

Avaliação de protocolos cultura-independentes para identificação de *Staph. aureus* causador de mastite subclínica por MALDI-TOF MS

Manoela Franke¹, Letícia Cassano¹, Carlos E. Fidelis², Marcos V. dos Santos², Juliano L. Gonçalves²

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ Universidade de São Paulo; ² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ Universidade de São Paulo

manoelafranke@usp.br

Objetivos

O estudo objetivou a avaliação de quatro protocolos cultura-independentes (direto do leite) para identificação de *Staphylococcus aureus* causador de mastite subclínica por MALDI-TOF MS.

Métodos e Procedimentos

Amostra composta de leite oriunda de caso de mastite subclínica (CCS > 200×10³ cels/mL) e cultura positiva para *Staph. aureus* (CBT > 10 UFC/mL) foi selecionada para a avaliação de protocolos de identificação por MALDI-TOF MS. Quatro protocolos foram avaliados utilizando: (i) beads de zircônia+TE; (ii) beads de granada+TE; (iii) beads de zircônia+PBS; (iv) beads de granada+PBS. Brevemente, 400 µL de leite foram centrifugados por 1 min à 13000 rpm (igual para as demais etapas). O pellet foi ressuspensionado em 200 µL de TE ou PBS e submetido a centrifugação. Após, o pellet foi lavado com 100 µL de TE ou PBS e transferido para microtubo contendo 30 mg de beads de zircônia ou granada. Em seguida, o microtubo foi alocado em disruptor para extração das proteínas ribossomais bacterianas por 10 min à 4000 rpm. Por fim, após 1 h de decantação, 1 µL do extrato (sobrenadante) foi aplicado no spot da placa MALDI-TOF seguido da aplicação de 1 µL ácido fórmico 70% e 1 µL de matriz HCCA. A leitura da placa foi realizada de acordo com as especificações para identificação (escore > 2) como descrito por Barcelos et al. (2019) e o processamento por meio do software MALDI Biotyper 4.1.70 (biblioteca MBT versão 7311 MPS).

Resultados

Não foi possível obter espectros via Flexcontrol 3.4 usando a função automática. Portanto, os

espectros foram obtidos por função manual. Apenas os protocolos contendo beads de granada ou zircônia associada a lavagem com PBS apresentaram escore >2 (Figura 1).

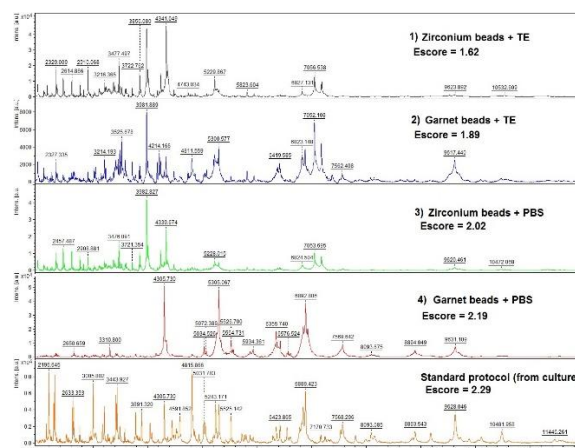


Figura 1: Espectros de massa de *Staph. aureus* dos quatro protocolos de extração avaliados em comparação ao protocolo padrão.

Considerações Finais

A MALDI-TOF MS associada ao protocolo por beads e PBS possibilita a identificação de *Staph. aureus* direto de amostras de leite. Portanto, comparado a metodologia convencional, é possível a obtenção de diagnóstico rápido (após 4 h) e confiável (escore >2), sem a necessidade de cultura microbiológica. Os próximos ensaios terão como objetivo a avaliação da repetibilidade dos protocolos em ampla escala laboratorial.

Referências Bibliográficas

BARCELOS, M. M et al. On-plate extraction protocol for identification of mastitis bacteria by MALDI-TOF MS. *Braz. J. Microbiol.*, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00110-5>

Evaluation of non-culture-based protocols for identification of *Staph. aureus* subclinical mastitis-causing by MALDI-TOF MS

Manoela Franke¹, Letícia Cassano¹, Carlos E. Fidelis², Marcos V. dos Santos², Juliano L. Gonçalves²

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ Universidade de São Paulo; ² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ Universidade de São Paulo

manoelafranke@usp.br

Objective

This study aimed to compare four non-culture-based protocols (direct milk samples) for identification of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis-causing by MALDI-TOF MS.

Material and Methods

A milk composite sample obtained from one subclinical mastitis case (CCS > 200×10³ cels/mL) with culture-positive result for *Staph. aureus* (CBT > 10 UFC/mL) was selected for our proposed evaluation of testing extraction protocols by MALDI-TOF MS. Four protocols were evaluated: (i) zirconium beads+TE; (ii) garnet beads+TE; (iii) zirconium beads+PBS; and (iv) garnet beads+PBS. Briefly, 400 µL of milk were centrifuged at 13000 rpm during 1 min (equal for all centrifugations steps). The pellet was resuspended in 200 µL of TE or PBS and an extra centrifugation step was performed. After that, the pellet was washed with 100 µL of TE or PBS and transferred to a microtube containing 30 mg of garnet or zirconium beads. Then, the microtube was allocated in a disruptor for extraction of bacterial ribosomal proteins at 4000 rpm during per 10 min. Lastly, after 1 h of decantation, 1 µL of the extract (supernatant) was applied to the MALDI-TOF plate, followed by the application of 1 µL of formic acid (70%) and 1 µL of HCCA matrix. The analysis was performed according to the standard specifications and the processing was done using the MALDI Biotyper 4.1.70 computer software (MBT version 7311 MPS library) considering identification species level with score > 2 as described by Barcelos et al. (2019).

Results

It was not possible to obtain all spectra using the automatic function by Flexcontrol 3.4. Therefore,

all spectra were obtained by manual function. Only PBS reagent used as washing step allowed score >2 (Figure 1).

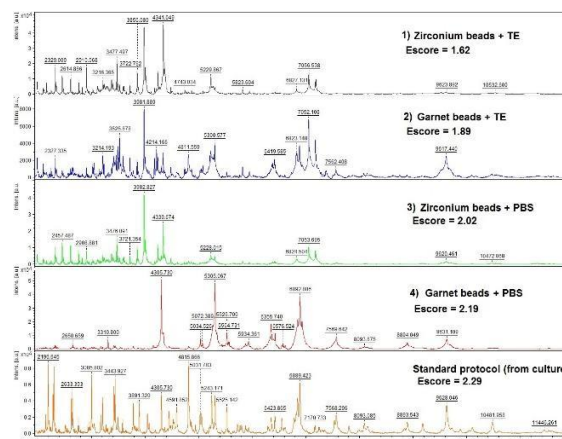


Figure 1: Mass spectra of *Staph. aureus* from all four evaluated extraction protocols in comparison with the standard protocol.

Final considerations

The extraction protocol by beads and PBS associated with MALDI-TOF MS made possible the identification of *Staph. aureus* directly from milk samples (non-culture-based). Therefore, it is possible to obtain a reliable (score >2) and a rapid diagnose (after 4 h) in comparison to the conventional microbiology. In the following steps, the protocols repeatability will be evaluated in a large-scale laboratory routine.

References

BARCELOS, M. M et al. On-plate extraction protocol for identification of mastitis bacteria by MALDI-TOF MS. **Braz. J. Microbiol.**, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00110-5>