt, M. Kostrzewa, and K. Geider. 2008. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE* 3:e2843.
- Seibold, E., T. Maier, M. Kostrzewa, E. Zeman, and W. Splettstoesser. 2010. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 48:1061–1069.
- Souto, L. I., C. Y. Minagawa, E. O. Telles, M. A. Garbuglio, M. Amaku, P. A. Melville, R. A. Dias, S. T. Sakata, and N. R. Benites. 2010. Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. *J. Dairy Res.* 77:63–70.