



USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF) COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE DIAGNÓSTICO EM BACTERIAS DO GÊNERO FLAVOBACTERIUM

XVII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, 1ª edição, de 04/10/2023 a 06/10/2023
ISBN dos Anais: 978-65-5465-040-3

COSTA; Henrique Lopes¹, SARMIENTO; Peter Charrie Janampa², PEREIRA; Felipe Luiz³, TAVARES; Guilherme Campos⁴, FIGUEIREDO; Henrique César Pereira⁵

RESUMO

Devido a recente reclassificação taxonômica da espécie *F.columnare*, esta foi dividida em 4 novas espécies: *F.columnare*, *F.davisii*, *F.covae* e *F.oreochormis*. A determinação da espécie é realizada através da PCR-Multiplex de Genótipo de *Flavobacterium columnare* (LaFrentz et. al, 2022). Contudo, a identificação bacteriana por MALDI-TOF MS se apresenta como um potencial método rápido, específico, altamente eficaz e de menor custo. Embora o banco de dados fornecido com o equipamento contenha *Main Spectra Profile* (MSP) de mais 7000 espécies bacterianas, para algumas espécies patogênicas para peixes esses dados são ausentes, portanto, o objetivo desse trabalho foi validar e avaliar a identificação de *Flavobacterium* spp. através da técnica de MALDI-TOF MS como método alternativo de diagnóstico. Para tal, 28 cepas do gênero *Flavobacterium*, isoladas de diferentes espécies de peixes dos estados (AM, MG, MT, RO e SP), foram selecionadas dos bancos AQUAVET (Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos) assim como, as cepas de referência ATCC23463 e ATCC49512. As cepas já haviam sido previamente classificadas pela PCR-Multiplex para determinação da espécie. Como forma de possibilitar a identificação das cepas pela técnica de MALDI-TOF, o primeiro passo foi incluir um MSP de cada uma das 4 espécies de *Flavobacterium*. As cepas de referência passaram por uma extração proteica acordando com as recomendações do fabricante. O extrato obtido foi adicionado em 8 pontos diferentes da placa de aço inox e após secagem colocou-se 1µL da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Foi realizada leitura em triplicata de cada ponto tendo como finalidade obter 24 espectros que então foram analisados pelos softwares FlexAnalysis e MALDI.Biotyper.3 dando origem aos MSPs de cada cepa. A leitura clínica de todas as cepas foi realizada em duas etapas, uma antes e outra após a inclusão dos MSPs. As 30 cepas foram colocadas individualmente em pontos de identificação da placa de aço inox e posteriormente adicionou-se ácido fórmico (70%) e a matriz HCCA. Os espectros foram obtidos com o software FlexControl. Foi considerado como critério de pontuação para confirmação da espécie, escores ≥ 2.000 , escores > 1.700 e < 2.000 apontam uma identificação relativa ao gênero, já os escores < 1.700 são considerados como ausência de identificação confiável. Comparações entre o método de identificação MALDI-TOF MS e PCR-Multiplex foram feitos com o software R versão.4.2.3 (R Core Team, 2023) com as taxas de concordância determinadas pelo coeficiente Kappa ($p < 0.05$). Previamente a inclusão dos MSPs todas as cepas obtiveram escores abaixo de 1.700. Posteriormente a inclusão dos MSPs, todas as cepas foram identificadas com escores mínimo de 2.022 e máximo de

¹ Universidade Federal de Minas Gerais , henriquelopes.costa17@gmail.com

² Universidade Federal de Minas Gerais , peterjs_0126@hotmail.com

³ Universidade Federal de Minas Gerais , felipe@flpsw.com.br

⁴ Universidade Federal de Minas Gerais , gcamposvet@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Minas Gerais , figueiredoh@yahoo.com

2.601. As espécies *F.oreochromis* e *F.covae* foram identificadas em 66% e 20% das cepas respectivamente, ambas as espécies *F.davisii* e *F.columnare* foram apontadas em 7% delas. Os dados gerados pelo método de MALDI-TOF MS corroboram com a PCR-Multiplex. Ambos os métodos apresentaram desempenho de 100% para identificação de espécies do gênero *Flavobacterium*, e o coeficiente Kappa igual a 1.0. Conclui-se que o MALDI-TOF MS possui mesma eficácia da PCR-Multiplex podendo ser utilizado para diagnóstico e determinação da espécie em bactérias do gênero *Flavobacterium* patogênicas para peixes.

PALAVRAS-CHAVE: Bacteriologia clínica, Columnariose, Proteômica

¹ Universidade Federal de Minas Gerais , henriquelopes.costa17@gmail.com

² Universidade Federal de Minas Gerais , peterjs_0126@hotmail.com

³ Universidade Federal de Minas Gerais , felipe@flpsw.com.br

⁴ Universidade Federal de Minas Gerais , gcampovet@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Minas Gerais , figueiredoh@yahoo.com