

Diversidade proteica em agentes de importância na mastite bovina

T. V. F. Martins¹, A. P. Martino¹, M. M. C. Granja¹, R. S. Meireles¹, D. L. Santos¹ and J. L. Santos¹

¹ MICROVET-Microbiologia Veterinária Especializada, Viçosa- MG, Brasil

Introdução

A mastite é uma das principais doenças que acometem rebanhos leiteiros bovinos no mundo, causando prejuízos econômicos graves tanto ao produtor quanto à indústria de laticínios (Ruegg, 2017). No Brasil, a perda anual causada pela mastite subclínica é estimada em até 1,75 bilhão de litros, cerca de 5% da produção total de leite do País (Santos et al., 2019).

Mais de 80 diferentes microrganismos foram identificados como agentes causadores de mastite bovina. Dentre essas bactérias, são frequentemente isoladas *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus*.

Espectrometria de massas vêm ganhando destaque para a identificação de espécies bacterianas. A grande variação na expressão de enzimas metabólicas, proteínas envolvidas na adesão e/ou invasão celular e variações na expressão das proteínas ribossômicas, alvo de detecção pelo MALDI-TOF MS, garantem adaptabilidade dos agentes. Desta forma, o emprego desta ferramenta auxilia na identificação da variabilidade que podem ser interpretadas para decisões de intervenção (Lartigue et al., 2009).

Dada a importância destes patógenos na cadeia produtiva leiteira foi proposto o estudo da diversidade proteica dos isolados de maior prevalência nas mastites bovinas. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar a análise da diversidade de proteínas em *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. uberis*, a partir de amostras de três estados brasileiros: Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES) e Paraná (PR).

Material e métodos

S. agalactiae, *S. uberis* e *S. aureus* foram isolados no laboratório de Diagnóstico da MicroVet, a partir de amostras de leite provenientes de MG, ES e PR. Os isolados foram submetidos à análise por espectrometria de massas MALDI-TOF (Microflex) para identificação do perfil protéico. Três colônias isoladas foram capturadas e adicionadas aos poços da placa do equipamento. Na colônia foi adicionado 1 µL de ácido fórmico a 70%, seguido da 1 µL de matriz HCCA. Os espectros foram capturados e comparados com picos de referência (MSP) da biblioteca integrada do In Vitro Diagnostic (IVD). Os dendrogramas dos perfis foram construídos com o programa estatístico Matlab 7.1 integrado ao programa MALDI Biotyper 3.1, com os parâmetros: medida de distância por correlação e ligação por média, normalizada entre a distância 0 (concordância total) e 1000 (sem concordância). A medida de distância foi definida em correlação e o link foi definido em média.

Resultados e discussão

Os resultados das análises espectrais de cada um dos isolados avaliados estão presentes na figura 1. Para os isolados de *S. aureus* podemos observar a formação de dois grandes grupos principais (Grupo 1 e 2) com distanciamento total do conteúdo proteico ribossomal (Figura 1A). O grupo 1 foi dividido em dois subgrupos, formado por dois isolados do ES (subgrupo 1.1 e subgrupo 1.2) e um do PR (subgrupo 1.2). Pode ser observado que o conteúdo protéico da AM4 do ES é altamente divergente em relação ao isolado AM2 e AM14 do ES e PR, respectivamente. Os isolados de MG apresentaram uma maior similaridade do conteúdo proteico, com distanciamento menor que 300 para todos os isolados avaliados. Para os isolados de *S. agalactiae*, também foi observada a formação de dois grandes grupos com distanciamento total (Figura 1B). O grupo 1 compreendeu a maioria dos isolados, sendo composta pelos isolados dos três estados. Neste grupo foram formados dois subgrupos com grande divergência de conteúdo proteico. O subgrupo 1.1 foi constituído por quatro isolados de MG e quatro do PR. O subgrupo 1.2 compreendeu isolados do ES. O grupo 2 foi

constituído por quatro isolados representantes dos três estados analisados.

Para *S. uberis* a análise espectral mostrou uma grande variabilidade proteica entre os isolados (Figura 1C). Houve também a formação de 2 grupos com total divergência do conteúdo proteico. O grupo 1 foi dividido em dois subgrupos com conteúdo protéico altamente divergentes, sendo constituído pelos isolados AM1 do ES, compondo o subgrupo 1.1 e, pelos isolados AM 10 e AM14 de MG e PR (subgrupo 1.2), respectivamente. O grupo 2 apresentou isolados dos três estados que se distribuíram em diferentes subgrupos com alta variabilidade entre eles. Os isolados AM12 e 15 do PR apresentaram conteúdo proteico mais similar entre si.

Na literatura, é relatada a alta variabilidade genética dos isolados causadores de mastite associada aos genes de virulência (Gonçalves et al., 2023). Porém, a análise da diversidade do perfil proteico ribossomal de espécies causadoras de mastite bovina também pode destacar a variabilidade dos isolados, como pode ser visto no presente trabalho (figura 1).

De modo geral, a alta diversidade do conteúdo proteico dos isolados avaliados reflete a alta capacidade adaptativa desses microrganismos em sobreviver às condições impostas no ambiente da fazenda e aumentar as chances de colonização do hospedeiro causando a patogenia. A avaliação microbiológica periódica nas fazendas é importante para o controle de zoonoses, e uma alternativa à utilização de antibióticos é o uso de vacinas autógenas, permitindo a prevenção de surtos, contribuindo para a sanidade do rebanho e mantendo a produção leiteira dos animais.

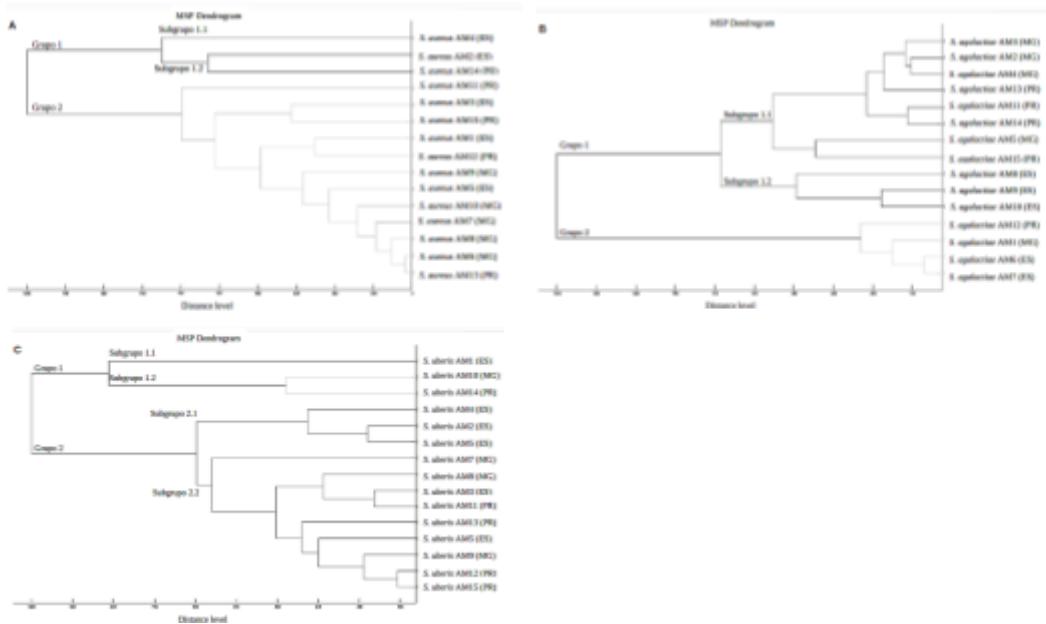


Figura 1 - Dendrogramas dos perfis protéicos dos principais agentes causadores de mastite bovina (A) *S. aureus* (B) *S. agalactiae* e (C) *S. uberis*. Perfis gerados usando MALDI Biotype.

Agradecimentos

À Empresa MicroVet - Microbiologia Veterinária Especial.

Referências

- Ruegg, P. L. 2011. Detection, management and prevention of mastites: review 100-year. *J Dairy Sci.* 100: 10381–97. <http://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>.
- Santos, M. V. and L. F. L Fonseca. 2019. Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções. 1ed. Edição dos autores.
- Lartigue, M. F. G. Héry-Arnaud, E. Haguenoer, A. S. Domelier, P. O. Schmit, N. van der

Mee-Marquet, P. Lanotte, L. Mereghetti, M. Kostrzewa, R. Quentin. 2009. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 47(7):2284-7. doi: 10.1128/JCM.00175-09.

Gonçalves, M. S., E. M. S. Dorneles, M. B. Heineman, M. A. V. Paiva e Brito and A. S. Guimarães. 2023. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. *Cienc. Rural.* 53: 1-11. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210643>.