JULIANA REGINA BARREIRO

**Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por
espectrometria de massas**

Pirassununga

2015

JULIANA REGINA BARREIRO

Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por espectrometria de massas

Tese apresentada ao 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 doutor em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2015

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.3096
FMVZ

Barreiro, Juliana Regina
Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por espectrometria de massas /
Juliana Regina Barreiro. -- 2015.
87 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2015.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Mastite. 2. Espectrometria de massas. 3. MALDI-TOF MS. 4. Bactéria. 5. Leite. I. Título.

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação rápida de microorganismos causadores de mastite por Espectrometria de Massas.", protocolado sob o nº 3002/2013, utilizando 150 (cento e cinquenta) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e 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.

We certify that the Research "Rapid identification of microorganisms causing mastites by mass spectrometry", protocol number 3002/2013, utilizing 150 (one hundred fifty) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and 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.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARREIRO, Juliana Regina

Título: Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por espectrometria de massas

Tese apresentada ao 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 Doutor em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

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 marido **Filipe Reinert Raspantini** que com seu apoio, incentivo, carinho, alegria e companheirismo sempre esteve presente.

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

Ao Professor Luiz Juliano Neto e Rafaella Grenfell, da Universidade de São Paulo do Departamento de Biofísica pelo apoio dado durante o desenvolvimento da pesquisa e amizade.

A todos do Laboratório ThoMSon, em especial a Patrícia Braga, pelo apoio durante as realizações das análises e principalmente pelo companheirismo e grande amizade.

A pesquisadora Aline Dibbern, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho. Muito obrigada pela amizade e por me fazer rir quando tudo parecia estar perdido.

Aos grandes amigos que se tornaram irmãs e irmãos que tiveram presentes em todos os momentos sendo eles bons ou ruins: Aline Dibbern, Renata Leite, Katiéli Welter, Juliano, Cristian, Susana, Ju Diniz, Ju Naves, Larissa Parazzi, Elmeson e Tiago Tomazi.

À família Raspantini: Ester, Paulo Cesar, Paulinho, Débora e Tiago que sempre presentes com carinho e alegria 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, Dr. Marcio Brunetto pelos ensinamentos ao longo dessa etapa e profissionalismo;

Aos colegas e amigos do Laboratório Qualileite pelos momentos inesquecíveis e ensinamentos eternos: Cristina Cortinhas, Juliano Gonçalves, Tiago Tomazi, Cristian Martins, Aline Dibbern, Bruna Alves, Renata Leite, Eduardo Pinheiro, Marcos Arcari, Alessandra Orsi, Mariana Pallú, Katiéli Welter, Lucinéia Mestieri, José Franchini, Gabriel, Larissa.

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

Sr. José Franchini Garcia Moreno e Sra. Lucinéia Mestieri, funcionários do Laboratório Qualileite FMVZ-USP, pelo auxílio na realização das análises laboratoriais, amizade e carinho;

Muito Obrigada !!!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(LEONARDO DA VINCI)

RESUMO

BARREIRO, J. R. **Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por espectrometria de massas**. [Direct identification of microorganisms causing mastitis by mass spectrometry]. 2015. 87 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser assistida por matriz – tempo-de-vôo (MALDI-TOF) para a identificação direta em amostras de leite (sem cultivo microbiológico) de bactérias causadoras de mastite. Para tanto foram realizados dois experimentos (1 e 2). No experimento 1, o objetivo foi determinar a sensibilidade diagnóstica da técnica MALDI-TOF MS para a identificação direta em amostras de leite de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli*. Foram realizadas contaminações experimentais de *S. aureus*, *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *E. coli* em amostras de leite, para a obtenção de contagens de 10^3 a 10^9 ufc/mL. As amostras de leite contaminadas foram processadas com o uso do kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics) e submetidas ao protocolo de lise bacteriana para posterior análise por MALDI-TOF MS. Espectros de massas foram coletados na faixa de massas de 2.000-20.000 m/z e foram analisados pelo programa MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) com as configurações padrão para obtenção da identificação bacteriana. A identificação direta de patógenos causadores de mastite a partir de amostras de leite foi possível em contagem $\geq 10^6$ ufc/mL para *S. aureus*, $\geq 10^7$ ufc/mL para *E. coli*, e $\geq 10^8$ ufc/mL para *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*. No experimento 2, o objetivo foi avaliar o efeito da pré-incubação de amostras de leite de quartos mamários com mastite subclínica sobre a eficácia da identificação sem cultivo de patógenos causadores de mastite por MALDI-TOF MS. Foram selecionados 2 rebanhos leiteiros para coletas de leite de quartos mamários de todas as vacas em lactação. As amostras de leite foram submetidas às análises de: a) cultura microbiológica; b) pré-incubação seguida de identificação por espectrometria de massas diretamente do leite; c) contagem bacteriana total (CBT). Para a realização da CBT, as amostras de leite foram submetidas à citometria de fluxo; e para a identificação direta de patógenos causadores de mastite a partir do leite, as amostras foram submetidas ao desnate por centrifugação (10.000 Xg por 10 minutos), e pré-incubação a 37°C por 12 horas. Posteriormente, as amostras foram processadas com o uso do kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics) e submetidas ao protocolo de lise bacteriana para posterior análise por MALDI-TOF MS. Do total de 810 amostras de leite analisadas por

cultura microbiológica (método referência), 347 apresentaram crescimento bacteriano, sendo 305 identificadas como agentes de interesse na identificação direta pelo método MALDI-TOF MS: *Staphylococcus* coagulase negativa (n=191), *S. aureus* (n=31), *S. agalactiae* (n=42), *S. uberis* (n=37), *S. dysgalactiae* (n= 4). Sendo assim, 305 amostras foram analisadas pelo método de identificação direta MALDI-TOF MS, a qual apresentou baixa sensibilidade quando comparado com a cultura microbiológica (método referência): *Staphylococcus* coagulase negativa (14,08%), *S. agalactiae* (15,25%), *S. uberis* (1,69%) *S. aureus* (6,12%) e *S. dysgalactiae* (0%). A pré-incubação de amostras de leite não aumentou a sensibilidade de identificação direta de microrganismos causadores de mastite pelo método MALDI-TOF MS.

Palavras-chave: Mastite. Espectrometria de massas. MALDI-TOF MS. Bactéria. Leite.

ABSTRACT

BARREIRO, J. R. **Direct identification of microorganisms causing mastitis by mass spectrometry.** [Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por espectrometria de massas]. 2015. 87f. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The purpose of the present study was to evaluate the technique of mass spectrometry by desorption / ionization assisted laser array time-of-flight (MALDI-TOF MS) for the direct identification in milk samples (no microbiological culture) of mastitis causing bacteria. Therefore, we carried out two experiments (1 and 2). In experiment 1, we determined the diagnostic sensitivity of MALDI-TOF MS technique for the direct identification in milk samples of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Escherichia coli*. Experimental contamination of *S. aureus*, *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *E. coli* in samples of milk to a concentration of 10^3 - 10^9 cfu/mL were performed. The contaminated milk samples were processed using kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics) and subjected to bacterial lysis protocol for analysis by MALDI-TOF MS. Mass spectra were collected in the mass range of 2000-20000 m/z and were analyzed by MALDI Biotyper 3.0 software (Bruker Daltonics) with default settings to obtain bacterial identification. Direct identification of mastitis causing pathogens from milk samples was possible at $\geq 10^6$ cfu/mL for *S. aureus*, $\geq 10^7$ cfu/mL for *E. coli* and $\geq 10^8$ cfu/mL for *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis*. In experiment 2, the objective was to evaluate the effect of pre-incubation of milk samples from mammary quarters with subclinical mastitis on the effectiveness of identification without cultivation, of mastitis-causing pathogens by MALDI-TOF MS. We selected mammary quarter milk samples from all lactating cows on two dairy herds. The milk samples were subjected to analyzes of: a) microbiological culture; b) pre-incubation followed by identification by mass spectrometry directly from milk; c) total bacterial count (TBC). Flow cytometry was used to determine TBC and; to directly identify the mastitis-causing pathogens from milk, fat was separated by centrifugation (10,000 Xg for 10 minutes) and; samples were pre-incubated at 37°C for 12 hours. Subsequently, the skim milk samples were submitted to kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics) and to the bacterial lysis protocol for analysis by MALDI-TOF MS. A total of 810 milk samples were analyzed by microbiological culture (reference method), of which 347 showed bacterial growth. Considering all culture positive samples 305 were identified as agents of interest in the direct identification by MALDI-TOF MS method: coagulase negative staphylococci (n = 191), *S.*

aureus (n = 31), *S. agalactiae* (n = 42), *S. uberis* (n = 37) and *S. dysgalactiae* (n = 4). Therefore, 305 samples were directly identified by MALDI-TOF MS, which presented low sensitivity when compared to microbiological culture (Reference method): coagulase-negative staphylococci (14.08%), *S. agalactiae* (15.25 %), *S. uberis* (1.69%), *S. aureus* (6.12%) and *S. dysgalactiae* (0%). Pre-incubation of milk samples did not increase the sensitivity of the MALDI-TOF MS method directly identify mastitis-causing microorganisms.

Key words: Mastitis. Mass spectrometry. MALDI-TOF MS. Bacterium. Milk.

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.....	30
Figura 2 -	Representação esquemática da ionização por fonte de MALDI	33
Figura 3 -	Esquema do protocolo utilizado para a preparação das amostras de leite experimentalmente contaminadas	42
Figura 4 -	Relatório de resultados fornecido pelo programa computacional Biotyper após coleta e processamento dos espectros de massas	47
Figura 5 -	MALDI-TOF MS: espectros na faixa de 4.000 a 22.000 m/z, obtidos após a contaminação experimental do leite com (a) 10^3 , (b) 10^4 , (c) 10^5 , (d) 10^6 , (e) 10^7 (f) 10^8 , e (g) 10^9 de <i>Escherichia coli</i> ufc/mL.....	48
Figura 6 -	MALDI-TOF MS: espectros na faixa de 2.000 a 20.000 m / z, obtidos após a contaminação experimental de leite com (a) 10^3 , (b) 10^4 , (c) 10^5 , (d) 10^6 , (e) 10^7 (f) 10^8 , (g) 10^9 de <i>Staphylococcus aureus</i> ufc/mL e (h) espectro de colônia pura de uma ATCC <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Figura 7 -	Sequência do protocolo utilizado para a preparação das amostras de leite após o desnate e incubação:	60
Figura 8 -	Resultados de identificação pelo MALDI Biotyper: mostrando que a mesma amostra apresentou repetibilidade na identificação, porém com escore abaixo de 2,0.....	64
Figura 9 -	MALDI-TOF: espectros na faixa de 2.000 a 20.000 m / z, obtidos após a contaminação experimental de leite integral (a) <i>Staphylococcus aureus</i> diretamente do leite, (b) <i>Staphylococcus aureus</i> colônia de ATCC, (c) amostra sem crescimento (somente leite)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Médias de escores adquiridos pelo programa Biotyper em relação as diluição das cepas estudadas.....	46
Tabela 2 -	Isolamento de agentes etiológicos da mastite em amostras por quarto mamário bovino.....	61
Tabela 3 -	Microrganismos identificados através de isolados bacterianos por MALDI-TOF MS e Cultura Microbiológica	62
Tabela 4 -	Relação de protocolos testados para otimizar a identificação microbiológica direta do leite	64
Tabela 5 -	Microrganismos identificados direto do leite por MALDI-TOF MS e microbiológico padrão	66
Tabela 6 -	Efeito da contagem bacteriana sobre o escore de identificação do Biotyper de agentes causadores de mastite ¹	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAMP	Christie, Atkins-Peterson
CCS	Contagem de células somáticas
CCS	Contagem de Células Somáticas
Cdna	Complementary deoxyribonucleic acid
CHCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinamínico
CMT	Califórnia Mastitis Test
CMT	Califormia Mastitis Test
DESI	Ionização por Dessorção de Spray de Elétrons
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EI	Ionização Eletrônica
ESI	Ionização por Spray de Elétrons
FAB	Ionização por Bombardeamento Rápido
IIM	Infecção intramamária
Kg	Kilogramas
KOH	Hidróxido de Potássio
m/z	massa/carga
MALDI	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
mL	Mililitros
MS	Espectrometria de massas
NMC	National Mastitis Council
PCR	Reação em Cadeia pela Polimeras
RNA	Ácido ribonucleico
SCN	Staphylococcus coagulase negativa
TOF	Tempo-de-vôo
ufc	Unidade formadora de colônia
µL	Microlítro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	21
2.1	CARACTERIZAÇÃO DA MASTITE BOVINA	21
2.2	PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DA MASTITE BOVINA	23
2.3	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A MASTITE.....	26
2.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS: CONCEITOS E APLICAÇÕES	29
2.5	IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE MICRORGANISMOS	34
2.6	COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	38
3	IDENTIFICAÇÃO DIRETA DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE POR MALDI-TOF MS	40
3.1	INTRODUÇÃO.....	40
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.1	Cepas Bacterianas e Contaminação bacteriana experimental do leite	42
3.2.2	Protocolo de preparação de amostras de leite para a identificação direta de microrganismos causadores de mastite por MALDI-TOF MS	43
3.2.3	Obtenção de espectros de massas	44
3.2.4	Processamento dos dados	45
3.3	RESULTADOS	46
3.4	DISCUSSÃO.....	49
3.5	CONCLUSÃO.....	50
4	EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO SOBRE A IDENTIFICAÇÃO DIRETA DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE POR MALDI-TOF MS	54
4.1	INTRODUÇÃO.....	54
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.2.1	Seleção de rebanhos e coleta de amostras de leite	55
4.2.2	Cultura microbiológica (método de referência)	56
4.2.3	Identificação de microrganismos causadores de mastite a partir de colônia por MALDI-TOF MS	56
4.2.5	Pré-incubação e identificação de microrganismos causadores de mastite a partir do leite por MALDI-TOF MS	58

4.2.6	Análise Estatística	60
4.3	RESULTADOS	61
4.3.1	Cultura microbiológica	61
4.3.2	Identificação de microrganismos causadores de mastite a partir de colônia por MALDI-TOF MS.....	62
4.3.3	Identificação direta de microrganismos causadores de mastite a partir do leite por MALDI-TOF MS sem cultivo microbiológico	63
4.5	CONCLUSÃO.....	72
5	CONCLUSÃO GERAL	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	ANEXO A.....	87

1 INTRODUÇÃO

O leite é uma mistura complexa e nutritiva composta de gordura, proteínas e outros elementos, os quais se encontram em suspensão ou solubilizados em água (GIANOLA et al., 2004). A qualidade do leite está diretamente relacionada com a saúde, a alimentação e o manejo das vacas, assim como, o manejo adequado dos equipamentos e os utensílios utilizados durante a ordenha, a refrigeração e o transporte até a indústria. Todos esses fatores influenciam a composição original e as características sensoriais do leite (DINGWELL et al., 2004).

A mastite bovina é uma doença de grande importância epidemiológica e econômica, a qual pode se manifestar na forma subclínica ou clínica. A mastite ocorre em resposta à infecção intramamária (IIM) causada principalmente por bactérias, mas pode ser também causada por fungos ou algas (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

O diagnóstico da mastite clínica pode ser feito pela observação de sintomas clínicos, como a inflamação do úbere, a presença de secreção láctea com grumos, sangue, pus, ou outras alterações visuais. O diagnóstico clínico da mastite é extremamente simples, visto que, qualquer vaca em um ou mais quartos secretando leite com alterações de aspecto apresenta mastite. Entretanto, mastites subclínicas podem reduzir a capacidade funcional da glândula mamária, causando prejuízos econômicos e não são diagnosticadas pelo exame clínico: inspeção do animal, leite e palpação (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

A maioria dos casos de mastite ocorre na forma subclínica, ou seja, sem sinais clínicos evidentes. Para diagnosticar a mastite subclínica, é necessário o uso de métodos diagnósticos complementares baseados no conteúdo celular ou em alterações bioquímicas da composição do leite. Além disso, para identificar o agente causador da mastite, é necessária a cultura microbiológica e isolamento do agente etiológico, visando estabelecer métodos de tratamento, estratégias de controle e profilaxia adequados (PANKEY; DRECHSLER; WILDMAN, 1991). O isolamento de cultura pura com o crescimento superior a dez ufc/mL é necessário para realizar o diagnóstico da IIM. O número de amostras de leite necessário para o diagnóstico da IIM está diretamente relacionado ao tipo de microrganismo causador da infecção (DOHOO et al., 2011).

A técnica de espectrometria de massas (MS) com fonte de ionização/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* de proteínas ribossomais, devido à capacidade da técnica para detectar moléculas de massas elevadas presentes em misturas complexas de biomoléculas em sua forma monoprotônica, 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 a massa e cargas, sendo que cada íon corresponde a uma espécie molecular desprendida da superfície celular durante a dessorção/ionização a laser (HOLLAND et al., 2006; SIUZDAK, 2006).

A técnica de MALDI-TOF MS permite a reprodutibilidade de espectros, um fator crítico para a 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 de espectro de massas (obtido em poucos segundos), com os de referência de cepas conhecidas, utilizando-se o 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.

A utilização de MALDI-TOF MS é considerada atualmente revolucionária em microbiologia humana, pois possibilitou alta confiabilidade para uso em diagnóstico clínico de microrganismos causadores de doenças (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 da microbiologia veterinária, essa técnica apresentou resultados satisfatórios, uma vez que foi possível a identificação de patógenos causadores de mastite em colônias isoladas após cultura microbiológica, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* (BARREIRO et al., 2010); e espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (TOMAZI et al., 2014) e *Corynebacterium spp.* (GONÇALVES et al., 2014). Adicionalmente, esta técnica pode ter aplicabilidade no âmbito ambiental, alimentício e industrial, ou seja, pode ser utilizada em qualquer setor que exija controle microbiológico e que os resultados confiáveis sejam requeridos em curto espaço de tempo.

No entanto, a identificação de microrganismos pelo método MALDI-TOF MS requer uma etapa de cultivo microbiológico para obter colônias bacterianas para a obtenção de espectros. Em alguns casos, esta tecnologia também pode ser utilizada para analisar espécimes clínicos para a identificação bacteriana direta, como quando usada para diagnosticar microrganismos diretamente em amostras clínicas de sangue (MOUSSAOUI et al., 2010; MEEUX et al., 2012), urina (FERREIRA et al., 2010) e fluido cérebro-espinhal

(SEGAWA et al., 2014). No entanto o uso desta técnica para identificação direta de agentes causadores de mastite em amostras de leite ainda não foi determinada.

O objetivo deste estudo foi avaliar a identificação direta de bactérias causadoras de mastite a partir de amostras de leite por espectrometria de massas com o uso do MALDI-TOF MS. Foram delineados 2 experimentos, sendo que para o experimento 1 o objetivo específico foi determinar a sensibilidade diagnóstica da técnica MALDI-TOF MS para a identificação direta (sem cultura microbiológica) de bactérias causadoras de mastite no leite, em amostras experimentalmente contaminadas. O objetivo específico do experimento 2 foi avaliar o efeito da pré-incubação de amostras de leite de rebanhos comerciais e a identificação direta de patógenos causadores de mastite por MALDI-TOF MS das amostras de leite pré-incubadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MASTITE BOVINA

A mastite (do grego *mastos*) bovina é uma inflamação da glândula mamária e na maioria das vezes não apresenta sinais clínicos de processo inflamatório, no entanto, causa elevados prejuízos econômicos. A mastite normalmente ocorre em resposta à infecção intramamária, causada principalmente por bactérias, e em menor frequência por micoplasmas, fungos e algas (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002; PEELER et al., 2003; SANTOS et al., 2007). Mais de 80 diferentes espécies de microrganismos foram identificadas como agentes causadores de mastite bovina, sendo que as mais frequentemente isoladas foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium sp.*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (HOLTENIUS, 2004).

As infecções intramamárias (IIM) podem apresentar-se sob a forma clínica ou subclínica. A forma clínica apresenta sinais evidentes de inflamação da glândula mamária tais como edema, aumento de temperatura, dor e alterações das características do leite; e pode apresentar sintomas sistêmicos, como aumento da temperatura corporal, desidratação, diminuição do consumo de alimentos e redução de leite. Já na forma subclínica, não há mudanças visíveis nas características do leite ou do úbere, porém, ocorre redução de leite e alteração da composição do leite, como diminuição nos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio; e o aumento da contagem de células somáticas (CCS) e proteínas séricas (CHANG et al., 2004; BRADLEY, 2002). A mastite subclínica é a principal forma de mastite presente nas fazendas leiteiras, a qual acomete entre 20-50% das vacas em lactação (PITKALA et al., 2004). Portanto, as infecções intramamárias, clínicas ou subclínicas, representam um grande problema para a cadeia agroindustrial do leite (LESLIE; PETERSSON-WOLFE, 2012).

Uma vez acometido, o quarto mamário a infecção pode evoluir para a cura espontânea, ou para um quadro crônico, tornando-se necessária a identificação do agente causador para adequar as medidas de controle e tratamento (OLIVER et al., 2004). A colonização da glândula mamária bovina por bactérias patogênicas resulta em alterações da composição do leite. Inicialmente, ocorrem aumentos da contagem de bactérias patogênicas, seguido pelo aumento marcante no número de células somáticas (SANTOS et al., 2007).

O processo de IIM inicia-se quando os microrganismos invadem a glândula mamária pelo 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 a 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, assim como alterações da permeabilidade vascular e outros sinais de inflamação. Podem-se descrever quatro fatores principais que influenciam a ocorrência da mastite: a resistência da vaca, o agente patogênico, o ambiente e o estágio de lactação (SANTOS; FONSECA, 2007).

A realização do diagnóstico da IIM pode ser baseada em amostras com isolamento de apenas um microrganismo, com mais do que dez colônias, e com duas ou mais coletas consecutivas do microrganismo de amostras coletadas semanalmente. A interpretação de resultados microbiológicos baseados em amostras em duplicata resulta em uma alta sensibilidade da metodologia de identificação. Entretanto, amostras em triplicata fornecem a melhor combinação de sensibilidade e especificidade, porém comparado a amostras individuais, fornecem apenas um pequeno aumento na especificidade e pouco ou nenhum aumento na sensibilidade. Portanto, a IIM pode ser definida pela presença de um microrganismo na glândula mamária, determinado pelo isolamento puro do microrganismo causador da infecção e com contagem de colônias superior a 10 (ufc/mL) (DOHOO et al., 2011).

A mastite bovina é a doença mais importante da produção leiteira e está diretamente ligada à lucratividade da cadeia agroindustrial do leite, resultando em perdas econômicas significantes que estão associadas com a redução na produção de leite (70%), custos com tratamentos e serviço do médico veterinário (7%), descarte de leite durante o período de tratamento (9%), mão-de-obra (1%) e descarte de animais (14%) (SHARMA et al., 2012). A ocorrência de mastite pode resultar na substituição de células epiteliais do tecido secretor, os alvéolos, por tecido conjuntivo, ocasionando redução da produção de leite, pois para células somáticas alcançarem o interior dos alvéolos e combater as bactérias, passam por entre duas células secretoras de leite o que pode comprometer a atividade destas células (SOMMERHAUSER et al., 2003).

Nos últimos anos houve um grande progresso com o objetivo de reduzir os casos de mastite bovina (BLOWEY; EDMONDSON, 2010), principalmente com a implementação do programa de 5 pontos (ZADOKS et al., 2002), e depois com o programa de 10 pontos (NMC, 2004), os quais consistem de práticas de manejo eficazes para o controle dos

patógenos causadores de mastite. 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 vacas com mastite crônica e controle ambiental. O pré-*dipping* previne novas infecções intramamárias causadas por patógenos ambientais, durante o período de ordenha, já a terapia de vaca seca, reduz a exposição da vaca ao agente. O aumento da resistência da vaca (por meio da dieta, vacinação e prevenção ao estresse), diminuem a incidência de mastite causada por patógenos ambientais (SARGEANT et al., 2001).

2.2 PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DA MASTITE BOVINA

As bactérias são os principais agentes etiológicos da mastite bovina. Segundo o National Mastitis Council (NMC, 2004), os agentes causadores são classificados como patógenos primários e secundários. No grupo de patógenos primários encontram-se *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*; *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* e *Mycoplasma bovis*. Os patógenos primários, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*, são responsáveis pela redução da qualidade do leite (BRADLEY; GREEN, 2005). Já o *Staphylococcus coagulase negativa* e *Corynebacterium sp.* foram descritos como patógenos secundários (SCHUKKEN et al., 2009). Entretanto, não existe consenso sobre uma definição universal a respeito da classificação de patógenos primários ou secundários. Geralmente, uma combinação de alta prevalência, a natureza contagiosa e o potencial em causar infecções clínicas, bem como os custos provindos da infecção que determinam se os patógenos são considerados como primários na epidemiologia da mastite (WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997).

Com base na forma de transmissão, os microrganismos causadores de mastite podem ser classificados em dois grupos; os patógenos contagiosos ou ambientais. Os patógenos contagiosos são aqueles adaptados à sobrevivência no interior da glândula mamária, caracterizados pela alta incidência da forma subclínica da doença, persistentes ou com episódios clínicos intermitentes de baixa incidência (BRADLEY, 2002). A mastite contagiosa é tipicamente associada com diminuição de produção de leite e aumento da CCS do tanque, sendo que *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são exemplos de patógenos

contagiosos. A principal fonte de patógenos ambientais é o ambiente em que a vaca vive, com maior prevalência das bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella spp.*) e algumas espécies de *Streptococcus* (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*) (RUEGG, 2012; SCHUKKEN et al., 2012). Os patógenos ambientais podem ser considerados de oportunistas por invadirem a glândula mamária sem conseguir se adaptar em seu interior, o que leva à imediata resposta inflamatória (BRADLEY, 2002). Por isso, esta forma de IIM está associada com infecção de curta duração que pode resultar em redução da produção de leite e até mesmo na morte da vaca (SCHUKKEN et al., 2012). No entanto, a classificação de patógenos contagiosos ou ambientais se difundiu antes do surgimento das metodologias de identificação molecular de microrganismos. O uso de *fingerprintings* de DNA e outras metodologias moleculares demonstraram resultados controversos quanto à classificação da mastite pelo comportamento ambiental ou contagioso dos microrganismos (RUEGG, 2012).

A infecção causada por *Staphylococcus aureus* tem apresentação principalmente na forma subclínica, condição que contribui para sua habilidade de estabelecer infecções intramamárias crônicas (BANNERMAN et al., 2004). Além disso, *Staphylococcus 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 reduzida. Tratamentos de maior duração foram associados a maiores chances de cura, porém é recomendado avaliar o custo-benefício de tal tratamento, para maximizar a cura, e o tratamento durante a lactação deve ser realizado em animais jovens com infecção recente e com apenas um quarto do úbere comprometido (HENSEN et al., 2000). Estudos de impacto econômico da mastite sobre a cadeia leiteira sugerem que a IIM causada por *Staphylococcus aureus* resulta em perdas de baixa produtividade e redução da qualidade do leite por elevada contagem de células somáticas (HOGEVEEN; HUIJS; LAM, 2011).

Os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) podem ser isolados na pele dos tetos e podem infectar a glândula mamária. As infecções causadas por este grupo de patógenos resultam em aumento da CCS, porém não alteram a produção e composição do leite (TOMAZI et al., 2014). Outros estudos classificam tais microrganismos como patógenos de impacto limitado sobre a produção e a CCS (PARADIS et al., 2010). Vacas adultas e novilhas apresentam alta prevalência de mastite causada por esse tipo de agente, o que tem despertado o interesse em práticas de controle e tratamento, principalmente em rebanhos de média CCS (SUPRÉ et al., 2011). Dezesesseis espécies de SCN já foram isoladas de amostras de leite de vacas com mastite (CAPURRO et al., 2009). As espécies mais frequentemente isoladas nas

IIM são: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus xylosus* (THORBERG et al, 2009).

A infecção intramamária causada por *Streptococcus agalactiae* apresenta-se frequentemente na forma subclínica, com significativo aumento da CCS. Este agente é uma das espécies de *Streptococcus* mais comumente identificadas e tem sido detectada em 48% de amostras de leite de tanque (ZADOKS et al., 2011). Entretanto, a mastite causada por essa bactéria apresenta excelente resposta ao tratamento com antibiótico intramamário durante a lactação. Vacas infectadas por *Streptococcus agalactiae* apresentaram taxa de cura maior do que vacas infectadas por outros patógenos (WILSON et al., 1999). Vacas com mastite causada por esse patógeno tornam-se reservatórios do agente no rebanho, e a ordenha é considerada o momento de maior risco de transmissão da bactéria (BAL et al., 2010). Devido à alta taxa de cura seguida de tratamento do *Streptococcus agalactiae*, alguns produtores optam por erradicar o patógeno do rebanho. O programa de controle de *Streptococcus agalactiae* é baseado em cultura microbiológica e tratamento com antibiótico em todos os quartos infectados pelo patógeno (RATO et al., 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 (WYDER et al., 2011). Este patógeno pode ser isolado a partir de glândulas mamárias durante o período de lactação e de vacas não lactantes (REINOSO et al., 2011). Já o *Streptococcus dysgalactiae* tem maior frequência de ocorrência no início da lactação, no entanto, podem tornar-se persistentes, o que resulta em aumento da CCS e possibilidade de se tornarem fontes de novas infecções (RATO et al., 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 *Streptococcus* (SANTOS et al., 2007).

Mesmo sendo considerado um agente secundário, *Corynebacterium spp.* tem sido frequentemente isolado de casos clínicos e subclínicos, com aumento moderado de CCS (SCHUKKEN et al., 2009). O canal do teto parece ser um dos locais principais de ocorrência desse agente, ainda que a infecção possa se localizar na cisterna da glândula, no entanto, sem

causar infecções intramamárias verdadeiras (BEXIGA et al., 2011). *Trueperella pyogenes*, que é uma reclassificação do gênero *Arcanobacterium*, é conhecida por causar mastites graves com extensa destruição do tecido mamário. Esse microrganismo é encontrado nas membranas e mucosas dos animais, mas age como patógeno oportunista causando infecções piogênicas (NAGIB et al., 2014).

As principais bactérias Gram negativas que causam mastite são *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. cuja apresentação ocorre principalmente na forma clínica e aguda. A destruição da bactéria pelo sistema imune causa a exposição de fatores estimulantes da inflamação que desencadeiam sinais clínicos típicos 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 pode ocorrer bacteremia (WENZ et al., 2001). A *Escherichia coli*, é um dos mais frequentes patógenos que causam mastite clínica. No entanto, sintomas clínicos variam muito, e as infecções podem ser persistentes. O tratamento com agentes antimicrobianos podem, eventualmente, eliminar a infecção bacteriana, mas a recuperação total da glândula pode levar um tempo maior do que a recuperação clínica (BLUM; HELLER; LEITNER, 2014).

2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A MASTITE

O diagnóstico microbiológico e a identificação dos agentes causadores de mastite em amostras de leite é o método padrão de monitoramento das mastites contagiosas, entretanto, apresenta algumas limitações como o tempo necessário para o diagnóstico, à identificação dos agentes e os procedimentos de conservação e transporte das amostras (SANTOS, 2006).

Existem vários métodos de identificação microbiana, todos eles com vantagens e desvantagens. Os métodos clássicos e tradicionais dependem de uma comparação bioquímica e fisiológica de características como: condições de crescimento; morfologia da colônia; características de crescimento em meios seletivos; potencial para fermentar açúcares; reações bioquímicas específicas; características metabólicas, antigênicas e patogênicas; susceptibilidade aos antibióticos (READ, 2005). As análises microbiológicas do leite são indispensáveis para a adoção de medidas de controle e tratamento da IIM (BRITTEN et al., 2012).

Ao determinar as características de um microrganismo, o isolado deve estar em cultura pura, para que todas as células bacterianas na população sejam idênticas. O número de amostragem necessária para a confirmação do diagnóstico da IIM está diretamente relacionado ao microrganismo causador da infecção (DOHOO et al., 2011). Um exemplo é a IIM causada por *Staphylococcus aureus*, que apresenta alta liberação do patógeno em glândulas recentemente infectadas, porém com contagem bacterianas muito baixas com o decorrer da infecção, pode ocorrer diagnósticos falso-negativos (BRITTEN, 2012). Assim uma forma de evitar falso-negativos, devido à baixa contagem de bactérias no leite seria a repetições de amostras (DUHOO et al., 2010). Existem disponíveis uma extensa lista de meios comerciais, e os tipos utilizados depende de muitos fatores. Esses fatores incluem considerações sobre a origem do material a ser analisado, a espécie de interesse e as necessidades nutricionais dos organismos. Meios mais específicos podem conter compostos químicos ou substâncias que inibem ou acentuam o crescimento microbiano (NMC, 2004). A identificação microbiana por ser considerado um teste pouco viável como exame de rotina na fazenda (URECH et al., 1999).

O aumento da 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 <100.000 cel/ml, enquanto a CCS de um quarto infectado é geralmente >200.000 cel/ml, indicando a ocorrência de mastite subclínica ou que o quarto está se recuperando da infecção (PYORALA, 2003).

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 et al. (2002) mencionaram que microrganismos contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *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 a 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. Os resultados são expressos em

cinco escores: negativo, traços, um, dois e três sinais positivos, os quais apresentam correlação com a contagem de células somáticas em vacas da raça Holandesa (ESSLEMONT; KOSSAIBATI, 2002).

Quanto aos tipos de amostragens do leite é possível a realização de exames microbiológicos por quartos mamários, quartos com CMT positivos ou de altas CCS, casos clínicos, amostras ao acaso ou amostra representativa de rebanho (leite de tanque). As amostragens por quarto mamário e leite de tanque são as mais comumente utilizadas. Apesar da amostragem por quarto apresentar custos elevados, o conhecimento do nível e do tipo das infecções podem justificar o investimento, diferentes das amostras de tanque que fornecem informações limitadas a respeito das infecções do rebanho (BRITTEN, 2012).

As técnicas moleculares são ferramentas importantes para a análise de microrganismos dos alimentos e outras substâncias biológicas. Estas técnicas fornecem meios para identificação de uma ampla gama de agentes em um único teste. Os métodos moleculares variam de acordo com o poder discriminatório, reprodutibilidade, e facilidade de utilização e de interpretação (BABALOLA, 2003).

O organismo de interesse pode ser detectado diretamente através de ensaios de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) em tempo menor do que a cultura convencional. A reação em cadeia da polimerase 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*), sendo assim, uma técnica com alta especificidade e aplicabilidade. 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 existem varias técnicas descritas com essa finalidade, utilizando substâncias e estratégias diferentes (MESQUITA et al., 2001).

O sequenciamento de genes (16S rRNA) é uma metodologia eficaz de identificação das espécies de *Corynebacterium spp.* isolados do leite bovino (WATTS et al., 2000; GONÇALVES et al., 2014); e também espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isolados do leite bovino foram diferenciados genotipicamente pela técnica de PCR, associado com o polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (RFLP) (TOMAZI et al., 2014). Assim, como é possível a detecção do *Staphylococcus aureus* em

amostras de leite por meio de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) (BOTARO et al., 2013). Um número significativamente maior de patógenos causadores de mastite foi detectado de amostras de leite por PCR do que pela cultura bacteriana (92% e 70%, respectivamente), o uso da tecnologia de PCR pode auxiliar no diagnóstico rápido da mastite, no entanto, não existe até o momento nenhum método para distinguir de forma segura quais destes resultados positivos da PCR são clinicamente relevantes (KEANE et al., 2014).

Além destas, uma importante ferramenta vem sendo estudada e aplicada para a detecção rápida de microrganismos causadores de mastite, é a técnica de MALDI-TOF MS (BRAGA et al., 2013; BARREIRO et al., 2010). Com esta tecnologia foi possível identificar espécies de *Corynebacterium spp.* (GONÇALVES et al., 2014) e *Staphylococcus coagulase negativa* (TOMAZI et al., 2014) de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.

2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS: CONCEITOS E APLICAÇÕES

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite a identificação de compostos químicos 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, na razão massa/carga (m/z). Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por m/z . Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula e seus fragmentos, é possível inferir sobre a composição química, e com isso determinar a estrutura (SOUZA, 2008).

Devido à elevada sensibilidade, exatidão e resolução proporcionadas por essa técnica na identificação de proteínas, a MS pode ser considerada a principal ferramenta analítica no campo da proteômica. Métodos tradicionais exigem grande volume 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; os analisadores de massas são parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com a 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

Fonte: WATSON; SPARKMAN, 2007 adaptado por BARREIRO, 2015.

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-se 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 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 (APCI), 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.

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 (proteína ribossomal) desprendido da superfície celular durante a dessorção a laser (HOLLAND et al., 2006; SIUZDAK, 2006). Utilizando esse método, bactérias podem ser identificadas comparando-se 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 auxilia 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 com 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).

Figura 2 - Representação esquemática da ionização por fonte de MALDI

Fonte: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/maldi-mechanism.gif> adaptado por BARREIRO, 2015.

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 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).

2.5 IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE MICRORGANISMOS

A espectrometria de massas tem se mostrado confiável para diferenciar enorme variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, as cianobactérias, fungos e protozoários em diferentes níveis taxonômicos (DICKINSON et al., 2004; DIECKMANN et al., 2005). Em relação à identificação microbiológica, a espectrometria de massas se baseia na diferenciação de perfis proteicos bacterianos (LOONEN et al., 2012).

Técnicas de dessorção/ionização a laser, dessorção de plasma, e bombardeamento de átomos rápidos em espectrometria de massas foram aplicadas para a identificação de microorganismos na medicina humana. A técnica de MALDI-TOF MS apresenta diversas vantagens em relação a outras técnicas de ionização, devido à sua sensibilidade, eficiência de ionização, e a capacidade de ionizar moléculas de alto peso molecular sem fragmentá-las (EASTERLING, et al., 1998; CAROFF; DEPRUN; KARIBIAN, 1993; ZARROUK et al., 1997).

A identificação rápida das espécies patogênicas e não patogênicas de microorganismos é de grande importância para a área de saúde humana e animal, na prevenção contra armas biológicas e contra o bioterrorismo, assim como aplicações em bioengenharia, e a indústria farmacêutica (TANG; STRATTON, 2006). A MS é um método rápido e sensível para a identificação e tipificação de microorganismos. 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).

Métodos microbiológicos tradicionais com base na morfologia e nas características bioquímicas são demorados (em média três a sete dias) e laboriosos. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos rápidos e eficazes para identificação das espécies bacterianas se faz necessário. A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica, que vem se tornando rotineira em estudos biológicos. Essa técnica constitui-se em uma alternativa aos métodos tradicionais para identificação bacteriana. Ilina et al. (2009) utilizaram a

espectrometria de massas para identificação de espécies de *Neisseria* e Fujita et al. (2005a,b) empregaram a técnica para identificação de espécies de Micobactérias.

Vários métodos manuais e automatizados baseados nas características fenotípicas têm sido desenvolvidos para a identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus*. No entanto, estes sistemas têm 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. A técnica de MALDI-TOF MS foi usada para a identificação de 152 cepas de *Staphylococcus* de origem clínica e ambiental. Neste estudo, foi validada a aplicação do programa computacional Biotyper (Bruker Daltonics, EUA) para a identificação rápida dos “*fingerprintings*” (proteínas ribossomais) 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 (DUBOIS et al., 2010).

A aplicação do MALDI-TOF MS para a identificação em nível de espécie foi avaliada em vinte e três cepas de referência de bactérias 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, o que indica que os íons selecionados puderam ser incorporados ao banco de dados do Biotyper (Bruker Daltonics, USA) para a identificação rápida de espécies de SCN (CARBONELLE et al., 2007). Hettick et al. (2006) relataram a discriminação e a caracterização de bactérias por MALDI-TOF MS, e a técnica foi usada também para quimiotaxonomia bacteriana (CLAYDON et al., 1996; SMOLE et al., 2002; RUELLE et al., 2004).

Na microbiologia veterinária, a técnica de MALDI-TOF MS foi avaliada em isolados bacterianos de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica. Foram identificadas pelo método microbiológico padrão e MALDI-TOF MS, os patógenos identificados no estudo foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (BARREIRO et al., 2010). Estudos envolvendo a identificação de espécies de *Corynebacterium spp.* através de colônias isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica foi possível através da técnica de MALDI-TOF MS, sendo que *Corynebacterium bovis* foi a espécie mais frequentemente identificada. Os resultados de identificação foram equivalentes em 95% dos isolados, quando comparado com

a técnica de sequenciamento de genes 16S rRNA (GONÇALVES et al., 2014). Espécies de SCN também foram identificadas de colônias isoladas de amostras de leite, sendo que o método foi sensível (95,37%) e a espécie mais prevalente em vacas com mastite subclínica foi o *Staphylococcus chromogenes* (TOMAZI et al., 2014).

O uso mais comum de MALDI-TOF MS em laboratórios de bacteriologia clínica é para a identificação de bactérias cultivadas em meio sólido. Têm-se relatado que as porcentagens de gêneros identificados corretamente foram de 97% -99% e os de espécies 85% -97% ao testar rotineiramente bactérias isoladas utilizando o Sistema Bruker Biotyper MALDI-TOF MS (PATEL, 2013).

A espectrometria de massas representa uma revolução na identificação rápida de bactérias e fungos na microbiologia clínica. A MALDI-TOF MS foi aplicada diretamente em amostras de sangue para a rápida identificação de patógenos, levando a reduções no tempo de resposta e potencialmente benéficos aos pacientes. O desenvolvimento de um kit de extração comercialmente disponível (Bruker Sepsityper) para utilização com o MALDI-TOF MS e o Biotyper (Bruker) facilitou o processamento necessário para a identificação de agentes patogênicos diretamente a partir de amostras de sangue (LAGACÉ-WIENS et al., 2012; MEEEX et al., 2012; PROD'HOMM et al., 2010).

Foi avaliada a identificação direta de microrganismos anaeróbicos em amostras de sangue usando o MALDI-TOF MS, após extração bacteriana por meio de dois métodos diferentes: MALDI Sepsityper kit (Bruker) e uma lise por saponina. No total, 107 culturas monobacteriais e seis culturas polimicrobianas de 77 diferentes pacientes foram incluídas no estudo. Entre as culturas monomicrobiana, foram identificados até o nível de espécie 67% e 66% das bactérias com o kit MALDI Sepsityper e o método de saponina, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os dois métodos de extração. A identificação das espécies foi direta e inconclusiva para bactérias gram-positivas, já que apenas 58% e 52% deles foram identificados em nível de espécie com Sepsityper MALDI kit e o método de saponina, respectivamente. Os resultados de identificação de bacilos gram-negativos em nível de espécie com o MALDI Sepsityper kit e o método de saponina foram de 82,5% e 90% respectivamente. Observou-se diminuição no tempo da análise para obtenção de resultados para a identificação direta de microrganismos na cultura de sangue, em comparação com o método convencional, independentemente do método de extração (MEEEX et al., 2012).

Os atrasos de identificação de microrganismos são uma barreira para a seleção de antibiótico adequado na terapia antimicrobiana. Foi avaliado o uso do MALDI-TOF MS na

identificação de microorganismos em caldos de cultura de sangue positivo, em amostras monomicrobiana, sendo que o MALDI-TOF MS possibilitou identificação segura em nível de espécie, grupo e gênero em 91%, 5% e 2% dos casos, respectivamente, em 20 min. Em apenas 2% das amostras, o uso do MALDI-TOF MS não obteve nenhum resultado. Quando as culturas de sangue foram multibacterianas a identificação foi melhor com o uso específico à base dos resultados de coloração de gram. O MALDI-TOF MS é atualmente o método mais rápido para identificar microorganismos em amostras de sangue (FERRONI et al., 2010).

Patógenos do trato urinário foram submetidos à análise convencional e a identificação direta por MALDI-TOF MS, na qual 4 mL de urina foram centrifugados (2000 X g) para remover os leucócitos e, em seguida, centrifugados novamente (15.500 X g) para coletar bactérias. O sedimento foi lavado e, em seguida, aplicado diretamente à placa de MALDI-TOF MS. Duzentas e sessenta amostras de urina, detectadas como positivas pelo método convencional, foram analisadas pelo método MALDI-TOF MS, onde 220 destas amostras apresentaram crescimento bacteriano de $>10^5$ ufc/mL. As identificações de microorganismos foram coincidentes em nível de espécie em 91,8% e em nível de gênero em 92,7%. O microorganismo identificado com maior frequência foi a *Escherichia coli*. A MALDI-TOF MS identificou este microorganismo diretamente a partir de amostra de urina em 163 casos (94,2%). Os resultados mostraram que MALDI-TOF MS permite a identificação de bactérias diretamente a partir de urina infectada em um curto espaço de tempo, e especialmente quando as bactérias gram-negativas apresentaram elevadas contagens bacterianas (FERREIRA et al., 2010).

Esta tecnologia pode ser aplicada diretamente às amostras clínicas de urina e fluido cérebro-espinhal, evitando a necessidade de cultura. Para uma identificação bem sucedida do agente com o método MALDI-TOF MS contagens de aproximadamente 10^4 - 10^6 ufc do microorganismo são necessários na placa-alvo. Estes níveis podem ser alcançados em pacientes com infecção no trato urinário. Semelhante à urina, o fluido cérebro-espinhal é um alvo promissor para a identificação microbiológica pela metodologia MALDI-TOF MS (SEGAWA et al., 2014).

2.6 COMPOSIÇÃO DO LEITE

Entende-se por leite, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (MAPA, 2002). O leite é constituído por uma mistura complexa e heterogênia de substâncias orgânicas e inorgânicas sendo caracterizado como uma suspensão coloidal de micelas de caseína ligadas ao cálcio e potássio, uma emulsão de glóbulos de gordura e vitaminas lipossolúveis e uma solução de lactose, proteínas solúveis em água, sais minerais e vitaminas hidrossolúveis (SANTOS; FONSECA, 2007).

O processo de síntese e secreção do leite envolve o suprimento de precursores a partir do sangue, da capacidade de captação dos precursores, da sua conversão em componentes do leite e da remoção do leite pela glândula mamária. A lactose é o principal carboidrato (dissacarídeo composto por moléculas de glicose e galactose) e é o responsável pelo volume do leite produzido, pela sua participação no controle da pressão osmótica da glândula mamária. O proprionato de origem da fermentação microbiana, no rúmen, é considerado o principal precursor da glicose para glândula mamária, sendo um ácido graxo limitante para a síntese de lactose do leite. Algumas proteínas do leite não são sintetizadas na glândula mamária (albuminas séricas e imunoglobulinas) e são transportadas pelo sangue até o lúmen alveolar, mas a síntese da proteína do leite (tais como: caseína, beta-lactoglobulinas e alfa-lactoalbuminas), pelas células alveolares, ocorre a partir de aminoácidos do sangue. A caseína (fosfoproteína) é secretada em forma de micelas (agrupamentos de várias moléculas de caseína ligadas a íons fosfato de cálcio). A gordura do leite é composta na sua quase totalidade por triglicerídeos originários dos lipídeos da dieta ou mobilização de reservas corpóreas (ácidos graxos de cadeia longa) e, principalmente, de origem da síntese *de novo* nas células epiteliais da glândula mamária (ácidos graxos de cadeia curta), sendo o acetato e o butirato os precursores da gordura do leite (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; SANTOS; FONSECA, 2007).

As características químicas e microbiológicas do leite são de grande importância para a saúde pública, para o processamento tecnológico e para a qualidade dos produtos lácteos. No entanto, a composição do leite pode ser muito variável e depende de inúmeros fatores, tais como: raça, idade, saúde da glândula mamária, período de lactação, nutrição da vaca, época do ano e tipo de ordenha (DOBRANIC et al., 2008).

A mastite determina uma série de alterações tanto na composição e características físico-químicas como na produção do leite (OGOLA et al., 2007). Essas alterações são atribuídas pela mudança na permeabilidade vascular devido ao processo inflamatório, pela lesão do epitélio secretor responsável pela síntese de alguns componentes do leite e pela ação enzimática de células somáticas ou de microrganismos presentes na glândula (SHARIF; MUHAMMAD, 2008). Durante a infecção intramamária, acentuadas mudanças ocorrem nos tipos de proteínas do leite. A síntese de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina são reduzidas, mas o conteúdo de albumina sérica, concentrações de imunoglobulinas, lactoferrina e atividade enzimática aumentam devido à presença dos polimorfonucleares e da alteração da permeabilidade vascular (LINDMARK-MANSSONA et al., 2006). As mudanças na composição do leite dependem do grau da resposta inflamatória, da patogenicidade do agente etiológico e do tecido da glândula mamária afetado pela mastite (PYORALA, 2003).

3 IDENTIFICAÇÃO DIRETA DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE POR MALDI-TOF MS

3.1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença que causa perdas econômicas ao produtor de leite e à indústria. A forma mais comum desta doença é a apresentação subclínica (MALEK DOS REIS et al., 2011), na qual as vacas não apresentam sinais evidentes de inflamação, no entanto ocorre diminuição da produção e da qualidade do leite (HOVINEN; PYORALA, 2011). Devido à resposta inflamatória durante a mastite, ocorre aumento da contagem de células somáticas (CCS), assim como alterações das concentrações dos componentes do leite (proteína, gordura, lactose, minerais e enzimas). Estas alterações de composição do leite estão relacionadas com a redução da secreção de componentes que são sintetizadas na glândula mamária, o aumento da permeabilidade vascular e o fluxo de sangue para a glândula mamária (PYORALA, 2003). Além dos problemas relacionados com a saúde e a higiene do leite, as alterações de composição do leite pela mastite causam impacto negativo na produção e na qualidade de produtos lácteos (AULDIST; HUBBLE, 1998).

Na indústria láctea, métodos de rotina para o diagnóstico indireto da mastite subclínica e a qualidade do leite são baseados na CCS ou na detecção de alterações da composição bioquímica do leite. Para identificar as bactérias que estão presentes no leite, é necessário o isolamento do agente etiológico por métodos de cultura microbiológica ou de biologia molecular. O diagnóstico é de fundamental importância para o uso adequado de antibióticos, estratégias de controle e profilaxia (PANKEY et al., 1991). A identificação rotineira de microrganismos causadores de mastite depende principalmente de características fenotípicas, tais como a morfologia da colônia, potencial hemolítico e reações bioquímicas. Estes métodos são demorados e laboriosos (VIGUIER et al., 2009).

Os métodos clássicos para a identificação de microorganismos baseados no crescimento de colônias em diferentes meios e identificação morfológica ou bioquímica permaneceram inalterados por um longo tempo. Durante a última década, as técnicas baseadas em ensaios de DNA, principalmente com base no sequenciamento por PCR ou gene 16S rRNA, têm demonstrado ser úteis para superar algumas das limitações de procedimentos tradicionais

fenotípicos para a detecção e caracterização das espécies de bactérias, porém são demorados e laboriosos (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2011).

A técnica MALDI-TOF MS pode ser usada para identificação rápida de espécies bacterianas isoladas de amostras biológicas (SENG et al., 2009; SENG et al., 2010); e de isolados bacterianos de amostras de leite de vacas com mastite subclínica (GONÇALVES et al., 2014; TOMAZI, et al., 2014). Esta abordagem baseia-se na aquisição de "impressões digitais" de proteínas (proteínas ribossomais) diretamente de microrganismos intactos. Tais perfis variam consideravelmente entre espécies e podem ser utilizados para identificação de microrganismos diferentes. Estes marcadores proteicos foram rapidamente incorporados na rotina da microbiologia clínica humana, devido à disponibilidade de ferramentas para buscas em banco de dados, permitindo a identificação com precisão e reprodutibilidade elevada (BIZZINI; GREUB, 2010; SENG et al., 2010). A metodologia de MALDI-TOF MS foi considerada mais rápida do que os protocolos clássicos e técnicas de DNA para a identificação rápida de microrganismos em amostras clínicas (FENSELAU; DEMIREV, 2001; ILINA et al., 2009).

A técnica MALDI-TOF MS identificou espécies bacterianas diretamente de amostras de sangue, sem prévio cultivo, na rotina de diagnósticos microbiológicos na medicina humana, sendo um fator importante para o sucesso da identificação a contagem bacteriana total presente nas amostras a serem analisadas (MOUSSAOUI et al., 2010). Esta tecnologia também permitiu a identificação direta de microrganismo em amostras de urina e fluido cérebro-espinhal (FERREIRA et al., 2010; SEGAWA et al., 2014). No entanto, o uso da técnica MALDI-TOF MS para a identificação direta de patógenos causadores de mastite em amostras de leite ainda não foi determinada. A identificação rápida dos patógenos causadores de mastite permite adequado monitoramento da doença em rebanhos leiteiros, assim como o uso adequado de antibióticos para tratamentos, ou a adoção de outras medidas de controle (segregação, descarte e secagem antecipada das vacas acometidas).

Este estudo objetivou determinar a sensibilidade diagnóstica da técnica MALDI-TOF MS para a identificação direta (sem cultura microbiológica) de bactérias causadoras de mastite em amostras de leite experimentalmente contaminadas com *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, e *Streptococcus dysgalactiae*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Cepas Bacterianas e Contaminação bacteriana experimental do leite

Para a contaminação experimental do leite foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus uberis* ATCC 20569, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 20662 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Todas as amostras das cepas foram incubadas a 37 °C em ágar-sangue em condições aeróbias para crescimento (Figura 3-a).

Figura 3 - Esquema do protocolo utilizado para a preparação das amostras de leite experimentalmente contaminadas

Fonte: BARREIRO, 2015.

Legenda: (a) inoculação das cepas em ágar-sangue; (b) diluições seriadas para obtenção de *pellet* bacteriano para se obter a concentração de 10^9 a 10^3 bactérias mL^{-1} de leite; (c) preparação da amostra de leite experimentalmente contaminada para análise no MALDI-TOF MS; (d) extrato bacteriano sendo colocado na placa (mtp 384 Target Polished Steel; Bruker Daltonics); (e) espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA); (f) obtenção de espectros e análise pelo programa computacional (Biotyper 3.0 - Bruker Daltonics, EUA)

Após 24 horas de incubação a 37°C, as colônias das cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*

dysgalactiae e *Escherichia coli*) foram removidas da placa de ágar com o auxílio de uma alça estéril e cuidadosamente diluídas em água destilada. A concentração bacteriana em água destilada foi determinada pela escala nefelométrica de Mc Farland (Nefelobac[®] - Probac do Brasil). Após a padronização de turvação com água destilada pura, obteve-se uma contagem correspondente a 10^8 ufc/mL ou 10^9 ufc/mL suspensas em água destilada. Em seguida foram feitas diluições seriadas de 1:10 a fim de obter amostras contendo de 10^3 a 10^9 ufc/mL (Figura 3-b). Os tubos contendo as diluições foram centrifugados e os pellets foram transferidos para um microtubo de 2,0 mL, em seguida 1 mL de leite desnatado (Molico[®]), previamente preparado utilizando-se leite em pó suspenso em água destilada (1000mL de água destilada para 100g de leite em pó) e em seguida autoclavado; foi adicionado no microtubo contendo o *pellet* bacteriano, de modo a obter a concentração de 10^3 a 10^9 ufc/mL de leite. Para cada cepa padrão os procedimentos foram repetidos 3 vezes, resultando em 15 amostras iniciais, que após as diluições obteve-se um total de 105 amostras analisadas. Todas as etapas de centrifugação foram realizadas à velocidade de 13.000 Xg por 2 minutos.

3.2.2 Protocolo de preparação de amostras de leite para a identificação direta de microrganismos causadores de mastite por MALDI-TOF MS

Foi utilizada a metodologia de recuperação de bactérias causadoras de mastite no leite para a identificação por MALDI-TOF MS sem a necessidade prévia de cultivo microbiológico, baseado no método de identificação de bactérias presentes em amostras de sangue (MOUSSAOUI et al., 2010).

Para todas as amostras de leite experimentalmente contaminadas 1,0 mL de leite foi processado com o uso do kit Maldi Sepsityper[®] (Bruker Daltonics), por meio da adição de 200 mL de solução “*Lysis Buffer*”. Essa solução continha detergentes e osmolaridade otimizados para que as células e proteínas presentes nas amostras fossem solubilizadas ao mesmo tempo e para que as bactérias não fossem destruídas e pudessem ser recuperadas por centrifugação. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado com o auxílio de pipeta de 1000 µL. Após a formação de *pellet* foi adicionado 1 mL de água destilada e 200 µL de solução “*Lysis Buffer*”, cuidadosamente homogeneizado com o *pellet* de bactérias, seguido por uma segunda etapa de centrifugação. Após a remoção cuidadosa da camada lipídica e foi descartado o sobrenadante com o auxílio das pipetas, 1 mL de solução de “*Washing Buffer*”

foi adicionado, seguido por uma terceira etapa de centrifugação e descarte do sobrenadante, restando somente o *pellet* no microtubo .

Em seguida, foi utilizado o protocolo de lise bacteriana para análise por MALDI-TOF MS descrito por Lartigue et al. (2009); Barreiro et al. (2010) e Barreiro et al. (2012) (Anexo A). 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 (Figura 3-c). O sedimento bacteriano foi centrifugado e o sobrenadante descartado por meio da inversão do tubo. Em seguida, foi realizada uma segunda centrifugação para remover o restante de etanol presente na amostra e o sobrenadante descartado com auxílio de uma pipeta. Após a secagem do *pellet* em temperatura ambiente, foi adicionada solução de ácido fórmico 70%, em quantidade suficiente para recobrir o *pellet* (~30-50µL) e lisar as células bacterianas. Após homogeneização do conteúdo, adicionou-se o mesmo volume de acetonitrila 100% (~30-50µL). 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 foram obtidos os espectros de MALDI-TOF MS para a identificação bacteriana.

3.2.3 Obtenção de espectros de massas

O volume de 1,0 µL de extrato bacteriano foi colocado em placa (mtp 384 Target Polished Steel; Bruker Daltonics), seguida de secagem ao ambiente. Sobre o sobrenadante seco foi acrescentado 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% (Figura 3-d). Foi utilizado um espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA). Espectros de massas foram coletados na faixa de massas de 2.000-20.000m/z. Os espectros obtidos, em seguida, foram analisados pelo programa MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) com as configurações padrão para obtenção da identificação bacteriana. O algoritmo usado pelo MALDI Biotyper confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras referência contidas em um banco de dados (Figura 3-f). O procedimento de análise leva em consideração as massas e as intensidades relativas dos espectros desconhecidos (LARTIGUE et al., 2009).

3.2.4 Processamento dos dados

Para o processamento de dados, foi utilizado um programa computacional (Biotyper 3.0 - Bruker Daltonics, EUA) cujo funcionamento é específico para identificação de microrganismos 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 microrganismos 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 da 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 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 *escore* de 0 – 3,0, calculado pela comparação da lista de íons para um isolado desconhecido com a referência no banco de dados. Um $\text{escore} \geq 1,7$ é indicativo de identificação em nível de gênero e $\text{escore} \geq 2,0$ é o limiar definido para uma identificação em nível de gênero e espécie (NAGY et al., 2009).

Para determinar a sensibilidade diagnóstica do método MALDI-TOF MS, uma sequência de diluições foram utilizadas, até o ponto que o método não foi capaz de identificar o agente estudado. A sensibilidade diagnóstica ou o limite de detecção de um patógeno por um dado método diagnóstico é definida como sendo a menor quantidade do agente infeccioso pelo método em questão, que se possa detectar e distinguir-se de um resultado negativo de fato (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES, 2010).

3.3 RESULTADOS

Foi possível identificar pela técnica MALDI-TOF MS todas as cepas avaliadas neste estudo diretamente do leite com o auxílio do programa computacional Biotyper (Bruker Daltonics, EUA), com um score $\geq 2,0$, quando a sensibilidade diagnóstica (contagem bacteriana) foi $\geq 10^6$ ufc/mL para *Staphylococcus aureus*, $\geq 10^7$ ufc/mL para *Escherichia coli*, e $\geq 10^8$ ufc/mL para *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* na amostra de leite, (Figura 4 – Tabela 1). Os resultados obtidos indicaram que foi possível identificar *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus*, diretamente do leite, ou seja, sem cultura para obter crescimento e isolamento de bactérias, e identificá-las por MALDI-TOF MS.

Tabela 1- Médias de escores adquiridos pelo programa Biotyper em relação as diluição das cepas estudadas

Microrganismo	Diluições (ufc/mL)						
	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	1,658	2,054	2,47	2,478
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1,569	1,796	2,04	2,185	2,221	2,205
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0	1,501	1,902	2,051	2,144
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0	0	0	1,489	1,726	2,06	2,131
<i>Streptococcus uberis</i>	0	0	0	1,755	1,889	2,067	2,119

*0 = não identificou

Figura 4 - Relatório de resultados fornecido pelo programa computacional Biotyper após coleta e processamento dos espectros de massas

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E. Coli 10⁷ (++) (C)	Escherichia coli	2.144	Escherichia coli	2.124
S. aureus 10⁶ (++) (A)	Staphylococcus aureus	2.028	Staphylococcus aureus	1.886
S. aureus 10⁸ (++) (A)	Staphylococcus aureus	2.119	Staphylococcus aureus	2.09
S. agalactiae 10⁸ (++) (C)	Streptococcus agalactiae	2.051	Streptococcus agalactiae	2.007
S. dysgalactiae 10⁸ (++) (C)	Streptococcus dysgalactiae	2.06	Lactobacillus alimentarius	1.726
S. uberis 10⁸ (+) (B)	Streptococcus uberis	2.02	Streptococcus uberis	1.886

Fonte: BARREIRO, 2015.

A qualidade dos espectros adquiridos aumentou em relação às contagens iniciais de bactérias presentes nas amostras de leite após contaminação experimental para identificação por MALDI-TOF MS (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 para a *Escherichia coli* ufc/mL e para *Staphylococcus aureus* ufc/mL, respectivamente), 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 5 a-g e 6 a-g). Quando comparado os espectros adquiridos das amostras de leite experimentalmente contaminadas com os espectros de uma colônia ATCC, no caso *Staphylococcus aureus*, foi possível observar a diferença nos espectros principalmente na faixa de 2.000 a 4.000 Da (Figura 6-h).

Figura 5 - MALDI-TOF MS: espectros na faixa de 4.000 a 22.000 m/z, obtidos após a contaminação experimental do leite com (a) 10^3 , (b) 10^4 , (c) 10^5 , (d) 10^6 , (e) 10^7 , (f) 10^8 , e (g) 10^9 de *Escherichia coli* ufc/mL

Fonte: BARREIRO, 2015.

Figura 6 - MALDI-TOF MS: espectros na faixa de 2.000 a 20.000 m / z, obtidos após a contaminação experimental de leite com (a) 10^3 , (b) 10^4 , (c) 10^5 , (d) 10^6 , (e) 10^7 (f) 10^8 , (g) 10^9 de *Staphylococcus aureus* ufc/mL e (h) espectro de colônia pura de uma ATCC *Staphylococcus aureus*

Fonte: BARREIRO, 2015.

3.4 DISCUSSÃO

O diagnóstico por cultura microbiológica da mastite bovina para identificação dos agentes causadores demora em média 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. Dessa forma, avaliamos um método para diagnóstico sem necessidade de cultivo microbiológico de bactérias causadoras de mastite presentes em amostras de leite utilizando MALDI-TOF MS.

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. Foi possível identificar bactérias como *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus* diretamente do leite, levando em consideração a sensibilidade diagnóstica da técnica MALDI-TOF MS. A contagem de bactérias na amostra afeta a capacidade de identificação direta dos patógenos causadores de mastite, assim como interfere na detecção de microrganismos no sangue (MOUSSAOUI et al., 2010). Szabados et al.

(2010) sugeriram que a contagem bacteriana deve ser entre 10^7 e 2×10^9 ufc/mL para garantir uma correta identificação por MALDI-TOF MS, em amostras de sangue.

A sensibilidade diagnóstica ou o limite de detecção de um patógeno por um dado método diagnóstico é definida como sendo a menor quantidade do agente infeccioso pelo método em questão, que se possa detectar e distinguir-se de um resultado negativo de fato. Para determinar a sensibilidade diagnóstica de um teste diagnóstico, utiliza-se a diluição a tal ponto que o método não seja capaz de detectar o alvo em questão (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES, 2010). Neste estudo, a partir da análise da série de diluições 1:10 dos patógenos avaliados em amostras de leite, a sensibilidade diagnóstica para a identificação direta no leite por MALDI-TOF MS foi de $\geq 10^6$ ufc/mL para *Staphylococcus aureus*, $\geq 10^7$ ufc/mL para *Escherichia coli*, e $\geq 10^8$ ufc/mL para *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*. Os resultados obtidos são similares aos descritos por Barreiro et al. (2012) no qual as concentrações mínimas para diagnóstico do patógeno presente em amostras de leite foram de 10^6 ufc/mL e 10^7 ufc/mL para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente.

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 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 rápida, 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.

3.5 CONCLUSÃO

A identificação de bactérias inoculadas experimentalmente em amostras de leite por MALDI-TOF MS sem necessidade de cultivo prévio, foi possível quando a amostra apresentou contagem $\geq 10^6$ ufc/mL para *Staphylococcus aureus*, $\geq 10^7$ ufc/mL para *Escherichia coli*, e $\geq 10^8$ ufc/mL para *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*.

REFERÊNCIAS

- AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, p. 28–36, 1998.
- BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; BRAGA, P. A. C.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖETTCHE, V.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Nonculture-based identification of bacteria in milk by protein fingerprinting. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2739–2745, 2012.
- BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖETTCHE, V.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Rapid and comprehensive identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5661–5667, 2010.
- BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiologic Infect**, v. 16, p. 1614–1619, 2010.
- 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.
- FENSELAU, C.; DEMIREV, P.A. Characterization of intact microorganism by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 157–171, 2001.
- FERREIRA, L.; SÁNCHEZ-JUANES, F.; GONZÁLEZ-ÁVILA, M.; CEMBRERO-FUCINOS, D.; HERRERO-HERNÁNDEZ, A.; GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M.; MUNOZ-BELLIDO, J. L. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2110–2115, 2010.
- GONÇALVES, J. L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; FERREIRA, C. R.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; EBERLIN, M. N. ; SANTOS, M. V. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Veterinary Microbiology**, v. 173, p. 147–151, 2014.
- HOVINEN, M.; PYORALA, S. Invited review: udder health of dairy cows in automatic milking. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 547–562, 2011.
- 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.; 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.

LARTIGUE, M. F.; HÉRY-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.

MAIER, T.; SCHWARZ, G.; KOSTRZEWA, M. **Microorganism identification and classification based on MALDI-TOF MS fingerprinting with MALDI biotyper. Application note**. Germany: Bruker Daltonik GmbH, 2010.

MALEK DOS REIS, C. B.; BARREIRO, J. R.; MORENO, J. F.; PORCIONATO, M. A. SANTOS, M. V. Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4406–4412, 2011.

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.

MOUSSAOUI, W.; JAULHAC, B.; HOFFMANN, A. M.; LUDES, B.; KOSTRZEWA, M.; RIEGEL, P.; PREVOST, 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.

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.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES (OIE). **The animal health and production compendium**: manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Paris: Office International Des Épipizooties. 2010. Disponível em: <http://www.cabi.org/ahpc/default.aspx?site=160&page=3323>>. Acesso em: dezembro de 2012.

PANKEY, J. W.; DRECHSLER, P. A.; WILDMAN, E. E. Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1550–1552, 1991.

PYORALA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, 5, p. 564-578, 2003.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiology Research**, v. 166, p. 99–110, 2011.

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. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

SEGAWA, S.; SAWAI, S.; MURATA, S.; NISHIMURA, M.; BEPPU, M.; SOGAWA, K.; WATANABE, M.; SATOH, M.; MATSUTANI, T.; KOBAYASHI, M.; IWADATE, Y.; KUWABARA, S.; SAEKI, N.; NOMURA, F. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. **Clinica Chimica Acta**, v. 435, p. 59–61, 2014.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P. E.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 543–551, 2009.

SENG, P.; ROLAIN, J. M.; FOURNIER, P. E.; LA SCOLA, B.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. **Future Microbiology**, v. 5, p. 1733–1754, 2010.

TOMAZI, T.; GONCALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; SILVA, L. F. P. E.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization -- time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 1658-1663, 2014.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends Biotechnology**, v. 27, p. 486–493, 2009.

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

4 EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO SOBRE A IDENTIFICAÇÃO DIRETA DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE POR MALDI-TOF MS

4.1 INTRODUÇÃO

Os métodos tradicionais de identificação microbiana dependem de avaliações bioquímicas de características como: condições de crescimento; morfologia da colônia; características de crescimento em meios seletivos; potencial para fermentar açúcares; reações bioquímicas específicas; características metabólicas, antigênicas e patogênicas; e susceptibilidade aos antibióticos (READ, 2005).

A técnica de espectrometria de massas (MS) com fonte de ionização do tipo ionização/dessorção a laser assistida por matriz – MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e analisador de massas do tipo tempo-de-vôo (TOF) é amplamente utilizada para a identificação rápida e confiável de bactérias e leveduras cultivadas em placas de ágar. Essa metodologia propiciou rápida identificação de isolados bacterianos de amostras de leite de vacas com mastite subclínica (BARREIRO et al., 2010). A técnica MALDI-TOF MS foi usada para identificação direta de bactérias a partir de sangue, sendo uma ferramenta importante em laboratórios hospitalares (PROD'HOMM et al, 2010; KOK et al., 2011; SCHUBERT et al., 2011). O valor preditivo positivo para a identificação direta das bactérias gram-positivas e gram-negativas a partir de caldos de cultura de sangue em nível de gênero foi de 100% (KOK et al., 2011). A abordagem baseou na aquisição de espectros de proteína ribossomal ("impressões digitais") diretamente a partir dos organismos intactos (FENSELAU et al., 2001; ILINA et al, 2009).

Patógenos do trato urinário foram submetidos à análise de identificação direta por MALDI-TOF MS, no qual 220 amostras de um total de 260 apresentaram crescimento bacteriano $>10^5$ ufc/mL. As identificações de microrganismos pelo MALDI-TOF MS quando comparado com a cultura micribiológica apresentaram concordância de 91,8% em nível de espécie e 92,7% em nível de gênero. Os resultados sugeriram que MALDI-TOF MS permitiu a identificação de bactérias diretamente a partir de urina infectada em um curto espaço de tempo, e especialmente quando as bactérias gram-negativas apresentaram elevadas contagens bacterianas (FERREIRA et al., 2010). Esta metodologia pode ser aplicada diretamente às amostras clínicas de urina e fluido cérebro-espinhal, evitando a necessidade de cultura. Para uma identificação bem sucedida do agente com o método MALDI-TOF MS,

aproximadamente 10^4 - 10^6 ufc do microrganismo são necessários na placa-alvo (SEGAWA et al., 2014).

Os escores espectrais para a identificação de bactérias por MALDI-TOF MS diretamente de hemoculturas são geralmente mais baixos do que os escores para bactérias testadas a partir da cultura de placas, porque o resultado é influenciado tanto pela espécie da bactéria quanto pela contagem de organismos testados. Em estudos com diluições seriadas foi descrito que excelentes espectros foram obtidos quando $\geq 10^6$ ufc/mL estavam presentes na placa-alvo, uma contagem facilmente obtida a partir de placas de cultura, mas no limite do que está normalmente presente em uma hemocultura. Além disso, um escore $\geq 1,7$ pode identificar com precisão 75,8% dos microrganismos em nível de espécie (STEVENSON; DRAKE; MURRAY, 2010).

A contagem bacteriana total é um fator determinante para a sensibilidade diagnóstica da técnica MALDI-TOF MS para a identificação direta de patógenos causadores de mastite (BARREIRO et al., 2012). De acordo com Moussaoui et al. (2010), o uso da pré-incubação de amostras de sangue permitiu maior precisão de identificação direta de bactérias pela técnica MALDI-TOF MS. No entanto, o efeito da pré-incubação não foi avaliado em amostras de leite de vacas com mastite subclínica para fins de identificação direta de bactérias pela técnica MALDI-TOF MS.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da pré-incubação de amostras de leite de quartos mamários com mastite subclínica sobre a eficácia da identificação sem cultivo de patógenos causadores de mastite por MALDI-TOF MS.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Seleção de rebanhos e coleta de amostras de leite

Foram selecionados 2 rebanhos leiteiros da região de Pirassununga, com número médio de 50 vacas em lactação. Foram realizadas duas coletas de amostras de leite de todos os quartos mamários das vacas em lactação ($n=160$), totalizando 810 amostras. Antes da ordenha os tetos foram imersos em solução de iodo (0,5%) e decorridos 20 segundos foram secados com papel toalha descartáveis, em seguida foi realizada assepsia com gazes embebida em álcool iodado. As amostras de leite foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo (a 4,5

°C) até o laboratório. As amostras de leite foram submetidas às análises de cultura microbiológica; e em seguida foram congeladas a -20°C, para posteriormente serem submetidas ao protocolo de pré-incubação e preparo para identificação pela metodologia MALDI-TOF MS.

4.2.2 Cultura microbiológica (método de referência)

Para o procedimento de isolamento e identificação de patógenos causadores de mastite, foi utilizada a metodologia proposta por NMC (2004). Para o isolamento primário de microrganismos, foi utilizado o meio de cultura ágar-sangue (contendo 5% de sangue) em placas de Petri descartáveis e estéreis (90x15 mm), nas quais as amostras de leite foram inoculadas com auxílio de alça de platina calibrada. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C e foram feitas observações às 24 e 48 horas quanto à presença de crescimento bacteriano. Decorrido o tempo de incubação, as colônias bacterianas foram classificadas de acordo com suas características morfológicas (cor, aspecto, tamanho e presença de hemólise), em seguida, foi realizada a coloração de Gram, seguidas pelas provas bioquímicas para identificação das bactérias: hidróxido de potássio (KOH), catalase, coagulase, manitol e CAMP.

4.2.3 Identificação de microrganismos causadores de mastite a partir de colônia por MALDI-TOF MS

Dentre as amostras que apresentaram isolamento positivo na cultura microbiológica (método referência) para *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*, que foram submetidos à identificação direta do leite pelo MALDI-TOF MS, foram selecionados 120 isolados bacterianos para a identificação a partir da colônia pelo método MALDI-TOF MS. Foi utilizado o protocolo de lise bacteriana descrito por Lartigue et al. (2009) e Barreiro et al. (2010). O isolado bacteriano 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 e o sobrenadante descartado por meio da inversão do tubo. Uma segunda centrifugação foi

realizada para remover o restante de etanol presente na amostra, para posteriormente ser retirado 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* (~30-50µL) e lisar as células bacterianas. Após homogeneização do conteúdo, foi adicionado o mesmo volume de acetonitrila 100% (~30-50µL). 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 foram obtidos os espectros de MALDI-TOF MS que será utilizado para a identificação bacteriana pelo Biotyper.

4.2.4 Otimização do protocolo de preparação das amostras de leite

Para otimizar o protocolo de preparação das amostras de leite para a identificação direta de microrganismos causadores de mastite no leite, foram testados 3 protocolos de preparação:

Protocolo 1: foram utilizadas 14 amostras identificadas pelo método referência como *Staphylococcus aureus*, as quais foram incubadas em banho-maria a 37°C por 12 horas e submetidas a um desnate por centrifugação (10.000 Xg por 10 minutos) e em seguida as amostras foram processadas usando o kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics).

Protocolo 2: foram utilizadas 10 amostras identificadas pelo método referência como *Staphylococcus aureus*, as quaias foram incubadas em banho-maria a 37°C por 12 horas, e submetidas ao desnate por centrifugação (10.000 Xg por 10 minutos) e passaram por um processo de desproteinização e filtragem. Para a desproteinização das amostras de leite, utilizou-se 100µL de quimosina para a coagulação da caseína, em seguida, as amostras passaram por uma filtragem para separar o coágulo da fase líquida, a qual foi posteriormente processada com o uso do kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics).

Protocolo 3: foram utilizadas 14 amostras identificadas pelo método referência como *Staphylococcus aureus*, as quais foram submetidas ao desnate por centrifugação (10.000 Xg por 10 minutos), sendo em seguida homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37°C por 12 horas para posteriormente serem processado com o uso do kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics).

Em seguida, as amostras provenientes dos três protocolos de preparação foram submetidas ao protocolo de lise bacteriana para posterior análise por MALDI-TOF MS, utilizando-se um espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA). Espectros de massas foram coletados na faixa de massas de 2.000-20.000 m/z e foram analisados pelo programa MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) com as configurações padrão para obtenção da identificação bacteriana.

4.2.5 Pré-incubação e identificação de microrganismos causadores de mastite a partir do leite por MALDI-TOF MS

Com base nos resultados preliminares para a otimização do protocolo de preparação das amostras de leite, o protocolo que foi mais adequado para a identificação direta no leite de microrganismos causadores de mastite foi o protocolo 3. Sendo assim, as amostras com isolamento positivo (n=305) na identificação microbiológica (método referência) para *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* foram submetidas a um desnate por centrifugação (10.000 xg por 10 minutos) e em seguida foi retirado à camada superior de gordura. Após o desnate as amostras de leite foram agitadas em vortex e submetidas a uma pré-incubação em banho-maria por agitação a 37°C por 12 horas (protocolo 3). Após a incubação, uma alíquota de cada amostra foi submetida à contagem bacteriana total (CBT) realizada por citometria de fluxo (Bactocount– Bentley Instruments, 2004), pelo Laboratório Clínica do Leite – Departamento de Produção Animal da ESALQ-USP (Piracicaba-SP).

A preparação das amostras de leite para a identificação direta pelo método MALDI-TOF MS foi realizada a partir de 1,0 mL de cada amostra de leite, após serem submetidas ao desnate e pela pré-incubação, com o uso do kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics), por meio da adição de 200 µL de solução “*Lysis Buffer*”. As amostras foram centrifugadas a 13.000 Xg por 2 minutos e o sobrenadante descartado com o auxílio de pipeta de 1000 µL, em seguida, foi adicionado 1 mL de água destilada e 200 µL de solução “*Lysis Buffer*”, cuidadosamente homogeneizado com o *pellet*, seguido por uma segunda etapa de centrifugação. Após o descarte do sobrenadante com o auxílio da pipeta, 1 mL de solução de “*Washing Buffer*” foi adicionado, seguida por uma terceira etapa de centrifugação e descarte do sobrenadante.

Após está preparação as amostras foram submetidas ao protocolo de lise bacteriana para análise por MALDI-TOF MS descrito por Lartigue et al. (2009) e Barreiro et al. (2010). 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 e o sobrenadante descartado por meio da inversão do tubo. Em seguida, foi realizada uma segunda centrifugação para remover o restante de etanol presente na amostra e o sobrenadante descartado 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* (~30-50µL) e lisar as células bacterianas. Após homogeneização do conteúdo, adicionou-se o mesmo volume de acetonitrila 100% (~30-50µL). 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). O volume de 1,0 µL do extrato bacteriano foi colocado em placa (mtp 384 Target Polished Steel; Bruker Daltonics), seguida de secagem ao ambiente. Sobre o sobrenadante seco foi acrescentado 1,0 uL de solução de matriz, composta de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) diluída em acetonitrila 50% e de ácido trifluoroacético 2,5% . Foi utilizado um espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA). Espectros de massas foram coletados na faixa de massas de 2.000-20.000m/z. (Figura 7).

Para o processamento dos dados espectrais, foi utilizado o programa computacional Biotyper (Bruker Daltonics, EUA) para a identificação de microrganismos por comparação com o banco de dados (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*). O resultado foi baseado no algoritmo (escore) adquirido pelo software Biotyper 3,0, sendo que escores $\leq 1,6$ foram considerados diagnósticos não confiáveis; $\geq 1,7$ a 1,9 foram considerados confiáveis para a identificação de gênero, e escores $\geq 2,0$ foram considerados confiáveis para identificação de gênero e espécie.

Figura 7 - Sequência do protocolo utilizado para a preparação das amostras de leite após o desnate e incubação

Fonte: BARREIRO, 2015.

Legenda: (a) inoculação das amostras de leite em banho-maria; (b) extração de bactérias realizada a partir de 1,0 mL de amostra de leite com o uso do kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics); (c) extrato bacteriano sendo colocado na placa (mtp 384 Target Polished Steel; Bruker Daltonics); (d) espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA); (e) obtenção de espectros e análise pelo programa computacional (Biotyper 3.0 - Bruker Daltonics, EUA)

4.2.6 Análise Estatística

Para avaliar a concordância entre o método de MALDI-TOF MS e microbiologia padrão (método de referência) na identificação de agentes causadores de mastite em amostras de leite, utilizou-se o teste não-paramétrico das diferenças de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 2010). Assim, a hipótese nula, testada pela estatística t , foi a de equivalência entre os métodos, portanto, a não diferença significativa; o que significou que o *Bias* ou a diferença média observada entre os dados obtidos por ambas as metodologias (referência e MALDI-TOF MS), foi igual à zero. Contrariamente, um valor P significativo implicou na aceitação da hipótese alternativa (H_1 : métodos não são equivalentes), e o *Bias* observado foi diferente de zero. Os limites de concordância aceitáveis entre os métodos de referência e de MALDI-TOF MS foram definidos tendo como valores limítrofes do intervalo de confiança de 95% das diferenças entre as duas metodologias em uma distribuição t , com $n-1$ graus de liberdade, ou seja, t (IC 95%) $\pm$ erro padrão. A análise de Bland-Altman foi realizada por meio do pacote de análise estatística Anslyse-it® (Analyse-it Software Ltd., Leeds, West Yorkshire, reino Unido) por Microsoft Excel® (Microsoft Corporation Ltd., Redmons, Washinton, EUA).

Os parâmetros de avaliação da sensibilidade de identificação da técnica MALDI-TOF MS foram determinados conforme estabelecido no Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Aniamls da Organização Internacional de Epizootias (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES, 2010), onde; sensibilidade = Número de amostras

positivas no MALDI-TOF MS/(Número de amostras positivas na microbiologia + Número de amostras negativas no MALDI-TOF MS, mas positivas na microbiologia) * 100.

A análise de qui-quadrado foi utilizada para determinar a frequência de identificação pelo MALDI-TOF MS em relação à contagem bacteriana da amostra analisada utilizando-se o procedimento PROC FREQ do SAS 9.0 (SAS, 2012), adotando-se nível de significância de 5%. Para isso os valores de contagem bacteriana foram divididos em classes, classe 1 (de 6 – 500 x10³ ufc/mL); classe 2 (de 501-1000 x10³ ufc/mL); classe 3 (de 1001-5000 x 10³ ufc/mL) e classe 4 (de 5001-9999 x10³ ufc/mL).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Cultura microbiológica

De um total de 810 amostras de leite analisadas, 347 apresentaram isolamento positivo. Os microrganismos com maior frequência de isolamento pela cultura microbiológica das amostras dos quartos mamários foram do grupo *Staphylococcus* coagulase negativa (23,58%); seguidos de *Streptococcus agalactiae* que apresentaram isolamento em 5,19% das amostras; enquanto *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium spp.* e *Trueperella spp.* apresentaram 4,57%, 3,83%, 3,33% e 1,23%, respectivamente. Portanto, 57,16% (n=463) das amostras dos quartos mamários não apresentaram crescimento nos exames microbiológicos (Tabela 2).

Tabela 2 - Isolamento de agentes etiológicos da mastite em amostras por quarto mamário bovino

Microrganismo	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)	Culturas positivas (%)
Amostras avaliadas	810		
Amostras sem isolamento	463	57,16	
Amostras com isolamento	347	42,84	
SCN ¹	191	23,58	55,04
<i>Streptococcus agalactiae</i>	42	5,19	12,10
<i>Streptococcus uberis</i>	37	4,57	10,66
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	3,83	8,93
<i>Corynebacterium spp</i>	27	3,33	7,78
<i>Trueperella spp</i>	10	1,23	2,88
Prothoteca	5	0,62	1,44
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	4	0,49	1,15

¹ *Staphylococcus* coagulase negativa.

4.3.2 Identificação de microrganismos causadores de mastite a partir de colônia por MALDI-TOF MS

Foram analisadas um total de 120 isolados bacterianos, que pelo método de cultura microbiológica foram identificados como *Streptococcus agalactiae* (n= 32); *Streptococcus uberis* (n= 19); *Staphylococcus aureus* (n= 14) e *Staphylococcus* coagulase negativa (n= 55). Dos 32 isolados de *Streptococcus agalactiae* o método MALDI-TOF MS identificou 31 isolados corretamente e 1 isolado como *Streptococcus dysgalactiae*. Já para os isolados de *Streptococcus uberis* o método MALDI-TOF MS identificou corretamente 14 isolados e os demais isolados foram identificados como *Streptococcus agalactiae* (n=3) e *Streptococcus dysgalactiae* (n=2). Para os isolados de *Staphylococcus aureus*, 10 foram identificados corretamente pelo método MALDI-TOF MS, e os demais (n=4) como *Staphylococcus* coagulase negativa (em nível de espécie como *Staphylococcus haemolyticus*). O grupo de isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa o método MALDI-TOF MS identificou corretamente 51 isolados, sendo que 3 isolados foram identificados como *Lactococcus garvieae* e para 1 isolados apenas o gênero *Staphylococcus* spp. (Tabela 3).

A sensibilidade para o método MALDI-TOF MS para a identificação a partir de colônias foi de 96,8%, 73,6%, 71,4% e 92,7% para *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa, respectivamente.

Tabela 3 - Microrganismos identificados através de isolados bacterianos por MALDI-TOF MS e Cultura Microbiológica

Cultura Microbiológica		MALDI-TOF MS			
Patógenos causadores de mastite	n	Correta identificação em nível de espécie (escore >2,0)		DM ¹	NI ²
		n	Sugestão de espécie		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	32	31	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	0
<i>Streptococcus uberis</i>	19	14	<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	0
			<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	10	SCN**	4	0
SCN*	55	51	<i>Lactococcus garvieae</i>	3	0
			<i>Staphylococcus</i> spp.	1	0
Total	120	106		14	0

* Dentre o grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa estão: *Staphylococcus chromogens*; *Staphylococcus capitis*; *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus haemolyticus*; *Staphylococcus caprae*; *Staphylococcus hominis*; *Staphylococcus simulans*; *Staphylococcus succinus*; *Staphylococcus vitulinus*.

** *Staphylococcus haemolyticus*.

¹Discordância entres os métodos.

² Não identificou.

4.3.3 Identificação direta de microrganismos causadores de mastite a partir do leite por MALDI-TOF MS sem cultivo microbiológico

Para minimizar os interferentes do leite e otimizar a identificação direta de microrganismos causadores de mastite no leite, foram testados 3 protocolos para a preparação das amostras de leite antes de proceder com o protocolo de lise bacteriana para análise por MALDI-TOF MS.

Entre os protocolos testados, o protocolo 3 foi o que permitiu a identificação de maior número de isolados comparado com os demais. De 14 amostras de leite previamente identificados pelo método microbiológico padrão como *Staphylococcus aureus*, foi possível a identificação de 12 amostras pelo método MALDI-TOF MS com escore entre $\geq 1,7$ e $\leq 2,0$ e não foram identificados 2 amostras. Pelo uso do protocolo 1 foram identificadas corretamente 6 amostras. Pelo uso do protocolo 2 não foi possível a identificação pelo método MALDI-TOF MS (Tabela 4). Os escores de identificação pelo Biotyper $< 2,0$ pelo protocolo 3 apresentou repetibilidade entre os 10 agentes sugeridos pelo programa computacional Biotyper (Figura 8).

Tabela 4 - Relação de protocolos testados para otimizar a identificação microbiológica direta do leite

Protocolos	Isolados (n)	MALDI-TOF MS Isolado (n)	Escore Biotyper
Protocolo 1	<i>Staphylococcus aureus</i> (14)	Amostras não identificadas (8) <i>Staphylococcus aureus</i> (6)	$\geq 1,7 \leq 1,8$
Protocolo 2	<i>Staphylococcus aureus</i> (10)	Amostras não identificadas (10)	
Protocolo 3	<i>Staphylococcus aureus</i> (14)	Amostras não identificadas (2) <i>Staphylococcus aureus</i> (12)	$\geq 1,7 \leq 2,0$

Figura 8 - Resultados de identificação pelo MALDI Biotyper: mostrando que a mesma amostra apresentou repetibilidade na identificação, porém com escore abaixo de 2,0

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 4910 DSM	1.933	<u>46170</u>
2 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 20232 DSM	1.843	<u>46170</u>
3 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862 THL	1.824	<u>1280</u>
4 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 3463 DSM	1.813	<u>46170</u>
5 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 20491 DSM	1.809	<u>46170</u>
6 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 THL	1.809	<u>1280</u>
7 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 346 DSM	1.756	<u>46170</u>
8 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	1.728	<u>1280</u>
9 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 20652 DSM	1.718	<u>46170</u>
10 (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 THL	1.714	<u>1280</u>

Fonte: BARREIRO, 2015.

Após a etapa de otimização do protocolo de preparo para as amostras de leite, foi utilizado o protocolo 3 para a preparação das amostras de leite e identificação dos agentes

causadores de mastite diretamente do leite pelo método MALDI-TOF MS. Foram analisadas 305 amostras que foram previamente identificadas pelo método microbiológico, das quais 191 amostras foram de *Staphylococcus* coagulase negativa, 42 amostras de *Streptococcus agalactiae*, 37 amostras de *Streptococcus uberis*, 31 amostras de *Staphylococcus aureus* e 4 amostras de *Streptococcus dysgalactiae*.

As amostras de leite identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa pelo método microbiológico convencional quando analisado pelo MALDI-TOF MS foi possível identificar corretamente 39 (20,4%) amostras, sendo que 31 amostras foram identificadas em nível de gênero e espécie (escore $\geq 2,0$), 1 amostra a nível de gênero (escore $\geq 1,7$ a $1,9$), 7 amostras com identificação não confiável a nível de gênero e espécie (escore $\leq 1,6$) e a não identificação de 93 (48,6%) amostras. As demais amostras foram identificadas como outros agentes, sendo que 51 (26,7%) amostras foram identificadas como *Lactobacillus* com escores variáveis; 4 (2,0%) amostras como *Staphylococcus* spp. com escores $\geq 2,0$; 2 (1,0%) amostras como *Staphylococcus aureus*, sendo que apenas uma amostra obteve escore de confiança para gênero e espécie; 1 (0,5%) amostra como *Streptococcus agalactiae* com escore de confiança apenas para gênero; e 1 (0,5%) amostra como *Streptococcus equi* com escore de confiança para gênero e espécie (Tabela 5).

Tabela 5 - Microrganismos identificados direto do leite por MALDI-TOF MS e microbiológico padrão

Resultados de Cultura Microbiológica (n)	MALDI-TOF MS		CBT (x10 ³)
	Isolados (n)	Escore Biotyper **	
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (191)	Amostras não identificadas (93)		5471,8
	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (39) *	≤ 1,6 (n=7) ≥ 1,7 a 1,9 (n=1) ≥ 2,0 (n=31)	6433,2
	<i>Lactobacillus</i> spp. (51)	≤ 1,6 (n=38) ≥ 2,0 (n=13)	6229,6
	<i>Staphylococcus</i> spp. (4)	≥ 2,0 (n=4)	5030
	<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	≤ 1,6 (n=1) ≥ 2,0 (n=1)	7315
	<i>Streptococcus agalactiae</i> (1)	≤ 1,6 (n=1)	9999
	<i>Streptococcus equi</i> (1)	≥ 2,0 (n=1)	202
<i>Streptococcus agalactiae</i> (42)	Amostras não identificadas (17)		8862,2
	<i>Streptococcus agalactiae</i> (9)	≤ 1,6 (n=6) ≥ 1,7 a 1,9 (n=2) ≥ 2,0 (n=1)	9999
	<i>Lactobacillus</i> spp. (16)	≤ 1,6 (n=16)	8846,1
<i>Streptococcus uberis</i> (37)	Amostras não identificadas (22)		6166,6
	<i>Streptococcus uberis</i> (1)	≥ 1,7 a 1,9 (n=1)	5153
	<i>Lactobacillus</i> spp. (10)	≤ 1,6 (n=6) ≥ 2,0 (n=4)	6908,3
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (1)	≥ 2,0 (n=1)	8934
	<i>Streptococcus peroris</i> (1)	≥ 2,0 (n=1)	3436
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (1)	≥ 2,0 (n=1)	4478
	<i>Streptococcus agalactiae</i> (1)	≤ 1,6 (n=1)	9999
<i>Staphylococcus aureus</i> (31)	Amostras não identificadas (18)		9565,5
	<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	≤ 1,6 (n=3)	-
	<i>Lactobacillus</i> spp. (10)	≤ 1,6 (n=10)	8056,3
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (4)	Amostras não identificadas (1)		1258
	<i>Lactobacillus</i> spp. (3)	≥ 2,0 (n=3)	22

* Dentre o grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa estão: *Staphylococcus chromogens*; *Staphylococcus capitis*; *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus haemolyticus*; *Staphylococcus caprae*; *Staphylococcus hominis*; *Staphylococcus simulans*; *Staphylococcus succinus*; *Staphylococcus vitulinus*.

** Escore ≥ 1,7 é indicativo de identificação em nível de gênero e escore ≥ 2,0 é o limiar definido para uma identificação em nível de espécie, e ≤ 1,6 é indicativo de identificação não confiável.

Em relação às amostras de leite identificadas como *Streptococcus agalactiae* pelo método microbiológico convencional quando analisado pelo MALDI-TOF MS foi possível identificar corretamente 9 (21,4%) amostras, sendo que apenas 1 amostra foi identificada em nível de gênero e espécie (escore $\geq 2,0$), 2 amostras a nível de gênero (escore $\geq 1,7$ a $1,9$), 6 amostras com identificação não confiável a nível de gênero e espécie (escore $\leq 1,6$) e a não identificação de 17 (40,4%) amostras. E 16 (38%) amostras foram identificadas no grupo dos *Lactobacillus* com escores variáveis (Tabela 5).

As amostras de leite identificadas como *Streptococcus uberis* pelo método microbiológico convencional quando analisado pelo MALDI-TOF MS foi possível identificar corretamente apenas 1 (2,7%) amostra, porém com confiabilidade apenas a nível de gênero (escore $\geq 1,7$ a $1,9$), e a não identificação de 22 (59,4%) amostras. As demais amostras foram identificadas como outros agentes, onde 10 (27%) amostras foram identificadas no grupo dos *Lactobacillus* com escores variáveis; e as 4 (10,8%) amostras restantes identificadas como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus peroris*, e *Staphylococcus haemolyticus* com escores $\geq 2,0$, e *Streptococcus agalactiae* com escore $\leq 1,6$ (Tabela 5).

Já as amostras de leite identificadas como *Staphylococcus aureus* pelo método microbiológico convencional quando analisado pelo MALDI-TOF MS foi possível identificar corretamente 3 (9,7%) amostras, porém com escore $\leq 1,6$, abaixo da confiabilidade de identificação para gênero e espécie; e a não identificação de 18 (58%) amostras. Este grupo de agentes tiveram 10 (32,2%) amostras identificadas no grupo dos *Lactobacillus* com escores também abaixo da confiabilidade de identificação para gênero e espécie (Tabela 5).

Para a identificação de amostras de leite identificadas pelo método microbiológico como *Streptococcus dysgalactiae*, o método MALDI-TOF MS não identificou corretamente (25%), sendo o maior número identificado como *Lactobacillus* (75%) (Tabela 5).

A análise de Bland-Altman foi utilizada para avaliar o nível de concordância entre os dois métodos e comparar o MALDI-TOF MS à metodologia de referência, entretanto, a diferença média entre as duas formas de identificação foi significativa e, portanto, são formas diferentes de identificar agentes causadores de mastite ($P= 0,0001$).

Assumindo o método microbiológico convencional como referência, e os isolados *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus dysgalactiae* a sensibilidade de identificação para o método MALDI-TOF MS foi de 14,08%, 15,25%, 1,69%, 6,12% e 0%, respectivamente.

Para avaliar o efeito da contagem bacteriana sobre o escore de identificação do Biotyper foi utilizada a análise de qui-quadrado, adotando-se nível de significância de 5%, para as seguintes classes de contagem bacteriana: 1 (de 6 – 500 x10³ ufc/mL); 2 (de 501-1000 x10³ ufc/mL); 3 (de 1001-5000 x 10³ ufc/mL) e 4 (de 5001-9999 x10³ ufc/mL). Para os escores do Biotyper foram adotadas as seguintes classificações: escore 0 (não identificou); escore 1 ($\leq$ 1,6 - não confiável); escore 2 ($\geq$ 1,7 a 1,9 – confiável em nível de gênero) e escore 3 ($\geq$ 2,0 – confiável em nível de gênero e espécie). Do total de 305 amostras analisadas no presente estudo, foram determinados a contagem bacteriana de 248 amostras, devido a pré-incubação cerca de 57 amostras sofreram coagulação, e sendo assim, não foi possível a realização da análise de CBT. Houve efeito da classe de contagem bacteriana para os resultados de escore 1 ($\leq$ 1,6 – identificação não confiável) do Biotyper ($p=0,0265$), sendo que a classe 4 de contagem bacteriana (5001-9999 x10³ ufc/mL) diferiu das classes 1 e 2; e observou-se uma tendência para o escore 3 do Biotyper ($\geq$ 2,0 – confiável a nível de gênero e espécie) (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito da contagem bacteriana sobre o escore de identificação do Biotyper de agentes causadores de mastite¹

Escore *	Classes de CBT**				Total	P ²
	1	2	3	4		
0	19	10	22	76	126	0,704
1	4 b	2 b	9ab	52a	67	0,027
2	0	0	0	5	5	0,398
3	10 a	5ab	11ab	24b	50	0,091
Total	33	17	41	157	248	

¹ Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste qui quadrado ($p < 0,05$).

* Escore de identificação do Biotyper: escore 0 (não identificou); escore 1 ($\leq$ 1,6 - não confiável); escore 2 ($\geq$ 1,7 a 1,9 – confiável a nível de gênero) e escore 3 ($\geq$ 2,0 – confiável a nível de gênero e espécie).

** Classes de CBT: 1 (de 6 – 500 x10³ ufc/mL); 2 (de 501-1000 x10³ ufc/mL); 3 (de 1001-5000 x 10³ ufc/mL) e 4 (de 5001-9999 x10³ ufc/mL).

4.4 DISCUSSÃO

A identificação de patógenos causadores de mastite diretamente do leite, por MALDI-TOF MS apresentou baixa eficácia. Da mesma forma, a pré-incubação a 37°C/12 horas de amostras de leite de quartos mamários não aumentou a sensibilidade analítica do método MALDI-TOF MS.

Já em amostras clínicas de humanos, tais como urina e líquido cérebro-espinhal, foi descrita identificação direta e bem sucedida com MALDI-TOF MS, porém aproximadamente 10^4 - 10^6 ufc/mL foram necessários na placa-alvo para a identificação direta em amostras de urina. Estes níveis de contagem bacteriana foram alcançados em pacientes com infecção no trato urinário (SEGAWA et al., 2014). Neste estudo não foi avaliado a contagem bacteriana total antes da pré-incubação das amostras de leite. Semelhante à urina, o líquido cérebro-espinhal também foi um alvo promissor para a identificação de microrganismos com MALDI-TOF MS, para a detecção direta de microrganismos que causam meningite bacteriana (SEGAWA et al., 2014).

A contagem bacteriana total da amostra foi um fator determinante para a sensibilidade analítica da técnica de MALDI-TOF MS para a identificação direta de patógenos causadores de mastite em amostras de leite contaminadas experimentalmente (BARREIRO et al., 2012). De acordo com Moussaoui et al. (2010), o uso da pré-incubação de amostras de sangue permitiu a identificação direta de bactérias pela técnica MALDI-TOF MS. Ferreira et al. (2010) em amostras de urina, relataram que a MALDI-TOF MS permitiu a identificação de bactérias diretamente a partir de urina infectada com contagens bacterianas $>10^5$ ufc/mL. No entanto, o efeito da pré-incubação em amostras de leite de vacas com mastite subclínica não foi eficiente como em amostras de sangue.

Um dos possíveis fatores que podem ter influenciado para o insucesso da técnica MALDI-TOF MS para a identificação de microrganismos diretamente do leite de quartos mamários foi a contagem de bactérias presente nas amostras de leite provenientes de infecções naturais. Das quais a pré-incubação das amostras de leite propiciou o crescimento de outras bactérias presentes no leite, tais como *Lactobacillus*, o que não permitiu atingir contagens suficientes para os agentes causadores de mastite estudado, para uma identificação correta pelo método MALDI-TOF MS, ou que a identificação atingisse um escore de confiabilidade ($\geq 2,0$). Além disso, outro fator foi a complexidade da composição do leite que possivelmente apresentou interferentes durante a aquisição dos espectros para a identificação dos agentes pelo MALDI-TOF MS. Comparando-se os espectros de massas de uma amostra

proveniente de colônias bacterianas com amostras de microrganismos diretamente do leite observou-se picos de interferência na faixa de 2.000 a 4.000 m/z (Figura 9).

Figura 9 - MALDI-TOF: espectros na faixa de 2.000 a 20.000 m / z, obtidos após a contaminação experimental de leite integral (a) *Staphylococcus aureus* diretamente do leite, (b) *Staphylococcus aureus* colônia de ATCC, (c) amostra sem crescimento (somente leite)

Fonte: BARREIRO, 2015.

O método MALDI-TOF MS quando comparado com o método referência identificou corretamente apenas 21,4%, 20,4%, 9,7% e 2,7% dos isolados de *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*, respectivamente. Sendo que para os isolados de *Streptococcus dysgalactiae* o método MALDI-TOF MS não identificou corretamente nenhuma amostra. Estudos que avaliaram o desempenho da técnica MALDI-TOF MS na identificação direta de bactérias em cultura de sangue, na qual foram analisadas 322 hemoculturas positivas, porém não foi utilizado o kit Maldi Sepsityper® (Bruker Daltonics). Das amostras de sangue estudadas, 59% originou identificação idêntica aos testes fenotípicos (testes de rotina utilizados nas análises de identificação de amostras clínicas) em nível de espécie. No entanto, *Streptococcus sp.* tiveram uma baixa identificação (4/25, 16%). Ao modificar o protocolo de preparo das amostras de sangue, os autores relatam que aumentou os resultados corretos da identificação de Gram-positivos, com a identificação de 67%, principalmente para *Staphylococcus sp.*, porém, para *Streptococcus sp.* continuou com baixa identificação (17/04, 23%). A técnica de identificação direta MALDI-TOF MS poderá substituir a convencional identificação de bactérias em

culturas de sangue, mas apresenta duas grandes limitações. Em primeiro lugar, no caso da presença de mais de uma espécie, apenas uma pode ser identificada, ou pode-se ter uma identificação incorreta. A segunda é que a metodologia não permitiu a identificação de *Streptococcus viridans*, o mesmo aconteceu com a identificação de *Streptococcus dysgalactiae* em nosso estudo, porém a identificação destes microrganismos foi possível a partir de colônias com crescimento em ágar (SCOLA; RAOULT, 2009).

A porcentagem de isolados identificados como *Lactobacillus*, independentemente da classe do agente estudada foi superior quando comparado com a porcentagem de isolados identificados corretamente. Essa crescente identificação de *Lactobacillus*, podem ter sido propiciada pela pré-incubação, a qual permitiu que houvesse aumento da contagem bacteriana deste microrganismo.

No presente estudo as amostras de leite identificadas corretamente pelo método MALDI-TOF MS como *Staphylococcus coagulase negativa* (39 isolados), 31 amostras foram identificadas em nível de confiabilidade de gênero e espécie (escore $\geq 2,0$). Para os isolados de *Streptococcus agalactiae* apenas um isolado foi identificado corretamente em nível de gênero e espécie. O nível de confiabilidade de identificação foi ainda mais baixo para os isolados de *Streptococcus uberis* (escore $\geq 1,7$ a $1,9$), e *Staphylococcus aureus* (escore $\leq 1,6$); e não foi identificado corretamente nenhum isolado de *Streptococcus dysgalactiae*. Portanto, o método de identificação direta do leite de microrganismos causadores de mastite pelo MALDI-TOF MS não poderia substituir o método microbiológico padrão, pois apresentou uma baixa sensibilidade de identificação.

O efeito da contagem bacteriana sobre o escore de identificação do Biotyper foi significativa para o escore 1 ($\leq 1,6$ – identificação não confiável) do Biotyper ($p=0,0265$), sendo que a classe 4 ($5001-9999 \times 10^3$ ufc/mL) de contagem bacteriana difere das classes 1 ($6-500 \times 10^3$ ufc/mL) e 2 ($501-1000 \times 10^3$ ufc/mL). Porém, para esta faixa de escore os resultados não são confiáveis, mesmo que a maioria das amostras tenha apresentado uma alta contagem bacteriana (52/67). Observou-se uma tendência da classe de contagem bacteriana para o escore 3 ($\geq 2,0$ – confiável em nível de gênero e espécie) do Biotyper. Porém, apenas 50 amostras foram identificadas com escore $\geq 2,0$ de um total de 248 amostras. Esses resultados demonstram que não foi apenas a contagem bacteriana que interferiu para uma maior taxa de identificação dos microrganismos causadores de mastite pelo método MALDI-TOF MS.

Neste estudo a metodologia MALDI-TOF MS permitiu a identificação de 88,3% (106/120) das bactérias patogênicas cultivadas em placas de ágar a partir de colônias. O uso mais comum de MALDI-TOF MS em bacteriologia clínica é para a identificação de bactérias cultivadas em meio sólido. Foi relatado que as porcentagens de gêneros identificados corretamente foram 97%-99% e os de espécies 85%-97% ao testar rotineiramente bactérias isoladas e leveduras utilizando o Sistema Bruker Biotyper MALDI-TOF MS (PATEL, 2013). Porém, a identificação de patógenos por meio de análise direta do leite não proporcionou uma identificação instantânea, uma vez que foi necessária uma pré-incubação das amostras de leite de quartos mamários. Está pré-incubação favoreceu o crescimento de bactérias presentes no leite, como por exemplo, *Lactobacillus*, o que resultou uma baixa sensibilidade do método MALDI-TOF MS. Esses resultados sugerem que as amostras de leite possuíam mais de um agente quando foram analisados pelo MALDI-TOF MS após a pré-incubação, porém esta informação não foi avaliada, pois neste estudo não foi feita a cultura microbiológica após a pré-incubação.

Uma das maiores limitações do método MALDI-TOF MS está relacionado com a grande heterogeneidade de um proteoma, isto é, a complexidade do conjunto de proteínas proveniente das amostras de leite. Assim, quanto menor for a concentração de uma proteína, mais difícil é a sua detecção pelo método MALDI-TOF MS, quer devido aos limites dos métodos de detecção, quer devido à possível sobreposição de proteínas, que apresentem pesos moleculares e ponto isoelétrico semelhantes. Além disso, trata-se de um método de acesso restrito e com custos de equipamentos elevados. Esta tecnologia, no entanto, é relativamente nova e bases de dados e protocolos continuam a serem otimizados, o que poderá resultar na identificação de espécies bacterianas relativamente raras. Além disso, esta técnica ainda não é suficientemente eficaz para identificação bacteriana em casos de infecção polimicrobiana.

4.5 CONCLUSÃO

A identificação direta de microrganismos causadores de mastite pela técnica MALDI-TOF MS em amostras de leite de quartos mamários de vacas com mastite subclínica, mesmo com a pré-incubação, não foi eficaz, ou seja, a pré-incubação de amostras de leite não aumentou a sensibilidade de identificação direta de microrganismos causadores de mastite pelo método MALDI-TOF MS.

REFERÊNCIAS

- BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; BRAGA, P. A. C.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖETTCHE, V.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Nonculture-based identification of bacteria in milk by protein fingerprinting. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 1–7, 2012.
- BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖETTCHE, V.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Rapid and comprehensive identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5661-5667, 2010.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **International Journal of Nursing Studies**, v. 47, n.8, p.931-936, 2010.
- 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.
- FERREIRA, L.; SÁNCHEZ-JUANES, F.; GONZÁLEZ-ÁVILA, M.; CEMBRERO-FUCINOS, D.; HERRERO-HERNÁNDEZ, A.; GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M.; MUNOZ-BELLIDO, J. L. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2110–2115, 2010.
- 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.; 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.
- KOK, J.; THOMAS, L. C.; OLMA, T.; CHEN, S. C.; IREDELL, J. R. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry. **PLoS One**, v. 6, p. 23285, 2011.
- LARTIGUE, M. F.; HÉRY-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.

MOUSSAOUI, W.; JAULHAC, B.; HOFFMANN, A. M.; LUDES, B.; KOSTRZEWA, M.; RIEGEL, P.; PREVOST, 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.

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.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES (OIE). **The animal health and production compendium: manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals**. paris: office international des épizzories. 2010. Disponível em: <http://www.cabi.org/ahpc/default.aspx?site=160&page=3323>>. Acesso em: dezembro de 2012.

PATEL, R. MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. **Clinical Chemistry**, v. 59, p. 340–342, 2013.

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

SCHUBERT, S.; WEINERT, K.; WAGNER, C.; GUNZL, B.; WIESER, A.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, p. 701–706, 2011.

SCOLA, B.; RAOULT, D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. **Plos One**, v. 4, n.11, p. 8041, 2009.

SEGAWA, S.; SAWAI, S.; MURATA, S.; NISHIMURA, M.; BEPPU, M.; SOGAWA, K.; WATANABE, M.; SATOH, M.; MATSUTANI, T.; KOBAYASHI, M.; IWADATE, Y.; KUWABARA, S.; SAEKI, N.; NOMURA, F. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. **Clinica Chimica Acta**, v. 435, p. 59–61, 2014.

STEVENSON, L. G.; DRAKE, S. K.; MURRAY, P. R. Rapid Identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 444–447, 2010.

5 CONCLUSÃO GERAL

A identificação de bactérias experimentalmente inoculadas em amostras de leite para a identificação direta no leite por MALDI-TOF MS sem necessidade de cultivo para isolamento de colônias foi possível quando as amostras apresentaram contagem $\geq 10^6$ ufc/mL para *Staphylococcus aureus*, $\geq 10^7$ ufc/mL para *Escherichia coli*, e $\geq 10^8$ ufc/mL para *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*.

A identificação direta de microrganismos causadores de mastite pela análise do MALDI-TOF MS em amostras de leite de quartos mamários de vacas mesmo com a pré-incubação não foi possível, devido à baixa sensibilidade diagnóstica do método de identificação direta MALDI-TOF MS.

O MALDI-TOF MS permitiu a identificação da maioria das bactérias patogênicas cultivadas em placas de ágar a partir de colônias. A identificação de patógenos por meio de análise direta do leite não proporcionou uma identificação instantânea, uma vez que foi necessário uma pré-incubação. Esta pré-incubação favoreceu o crescimento de bactérias presentes no leite, como por exemplo, *Lactobacillus*, o que interferiu diretamente na baixa sensibilidade diagnóstica do método MALDI-TOF MS.

REFERÊNCIAS

- ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.47, p. 219-225, 1975.
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2003.
- AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, p. 28–36, 1998.
- BAL, E. B. B.; BAYAR, S.; BAL, M. A. Antimicrobial susceptibilities of Coagulase-negative Staphylococci (CNS) and Streptococci from bovine subclinical mastitis cases. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 267-274, 2010.
- 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.
- BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; BRAGA, P. A. C.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖETTCHE, V.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Nonculture-based identification of bacteria in milk by protein fingerprinting. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2739-2745, 2012.
- BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖETTCHE, V.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Rapid and comprehensive identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5661-5667, 2010.
- BERGLUND, I.; PETTERSON, G.; OSTENSSON, K.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Quarter milking for improved detection of increased SCC. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 42, p. 427-432, 2007.
- BEXIGA, R.; PEREIRA, H.; LEITÃO, A.; CARNEIRO, C.; ELLIS, K. A.; VILELE, C. L. Observed reduction in recovery of *Corynebacterium* spp. From bovine milk sample by use of a teat cannula. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 9-14, 2011.
- BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiologic Infect**, v. 16, p. 1614–1619, 2010.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *International Journal of Nursing Studies*, v. 47, n. 8, p. 931-936, 2010.
- BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. 2. ed. Faltalocal: CAB International, 2010. p. 266.
- BLUM, S. E.; HELLER, E. D.; LEITNER, G. Long term effects of *escherichia coli* mastitis. **The Veterinary Journal**, 201, p. 72–77, 2014.

BOTARO, B. G.; CORTINHAS, C. S.; MARÇO, L. V.; MORENO, J. F. G.; SILVA, L. F. P.; BENITES, N. R.; SANTOS, M. V. Detection and enumeration of *Staphylococcus aureus* from bovine milk samples by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6955-6964, 2013.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 116-128, 2002.

BRADLEY, A.; GREEN, M. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. **Farm Animal Practice**, v. 27, p. 310-315, 2005.

BRAGA, P. A. C.; TATA, A.; SANTOS, V. G.; BARREIRO, J. R.; SCHWAB, N. V.; SANTOS, M. V.; EBERLIN, M. N.; FERREIRA, C. R. Bacterial identification: from the agar plate to the mass spectrometer. **RSC ADV**, v. 3, p. 994-1008, 2013.

BRITTEN, A. M. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. **Veterinary Clinics of North American: food animal practice**, v. 28, p. 187-202, 2012.

CAPURRO, A.; ARTURSSON, K.; WALLER, K. P.; BENGTSON, B.; ERICSSON-UNNERSTAD, H.; ASPÁN, A. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and *tuf* gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococcus isolated from cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3-4, p. 327-333, 2009.

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.

CHANG, Y. M.; GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livestock Production Science**, v. 88, n. 3, p. 251-261, 2004.

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.

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. **Applieid and Environmental Microbiology**, n. 70, p. 475-482, 2004.

DIECKMANN, R.; GRAEBER, I.; KAESLER, I.; SZEZYK, 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). **Applieid 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.

DOBRANIC, V.; NJARI, B.; SAMARDZIJA, M.; MIOKOVIC, B.; RESANOVIC, R. The influence of the season on the chemical composition and the somatic cell count of bulk tank cow's milk. **Veterinarski Arhiv**, v. 78, n. 3, p. 235-242, 2008.

DOHOO, I. R.; SMITH, J.; ANDERSEN, S.; KELTON, D. F.; GODDEN, S. Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 250-61, 2011.

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. 704-2709, 1998.

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

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.

FERREIRA, L.; SÁNCHEZ-JUANES, F.; GONZÁLEZ-ÁVILA, M.; CEMBRERO-FUCINOS, D.; HERRERO-HERNÁNDEZ, A.; GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M.; MUNOZ-BELLIDO, J. L. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2110-2115, 2010.

FERRONI, A.; SUAREZ, S.; BERETTI, J.; DAUPHIN, B.; BILLE, E.; MEYER, J.; BOUGNOUX, M.; ALANIO, A.; BERCHE, P.; NASSIF, X. Real-time identification of bacteria and *candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1542-1548, 2010.

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.

GONÇALVES, J. L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; FERREIRA, C. R.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Veterinary Microbiology**, v. 173, p. 147-151, 2014.

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.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. **Mass spectrometry—principles and applications**. 3 ed. England: Wiley-Interscience, 2007.

HOGVEEN, H.; HUIJS, K.; LAM, T. J. G. M. Economic aspects of mastitis: new developments. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 16-23, 2011.

HOLLAND, R. D.; WILKES, J. G.; RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; PERSONS, C. C.; VOORHEES, K. J.; LAY, 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. **Veterinary Journal**, v. 168, p. 65-73, 2004.

HOVINEN, M.; PYORALA, S. Invited review: udder health of dairy cows in automatic milking. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 547–562, 2011.

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.; 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.

KEANE, O. M.; BUDD, K. E.; FLYNN, J.; MCCOY, F. Increased detection of mastitis pathogens by real-time PCR compared to bacterial culture. **Veterinary Record**, v. 10, 2014.

KOK, J.; THOMAS, L. C.; OLMA, T.; CHEN, S. C. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry. **PLoS One**, v. 6, p. 23285, 2011.

LAGACÉ-WIENS, P. R. S.; ADAM, H. J.; KARLOWSKY, J. A.; NICHOL, K. A.; PANG, P. F.; GUENTHER, J.; WEBB, A. A.; MILLER, C., ALFA, M. J. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. **Journal Clinical Microbiology**, v. 50, n. 10, p. 3324, 2012.

LARTIGUE, M. F.; HÉRY-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.

LESLIE, K. E.; PETERSSON-WOLFE, C. S. Assessment and management of pain in dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 28, p. 289-305, 2012.

LINDMARK-MANSSON, H.; BRANNING, C.; ALDEN, G.; PAULSSON, M. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. **Internacional Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 717-727, 2006.

LOONEN, A. J. M.; JANSZ, A. R.; BERGLAND, J. N. B.; VALKENBURG, M.; WOLFFS, P. F. G.; VAN DEN BRULE, A. J. C. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococcus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1437-1439, 2012.

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

MALEK DOS REIS, C. B.; BARREIRO, J. R.; MORENO, J. F.; PORCIONATO, M. A.; SANTOS, M. V.. Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4406– 4412, 2011.

MARKLEIN, G.; JOSTEN, M.; KLANKE, U.; MÜLLER, E.; HORRÉ, 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.

MEEH, C.; NEUVILLE, F.; DESCY, J.; HUYNEN, P.; HAYETTE, M.; MOL, P.; MELIN, P.. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1511–1516, 2012.

MELLMANN, A.; BIMET, F.; BIZET, C.; BOROVSKAYA, A. D.; DRAKE, R. R.; EIGNER, U.; FAHR, A. M.; HE, Y.; ILINA, E. N.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; MANCINELLI, L.; MOUSSAOUI, W.; PRÉVOST, G.; PUTIGNANI, L.; SEACHORD, C. L.; TANG, Y. W.; HARMSSEN, D. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3732-3734, 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.

MOUSSAOUI, W.; JAULHAC, B.; HOFFMANN, A. M.; LUDES, B.; KOSTRZEWA, M.; RIEGEL, P.; PRÉVOST, 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.

NAGIB, S.; RAU, J.; SAMMRA, LAMMLER, C.; SCHLEZ, K.; ZSCHOCK, M.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; KLEIN, G.; ABDULMAWJOOD, A. Identification of *Trueperella pyogenes* Isolated from Bovine Mastitis by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Plos One**, v. 9, p. 104654, 2014.

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.

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.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. (OIE). **The animal health and production compendium: manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals**. Paris: Office International Des Épipizooties. 2010. Disponível em: <http://www.cabi.org/ahpc/default.aspx?site=160&page=3323>>. Acesso em: dezembro de 2012.

OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effect of mastitis on milk compositional quality. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 3, p. 237-242, 2007.

OLIVER, S. P. O.; GONZALEZ, R. N.; HOGAN, J. S.; JAYARAO, B. M.; OWENS, W. E. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of

milk quality. In: OLIVER, S. P. O. **A global organization for mastitis control and milk quality**. 4. ed. Verona, WI: National Mastitis Council Inc., 2004. p. 1–47, 44–46.

PANKEY, J. W.; DRECHSLER, P. A.; WILDMAN, E. E. Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1550–1552, 1991.

PARADIS, M. E.; BOUCHARD, E.; SCHOLL, D. T.; MIGLIOR, F.; ROY, J. P. Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative *Staphylococcus* intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n.7, p. 2989–2997, 2010.

PATEL, R. MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. **Clinical Chemistry**, v. 59, p. 340–342, 2013.

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.

PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYOROLA, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001 – Prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2433–2441, 2004.

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.

PYORALA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, 5, p. 564–578, 2003.

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

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiology Research**, v. 166, p. 99–110, 2011.

RATO, M.; ROLO, D.; BEXIGA, R.; NUNES, S. F.; CAVACO, L. M.; VILELA, C. L.; SANTOS-SANCHES, I. Antimicrobial resistance patterns and genotypes of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dysgalactiae* from bovine mastitis in Portuguese dairy farms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 265–266, 2007.

REINOSO, E. B.; LASAGNO, M. C.; DIESER, S. A.; ODIERNO, L. M. Distribution of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 318, n. 2, p. 183–188, 2011.

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.

RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 28, n. 2, p. 149–163, 2012.

- 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. 54f. 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, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Principais agentes causadores da mastite. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** 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.
- SCHEPERS, A. J.; LAM, T. J. G. M.; SCHUKKEN, Y. H.; WILMINK, J. B. M.; HANEKANP, W. J. A. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1833-40, 1997.
- SCHUBERT, S.; WEINERT, K.; WAGNER, C.; GUNZL, B.; WIESER, A.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, p. 701–706, 2011.
- SCHUKKEN, Y. H.; GONZÁLES, R. N.; TIKOFSKY, L. L.; SCHULTE, H. F.; SANTISTEBAN, C. G.; WELCOOME, F. L.; BENNETT, G. J.; ZURAKOWSKI, M. J.; ZADOKS, R. G. CNS mastitis: nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 9-14, 2009.
- SCHUKKEN, Y. H.; LEEMPUT, E. S. D.; MORONI, P.; WELCOME, F.; GURJAR, A.; ZURAKOWSKI, M.; GUTIERREZ, C.; CEBALLOS, A.; ZADOKS, R. **Contagious or environmental – a herd diagnosis.** In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 27., 2012, Lisboa, Portugal. [Abstract...]. Lisboa: Associação Portuguesa de Buiatria, 2012. p. 145-148.
- SCOLA, B.; RAOULT, D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. **Plos One**, v. 4, n. 11, p. 8041, 2009.

SEGAWA, S.; SAWAI, S.; MURATA, S.; NISHIMURA, M.; BEPPU, M.; SOGAWA, K.; WATANABE, M.; SATOH, M.; MATSUTANI, T.; KOBAYASHI, M.; IWADATE, Y.; KUWABARA, S.; SAEKI, N.; NOMURA, F. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. **Clinica Chimica Acta**, v. 435, p. 59–61, 2014.

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 of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1061-1069, 2010.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-offlight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 543–551, 2009.

SENG, P.; ROLAIN, J. M.; FOURNIER, P. E.; LA SCOLA, B. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. **Future Microbiology**, v. 5, p. 1733–1754, 2010.

SHARIF, A.; MUHAMMAD, G. Somatic cell count as an indicator of udder health status under modern dairy production: a review. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 28, n. 4, p. 194-200, 2008.

SHARMA, N.; RHO, G. J.; HONG, Y. H.; KANG, T. Y.; LEE, H.K.; HUR, T. Y.; JEONG, D. K. Bovine mastitis: an Asian prespective. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 6, p. 454-476, 2012.

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

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**, v. 96, p. 91-102, 2003.

SOUZA, M. S. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 2008. 164p. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

STEVENSON, L. G.; DRAKE, S. K.; MURRAY, P. R. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 444–447, 2010.

SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; ZADOKS, R. N.; VANEECHOUTTE, M.; PIEPERS, S.; DE Vlieghe, S. Some coagulase-negative Staphylococcus species affect udder health more than others. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2329-2340, 2011.

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.

THORBERG, B. M.; DANIELSSON-THAM, M. L.; EMANUELSON, U.; PERSSON WALLER, K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4962-4970, 2009.

TOMAZI, T.; GONCALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; SILVA, L. F. P. E.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization -- time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 1658-1663, 2014.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHALLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2402-2111, 1999.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends Biotechnology**, v. 27, p. 486–493, 2009.

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

WATTS, J. L.; LOWERY, D. E.; TEEL, J. F.; ROSSBACH, S. Identification of corynebacterium bovis and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2373-2379, 2000.

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.; GONZÁLES, R. N., DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2592-2598, 1997.

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.

WYDER, A. B.; BOSS, R.; NASKOVA, J.; KAUFMANN, T.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Streptococcus spp. And related bacteria: their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis – a molecular approach. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. 349-357, 2011.

ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; WELLENBERG, G. J.; GROHN, Y. T.; SCHUKKEN, Y. H. Cow and quarter level risk factors for Streptococcus uberis and Staphylococcus aureus mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 12, p. 2649-2663, 2011.

ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; HAGENAARS, T. J.; BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H. A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. **Epidemiology and Infection**, v. 129, p. 397-416, 2002.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R.; MCDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, p. 357-372, 2011.

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

Proteomics 2012, 00, 1–7

DOI 10.1002/pmic.201200053

1

RESEARCH ARTICLE

Nonculture-based identification of bacteria in milk by protein fingerprinting

Juliana Regina Barreiro¹, Patricia Aparecida Campos Braga^{1,2}, Christina Ramires Ferreira², Markus Kostrzewa³, Thomas Maier³, Beatrix Wegemann³, Viktoria Böettcher³, Marcos N. Eberlin² and Marcos Veiga dos Santos^{1*}

¹School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil

²Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas – UNICAMP Campinas, São Paulo, Brazil

³Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany

Traditional methods for bacterial identification include Gram staining, culturing, and biochemical assays for phenotypic characterization of the causative organism. These methods can be time-consuming because they require *in vitro* cultivation of the microorganisms. Recently, however, it has become possible to obtain chemical profiles for lipids, peptides, and proteins that are present in an intact organism, particularly now that new developments have been made for the efficient ionization of biomolecules. MS has therefore become the state-of-the-art technology for microorganism identification in microbiological clinical diagnosis. Here, we introduce an innovative sample preparation method for nonculture-based identification of bacteria in milk. The technique detects characteristic profiles of intact proteins (mostly ribosomal) with the recently introduced MALDI SepsiType™ Kit followed by MALDI-MS. In combination with a dedicated bioinformatics software tool for databank matching, the method allows for almost real-time and reliable genus and species identification. We demonstrate the sensitivity of this protocol by experimentally contaminating pasteurized and homogenized whole milk samples with bacterial loads of 10^3 – 10^8 colony-forming units (cfu) of laboratory strains of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus aureus*. For milk samples contaminated with a lower bacterial load (10^4 cfu mL⁻¹), bacterial identification could be performed after initial incubation at 37°C for 4 h. The sensitivity of the method may be influenced by the bacterial species and count, and therefore, it must be optimized for the specific application. The proposed use of protein markers for nonculture-based bacterial identification allows for high-throughput detection of pathogens present in milk samples. This method could therefore be useful in the veterinary practice and in the dairy industry, such as for the diagnosis of subclinical mastitis and for the sanitary monitoring of raw and processed milk products.

Received: February 10, 2012

Revised: April 24, 2012

Accepted: April 30, 2012

Keywords:

Bacteria / Mass spectrometry / Microbiology / Microorganisms / Protein biomarker

1 Introduction

Classical methods for microorganism identification based on sample streaking, colony growth in different media, and expert morphological or biochemical identification have remained unchanged for long time. Over the past decade,

Correspondence: Professor Marcos N. Eberlin, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP-40 CP 6154, Cidade Universitária, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil
E-mail: eberlin@iqm.unicamp.br
Fax: +55 (019) 3521-3073

Abbreviations: cfu, colony-forming units; SOC, somatic cell count

* Additional corresponding author: Professor Marcos Veiga dos Santos, E-mail: mveiga@iqm.unicamp.br

Colour Online: See the article online to view Figs. 1 and 2 in colour.