

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Natasha Cristine Gonçalves

**METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE UHT POR MALDI-
TOF**

Porto Alegre

2021

Natasha Cristine Gonçalves

**METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE UHT POR MALDI-
TOF**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof. Dr^a Gertrudes Corção

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Gonçalves, Natasha Cristine
Metodologias para Análise de Amostras de Leite UHT
por MALDI-TOF / Natasha Cristine Gonçalves. -- 2021.
70 f.
Orientadora: Gertrudes Corção.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. MALDI-TOF. 2. Espectrometria de Massa. 3.
Identificação bacteriana. 4. Leite. 5. Bactérias. I.
Corção, Gertrudes, orient. II. Título.

Natasha Cristine Gonçalves

**METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE UHT POR MALDI-
TOF**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 13 de Dezembro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Mercedes Geimba - UFRGS

Ma. Andréia Monique Lermen - UFRGS

Prof^a. Dr^a Gertrudes Corção - UFRGS

Dedico este trabalho ao único e verdadeiro Deus, Ele é o responsável por todo o meu sucesso, e aos meus pais, pelo amor e pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente e principalmente ao Senhor da minha vida, meu Deus, sem Ele nada poderia fazer.

Agradeço a mamãe e papai, que sempre estiveram comigo e me deram todo o suporte necessário desde sempre.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Gertrudes Corção, pela oportunidade, pelos ensinamentos e por ter me acolhido em seu laboratório desde 2019.

À minha família, por todo apoio e ajuda oferecidos.

Às minhas amigas que conquistei ao longo da graduação, Cinthia, Débora, Gabriela, Mila, Stefani e Thaisla; dividimos choros mas também muitas risadas. Amo estar com vocês.

Aos meus colegas de laboratório, em especial, à Camila que me auxiliou em muitos momentos.

À técnica Ana Carolina Aymone por todos os conselhos e ensinamentos.

A todos que me apoiaram durante esses anos de graduação, muito obrigada!

RESUMO

O MALDI-TOF MS, Espectrometria de Massa de Tempo de Voo por Ionização de Dessorção a Laser Assistida por Matriz, é uma técnica muito utilizada na Microbiologia Clínica para identificar patógenos, principalmente, em amostras de sangue, já que seu uso permite resultados de forma mais rápida, possibilitando o tratamento e diagnóstico corretos do paciente. Estudos vêm sendo feitos para expandir os tipos de amostras que possam ser analisadas pelo MALDI-TOF quanto a sua composição microbiana, como urina, líquido cefalorraquidiano e leite. Entretanto, em algumas, o MALDI-TOF ainda requer o cultivo prévio dos microrganismos para que possam então serem analisados. Para otimizar o tempo de liberação dos resultados, pesquisadores têm testado diversos protocolos de forma a identificar os patógenos diretamente das amostras, pulando a etapa de isolamento dos microrganismos em placa. Isso favorece resultados ainda mais rápidos, resultando em melhor prognóstico dos pacientes. Todavia, para amostras de leite, existem estudos sobre a identificação de microrganismos previamente isolados pelo MALDI-TOF e raros sobre identificação direta da amostra. Diante disso, o presente estudo buscou desenvolver uma metodologia para a identificação direta de microrganismos em amostras de leite UHT pelo MALDI-TOF baseada em uma metodologia de identificação direta de amostras de sangue já publicada e, também, determinar a sensibilidade diagnóstica do MALDI-TOF. Para isso, uma amostra de leite UHT foi contaminada separadamente com nove cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foram utilizadas 3 metodologias diferentes entre si. As metodologias 1 e 2 consistiram em tratar as amostras previamente com saponina a 5%, seguida de uma extração com ácido fórmico e acetonitrila, porém foi utilizado leite semidesnatado no método 1 e leite desnatado no 2. No método 3, as amostras foram tratadas previamente com saponina a 5%, seguido por extração com isopropanol a 75% e extração com etanol etílico absoluto a 75%, ácido fórmico e acetonitrila. Nenhum dos 3 métodos obtiveram resultados de identificação por MALDI-TOF, impossibilitando também, neste caso, a determinação da sensibilidade diagnóstica para esse tipo de amostras. Supõe-se que a não identificação das amostras seja devido à composição complexa do leite, contendo lipídios que não foram solubilizados e removidos pelos métodos de extração. Acredita-se também que as proteínas do leite se sobrepuseram às proteínas das bactérias, impedindo sua detecção. Resta então, desenvolver um protocolo utilizando outro reagente para remover as proteínas e lipídeos do leite para que seja possível a identificação dos microrganismos diretamente do leite pelo MALDI-TOF.

Palavras-chave: MALDI-TOF; espectrometria de massa; identificação bacteriana; leite; bactérias.

ABSTRACT

MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, is a technique widely used in Clinical Microbiology to identify pathogens, mainly in blood samples, as its use allows results faster, enabling the correct treatment and diagnosis of the patient. Studies have been carried out to expand the types of samples that can be analyzed by MALDI-TOF regarding their microbial composition, such as urine, cerebrospinal fluid and milk. However, in some, MALDI-TOF still requires the prior cultivation of microorganisms so that they can then be analyzed. To optimize the time it takes to release the results, researchers have been testing several protocols in order to identify pathogens directly from the samples, skipping the stage of isolating microorganisms on a plate. This favors even faster results, resulting in a better prognosis for patients. However, for milk samples, there are studies on the identification of microorganisms previously isolated by MALDI-TOF and rare on direct identification of the sample. Therefore, the present study sought to develop a methodology for the direct identification of microorganisms in UHT milk samples by MALDI-TOF based on a methodology for direct identification of blood samples already published and also to determine the diagnostic sensitivity of MALDI-TOF. For this, a sample of UHT milk was separately contaminated with nine bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. Three different methodologies were used. Methods 1 and 2 consisted of pre-treating the samples with 5% saponin, followed by extraction with formic acid and acetonitrile, but semi-skimmed milk was used in method 1 and skimmed milk in method 2. In method 3, the samples were pre-treated with 5% saponin, followed by extraction with 75% isopropanol and extraction with 75% absolute ethyl ethanol, formic acid and acetonitrile. None of the 3 methods obtained identification results by MALDI-TOF, also making it impossible, in this case, to determine the diagnostic sensitivity for this type of samples. It is assumed that the non-identification of the samples is due to the complex composition of the milk, containing lipids that were not solubilized and removed by the extraction methods. It is also believed that milk proteins overlapped the bacteria's proteins, preventing their detection. It remains then to develop a protocol using another reagent to remove proteins and lipids from milk so that it is possible to identify microorganisms directly from milk by MALDI-TOF.

Keywords: MALDI-TOF; mass spectrometry; bacterial identification; milk; bacteria.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	9
1.1	MALDI-TOF MS	9
1.2	ANÁLISES DIRETAS PELO MALDI-TOF	12
1.2.1	Amostras de Sangue	12
1.2.2	Amostras de Urina	17
1.2.3	Culturas Mistas	18
1.2.4	Outras Aplicações do MALDI-TOF	19
1.3	MICROBIOTA E PATÓGENOS DO LEITE BOVINO	20
1.4	IDENTIFICAÇÕES DIRETAS DE AMOSTRAS POSITIVAS DE LEITE PELO MALDI-TOF	21
1.5	JUSTIFICATIVA	23
1.6	OBJETIVOS.....	24
1.6.1	Objetivo geral.....	24
1.6.2	Objetivos específicos.....	24
2	ARTIGO CIENTÍFICO	25
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS.....	55

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 MALDI-TOF MS

Para realizar a identificação de microrganismos, existem muitas técnicas já desenvolvidas e utilizadas baseadas na proteômica, no sequenciamento de genes 16S rRNA e 18S rRNA, métodos imunológicos como Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo Real e Multiplex- PCR, ensaio de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) e ensaio metagenômico. Além desses, têm-se os métodos convencionais: cultura em meios microbiológicos e identificação por testes bioquímicos (SINGHAL *et al.*, 2015).

Entretanto, devido a limitações dessas técnicas para a caracterização e a diferenciação do proteoma microbiano, como alto custo, processo demorado e banco de dados reduzido, era necessário um método mais eficaz e veloz (SINGHAL *et al.*, 2015). A espectrometria de massas tem sido utilizada na química por muitos anos, porém, em 1975, Anhalt e Fenselau sugeriram realizar a identificação e caracterização bacteriana por essa técnica (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012). Então, foi desenvolvida a identificação microbiana usando a cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS). Logo, estudos sobre uso de padrões de pico de espectrometria de massa para se analisar o perfil bacterianos começaram a ganhar destaque no meio científico (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

Em 1988, a dessorção a laser suave foi desenvolvida por Koichi Tanaka, esta permite a ionização de proteínas sem destruí-las (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020). Assim, com a evolução da ionização suave e com o desenvolvimento do método de ionização por electrospray (ESI-MS) por B. Fenn, finalmente, em 1995, tornou-se possível desenvolver uma nova ferramenta de espectrometria de massas para detecção de microrganismos a partir de um padrão proteico, o MALDI-TOF MS: Espectrometria de Massa de Tempo de Voo por Ionização de Dessorção a Laser Assistida por Matriz, do inglês, Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (BARBERINO *et al.* 2017, FERREIRA, 2019).

Esse método é capaz de identificar bactérias (de forma precisa em nível de gênero e espécie), fungos e vírus da amostra em questão de uma forma mais rápida, precisa, fácil e econômica que os métodos convencionais, podendo complementar e até substituir essas

técnicas convencionais de identificação de cepas bacterianas e fúngicas (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012; DE CAROLIS *et al.*, 2014).

Para a identificação de microrganismos pelo MALDI-TOF existem os métodos preparatórios por transferência direta (utilizando colônia bacteriana) e por extração de proteínas, utilizando células intactas ou extratos de células. Este último método é indicado para aqueles microrganismos que oferecem mais riscos ou apresentam dificuldades para lisar a parede celular, sendo a transferência direta o método mais fácil e indicado para a microbiologia clínica. Após a semeadura e o crescimento do microrganismo em uma placa de cultura, uma pequena quantidade da amostra é transferida para um *spot* (poço) da placa de metal própria do equipamento e se adiciona a matriz (PATEL, 2015). O método de extração se baseia em tratar uma pequena quantidade da amostra com etanol etílico absoluto e água Milli-Q seguido de extração das proteínas pelo ácido fórmico 70% e acetonitrila; após esse processo, um pequeno volume dessa amostra tratada será colocado na placa de metal, para, por fim, adicionar-se a matriz (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

A matriz utilizada, ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), é composta por uma solução de acetonitrila e ácido trifluoracético, e por absorver a energia do laser, permite a ionização da amostra fornecendo prótons. Nos dois métodos – transferência direta e extração, após se adicionar a matriz no *spot* da placa, ela será cristalizada depois de secar junto com a amostra. A placa então é colocada na câmara de ionização do espectrômetro de massa e é lida pelo equipamento por meio da irradiação do laser, que ioniza as proteínas do microrganismo (SENG *et al.*, 2009; PATEL, 2015; TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

Assim, os *spots* contendo a mistura de amostra com a matriz serão atingidos por um laser que dessorverá e ionizará essas moléculas na forma gasosa. Essas moléculas ionizadas vaporizadas, por sua vez, serão aceleradas em um capo eletrostático e lançadas pelo tubo de vácuo em direção ao detector. Os íons menores alcançam o detector mais rapidamente que os íons maiores. Desse modo, a intensidade do sinal será traduzida em picos, fornecendo o espectro de massa característico (uma impressão digital de cada microrganismo); portanto, espectro de massa representa o número de íons que atingem o detector ao longo do tempo. Cada espectro de massa é caracterizado pela razão massa-carga (m/z), mas, normalmente, a carga é única nessa aplicação (os íons têm carga única), logo a diferenciação é feita pelo peso molecular (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012; PATEL, 2015).

Os picos desses espectros correspondem a proteínas ribossomais, proteínas de ligação a DNA e proteínas de choque frio (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012; TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020). O MALDI-TOF utiliza uma faixa de massa m/z de 2 a

20 kDa, que é normalmente o padrão característico das proteínas ribossômicas mais abundantes (DE CAROLIS *et al.*, 2014; SINGHAL *et al.*, 2015). Os bancos de dados do MALDI-TOF incluem os principais microrganismos patogênicos, assim o espectro obtido será comparado com padrões já estabelecidos para, por fim, identificar o microrganismo, pois cada padrão espectral é específico e característico para cada um (FERREIRA *et al.*, 2010; DE CAROLIS *et al.*, 2014; TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

Segundo a empresa Bruker (2021), além de proteínas, o MALDI-TOF pode detectar outros analitos, como polímeros, oligonucleotídeos e peptídeos. Portanto, com essa nova tecnologia, o processo de identificação microbiano pôde ser encurtado em cerca de 1 dia, sendo vantajoso em comparação com os métodos convencionais (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

Desde o seu desenvolvimento até o momento, novas técnicas e novos protocolos vem sendo produzidos para aprimorar a capacidade de detecção do MALDI-TOF. Por isso, é uma tecnologia estendida para várias finalidades, como, para a tipagem de cepas, detecção e controle microbiológico de água e alimentos, classificação taxonômica, auxilia na detecção de resistência a antibióticos, identificação de microrganismos no sangue, na urina e no líquido cefalorraquidiano, além de identificar agentes utilizados em guerra biológica (SEGAWA *et al.*, 2014; SINGHAL *et al.*, 2015). Um exemplo de aplicações do MALDI-TOF é a detecção de adulteração em alimentos, como misturas de óleo de oliva e óleo de soja e para a determinação dos níveis de leite de vaca em queijos do tipo feta (BRUKER, 2021).

O MALDI-TOF também é capaz de identificar fungos filamentosos e dermatófitos com exatidão (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012). Logo, é uma tecnologia com aplicações em muitas áreas emergentes no campo da microbiologia, gerando uma grande expectativa entre os microbiologistas para novas aplicações (SINGHAL *et al.*, 2015).

Existem dois sistemas com seus próprios bancos de dados que são utilizados para a identificação bacteriana baseados em MALDI-TOF MS: o MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) e o VITEK® MS (bioMérieux). Esses dois sistemas têm algumas diferenças como suas bases de dados, construção dos algoritmos de diagnósticos e modo de apresentação de dados, porém, os princípios analíticos de ambos são similares (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

O sistema Bruker é o mais estudado em publicações (PATEL, 2015). Ele transforma o espectro dos microrganismos em picos, que são comparados com picos dos organismos de referência em seu banco de dados. Uma pontuação em log é gerada, de 0 a 3. Pontuações acima ou igual a 2 são consideradas identificações confiáveis a nível de gênero e provável

espécie. Pontuações entre 2.0 e 1.7 indicam resultado confiável apenas a nível de gênero. E abaixo de 1.7 indica que não foi possível a identificação confiável (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

Apesar disso, o MALDI-TOF possui algumas limitações: banco de dados ainda reduzido, sendo necessária uma atualização constante de sua biblioteca de referência, além do alto custo para obter o equipamento. Entretanto, em alguns casos, como na microbiologia clínica as vantagens superam as dificuldades do equipamento. Sua capacidade de detecção microbiana rápida e eficaz é fundamental para o uso clínico (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012; DE CAROLIS *et al.*, 2014).

1.2 ANÁLISES DIRETAS PELO MALDI-TOF

1.2.1 Amostras de Sangue

Sepse é uma soma de manifestações graves sistêmicas causadas por infecção. A doença é a causa responsável por 25% da ocupação de leitos em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) e a mortalidade chega a 65% no Brasil (ILAS, 2021). Esse quadro leva a falência de múltiplos órgãos, podendo causar o falecimento dos pacientes, sendo as infecções sanguíneas umas das maiores responsáveis pelos casos de óbitos em hospitalizados. Por isso, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade hospitalar tardia no mundo todo (19 milhões de casos são notificados por ano), superando o infarto do miocárdio e o câncer (BARBERINO *et al.*, 2017).

Essa alta mortalidade ocorre principalmente nos pacientes de terapia intensiva em que não houve uma rápida aplicação da terapia antimicrobiana (BARBERINO *et al.*, 2017). Esse atraso no tratamento ocorre devido a prática usual, que é extensa e trabalhosa, nos laboratórios clínicos para o manejo de pacientes suspeitos de infecção na corrente sanguínea: cultura de sangue, seguido por coloração de Gram, subcultura, identificação e teste de suscetibilidade antimicrobiana (SAFFERT *et al.*, 2012). Por isso, devido a urgência desses casos, é necessário um manejo ágil, com uma detecção rápida do patógeno causador da infecção para que se possa prontamente aplicar a terapia mais eficaz, já que o atraso em aplicar o tratamento a cada hora, nesses casos de sepsis, está relacionado à diminuição da sobrevivência de quase 8% dos pacientes (MARCH-ROSSELLÓ *et al.*, 2013).

Na clínica, os microrganismos são classificados pela hemocultura, o padrão-ouro, testes bioquímicos e metabólicos, e, dependendo do microrganismo, pode levar entre 24 a 48

horas ou então semanas para a identificação do patógeno (PASTERNAK, 2012; DE CAROLIS *et al.*, 2014). Isso contribui para o atraso no diagnóstico e no tratamento do paciente, podendo causar a morte dele, já que muitas vezes os pacientes acabam sendo tratados com o antibiótico inadequado. Os laboratórios de microbiologia clínica demandam técnicas de identificação microbiana precisas, baratas, rápidas e confiáveis para que assim a terapia antimicrobiana seja aplicada o quanto antes (SINGHAL *et al.*, 2015).

Por isso, devido à demora entre a coleta das amostras e a disponibilização dos resultados das hemoculturas e visando reduzir a mortalidade, métodos de biologia molecular foram desenvolvidos, como o teste baseado em sonda (PNA-FISH) e PCR, sendo alguns inseridos nas rotinas laboratoriais (DE CAROLIS *et al.*, 2014; BARBERINO *et al.*, 2017).

No cotidiano dos laboratórios, as amostras clínicas são desenvolvidas em meio de cultura para que se possa isolar em colônias os microrganismos. Esses patógenos são analisados pelas suas colônias, coloração de Gram, quantidade de microrganismos e informações clínicas do paciente. Após esse procedimento, os microrganismos podem ser identificados pelo MALDI-TOF (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

Assim, o MALDI-TOF incluído na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica auxiliou e agilizou esse processo, liberando resultados em menos de uma hora (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012). Entretanto, o padrão-ouro utilizado nos laboratórios continua sendo a hemocultura para os casos de infecções da corrente sanguínea, sendo necessário o cultivo do material para que possa, por fim, ser lido pelo equipamento. Todo esse processo até o laudo final leva em torno de 18 a 24 horas, e mesmo sendo otimizado com o MALDI-TOF, ainda é vital para alguns pacientes a redução do tempo para um melhor prognóstico (BARBERINO *et al.*, 2017; PROD'HOM *et al.*, 2020).

Por isso, pesquisas vêm sendo feitas com o propósito de encurtar esse processo de identificação de amostras clínicas (sangue, urina, líquido cefalorraquidiano) pelo MALDI-TOF através de uma identificação direta, ou seja, sem realizar a cultura dos microrganismos.

A identificação de bactérias diretamente de amostras de sangue positivas, ou seja, de frascos de hemocultura (cultura de garrafa de sangue), no entanto, é mais desafiadora devido a interferência analítica. Os componentes celulares, proteínas e cristais podem interferir nos espectros do MALDI-TOF e divergir dos espectros característicos dos microrganismos cultivados em meio de cultura sólido, reduzindo a qualidade dos resultados. Logo, esses componentes devem ser retirados ou reduzidos antes da análise do equipamento (SAFFERT *et al.*, 2012; MARCH-ROSSELLÓ *et al.*, 2013).

Dessa forma, são necessárias etapas de pré-tratamento para separar as células bacterianas dos componentes interferentes. Existem alguns métodos de purificação para preparar as amostras para serem analisadas pelo MALDI-TOF, tais como, centrifugação diferencial, separadores de soro, pré-incubação em meio vendido e indução da lise celular tratando a amostra com detergente, dodecilsulfato de sódio (SDS), saponina, Tween 80, cloreto de amônio e protocolos comerciais: kit SepsiTyper® da Bruker (Bruker Daltonics), o kit de hemocultura VITEK ® MS (bioMérieux) e o kit BACpro ® II (Nittobo Medical Co., Tóquio, Japão) (MARCH-ROSSELLÓ *et al.*, 2013; TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020). O kit SepsiTyper® produz resultados com taxas de identificação precisas, com limite de detecção de $5,9 \times 10^5$ UFC, porém seu uso é limitado devido ao seu alto custo (DE CAROLIS *et al.* 2014; CHIEN *et al.*, 2016).

Na literatura podem ser encontradas algumas técnicas visando esse objetivo, com resultados promissores. Para a identificação de bactérias em caldos de hemocultura positivos, Moussaoui *et al.* (2010) testaram um novo protocolo baseado em tubos de coleta com géis separadores com algumas etapas adicionais de centrifugação e lavagens. No total, foram 503 amostras analisadas e 532 microrganismos identificados, sendo 89,66% de identificações corretas pelo MALDI-TOF. 95,22% das amostras monomicrobianas foram identificadas corretamente em nível de espécie e foi identificada pelo menos uma das espécies presentes na maioria das amostras polimicrobianas (80,9%). Sendo assim, esse protocolo produz resultados favoráveis, auxiliando no encurtamento do tempo para identificação de bactérias isoladas de hemoculturas, reduzindo os custos para o diagnóstico e também auxiliando na escolha do tratamento com antimicrobiano.

Altun *et al.* (2015) realizaram a identificação rápida de bactérias de frascos de hemoculturas positivos pelo MALDI-TOF após incubá-las em meio sólido por 2,5 e 5,5h. Ao comparar com os métodos convencionais, se observou que as taxas de identificação na incubação por 5,5h se equiparam com os resultados obtidos pela identificação direta por frascos de hemocultura. Esse estudo, de no total 515 amostras, identificou com precisão 300 isolados em 2,5h e 424 isolados em 5,5h. Sendo assim, esse método de identificação após cultura de curto prazo se mostrou benéfico para a identificação de microrganismos em frascos de hemocultura que tenham crescimento monomicrobiano, pois é um método confiável, rápido e fácil e não requer reagentes ou kits extras e etapas adicionais. Apenas, possui a limitação de que não foi testado para amostras polimicrobianas.

No estudo de Prod'hom *et al.* (2020) foi desenvolvida uma técnica utilizando cloreto de amônio para lisar as hemácias a fim de preparar um *pellet* bacteriano das hemoculturas

positivas para que possa ser analisado pelo MALDI-TOF. O trabalho obteve 78,7% de identificações dos *pellets*, sendo 96 identificações de 122 no total de hemoculturas positivas. Das 96 identificações, 95 estavam corretas a nível de espécie e 1 estava correta somente a nível de gênero, sendo que nenhum dos resultados obtidos pelas análises do MALDI-TOF discordaram com a identificação pelos métodos convencionais. Em vista disso, esse método com cloreto de amônio é vantajoso para reduzir o tempo e custo das identificações dos agentes etiológicos de infecções da corrente sanguínea. Entretanto, são necessários mais estudos para aprimorar a técnica e confirmar os resultados com mais cepas.

Zhou *et al.* (2017) desenvolveram um protocolo interno em que há etapas de lavagem com SDS e o uso de gel separador para a identificação direta de microrganismos de caldos de hemoculturas positivos, porém utilizando grânulos de vidro para bactérias e utilizando Tween-20 para leveduras. O estudo, então, comparou os resultados obtidos nas análises utilizando o protocolo do kit SepsiTyper® com os resultados obtidos do protocolo interno, sendo os resultados comparáveis entre as duas técnicas. O método interno, embora seja mais trabalhoso e demorado, atingiu resultados precisos em nível de espécie (88,7%) e gênero (3,9%) em todas as amostras de caldo de hemocultura monomicrobianas, porém teve melhor desempenho para as bactérias Gram negativas (92,8%) do que para Gram positivas (82,4%). Também esse novo protocolo obteve identificação precisa para anaeróbios (80%) e leveduras (90%). Nos casos de amostras polimicrobianas (foram 17 de 301 amostras no total) foram identificadas corretamente apenas uma única espécie presente no modo Padrão e duas espécies no modo Mixed (em 52,9% das amostras). Embora o trabalho mostre estes resultados e seja um método eficaz, é uma técnica mais demorada que a do kit SepsiTyper® e são necessários mais estudos utilizando amostras clínicas.

Saffert *et al.* (2012) avaliaram três métodos de preparação a respeito de seu potencial de identificação correta das amostras de caldos de hemoculturas por identificação direta pelo MALDI-TOF: centrifugação diferencial, 10% de SDS e o kit SepsiTyper®. Apesar dos valores de corte terem sido reduzidos para melhorar a porcentagem de identificação desses métodos preparatórios, seus resultados são positivos: 65% de identificações corretas para o gênero e 43% para espécie quando realizada a centrifugação diferencial. Para os métodos SDS e SepsiTyper®, foram 76% de identificações corretas a nível de gênero e 49% para SDS e 54% para SepsiTyper® a nível de espécie. Um ponto negativo para o estudo seria a limitação na identificação direta de amostras polimicrobianas, pois só foram identificados pelo MALDI-TOF apenas 1 de 2 microrganismos de cada amostra. Sendo assim, não houve nenhuma diferença significativa estatisticamente na atuação dos 3 métodos preparatórios, porém,

quando o microrganismo era *Staphylococcus aureus*, as etapas com SDS e o kit SepsiTyper® obtiveram uma melhor identificação que a centrifugação diferencial. Diante disso, pode-se sugerir que usando a lise química na preparação facilita a identificação direta de caldos de hemocultura pelo MALDI-TOF.

Em vista de substituir o kit SepsiTyper® devido ao seu alto custo e identificar diretamente amostras de caldo de hemocultura positivas, alguns estudos desenvolveram protocolos baseados na solução de lise de saponina também. As saponinas são glicosídeos encontrados em plantas e têm a capacidade de atuar de forma hemolítica, moluscicida, antifúngica/antilevedura, antiviral, antiparasítico, anti-inflamatório e citotóxico/antitumoral (WYKOWSKI, 2012). A saponina então solubiliza as células sanguíneas, não afetando as membranas dos microrganismos (FERRONI *et al.*, 2010).

O estudo de Barberino *et al.* (2017) desenvolveram um método capaz de identificar bactérias e fungos de levedura diretamente de frascos de hemoculturas positivas por espectrometria de massa (MALDI-TOF pelo sistema VITEK MS) aprimorando um protocolo interno, obtendo resultados em menos de duas horas. Utilizando a saponina a 2% como solução de lise, esse protocolo conseguiu identificar corretamente 84% dos microrganismos a nível de espécie, sendo identificadas corretamente 93,43% das bactérias Gram-negativas e 78,85% das bactérias Gram-positivas. Após uma comparação desses resultados com os resultados de métodos convencionais (microrganismo isolado em meio sólido), se concluiu que o estudo produziu resultados confiáveis e precisos utilizando o MALDI-TOF, sendo um método de sucesso, fácil e rápido.

Martiny, Dediste e Vandenber (2012) também buscaram substituir o kit SepsiTyper® avaliando o desempenho analítico e prático de um método interno, adaptado de protocolos anteriores baseando-se em uma solução de lise de saponina a 5%. Seu método interno possui algumas modificações em comparação a estudos anteriores, como reagentes utilizados e centrifugação, e a necessidade de uma etapa de extração. Esse protocolo produziu 86,4% de identificação de gênero correta e 73,7% de identificação de espécie correta; porém utilizou pontos de cortes abaixo do usual recomendado pelo manual do equipamento. Ao comparar seus resultados com os resultados do kit SepsiTyper®, apresentou 78% para identificação correta de gênero e 68,4% para identificação correta de espécie. Portanto, esse método desenvolvido produziu resultados semelhantes ao kit já oferecido no mercado; além disso, o método interno é mais barato, cerca de dez vezes mais, e reduz o tempo de resposta em 20 minutos quando comparado ao método comercial.

Também utilizando a saponina como base para extração, tem-se o estudo de Chien *et al.* (2016), que desenvolveram um método interno de extração para avaliar o desempenho do MALDI-TOF para a identificação de bactérias e fungos diretamente de frascos de hemoculturas positivas. Baseando-se em um protocolo já descrito, foi utilizada uma solução de saponina a 5% com pequenas alterações (centrifugação e adição de etapa de extração com ácido fórmico). Quando comparados com os resultados dos testes convencionais, seus resultados foram 89,9% e 73,1% de identificação em nível de gênero e espécie, respectivamente. No entanto, a pontuação de confiança para leveduras foi menor que a pontuação das bactérias; por isso, são necessários alguns ajustes nesse procedimento de extração de proteínas para uma melhor taxa de identificação quando leveduras são analisadas.

Já no estudo de Ferroni *et al.* (2010), que também utilizou um protocolo com saponina porém com algumas pequenas alterações (etapas de lavagens, reagentes utilizados e seus respectivos volumes, e diferenças na etapa de extração) obteve 91% de identificação confiável a nível de espécie, 5% a nível de gênero e 2% a nível de família, em um tempo considerável (20 minutos), nas amostras contaminadas experimentalmente; em apenas 2% das amostras não foram identificados o microrganismo. Nas hemoculturas de pacientes, esse protocolo obteve uma identificação em 98% do total de amostras. O método foi capaz de promover resultados confiáveis e rápidos. Entretanto, houve dificuldades para a identificação de mais de uma bactéria quando eram hemoculturas mistas de pacientes e também os espectros obtidos das hemoculturas eram inferiores aos obtidos pelo método padrão.

Diante do exposto, nota-se que esses estudos para o desenvolvimento de métodos preparatórios para leitura e análise pelo MALDI-TOF de caldos de hemoculturas positivos possuem várias limitações e necessitam de aprimoramentos. Por exemplo, a identificação de amostras polimicrobianas, não conseguem identificar nenhum dos patógenos ou identificam apenas um, e, as identificações são melhores em amostras Gram-negativas do que em Gram-positivas devido a estrutura da parede celular das Gram-positivas (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020). Ademais, são necessários mais estudos para que se possa de fato inserir na rotina laboratorial clínica esses novos protocolos.

1.2.2 Amostras de Urina

As infecções do trato urinário são as infecções bacterianas mais comuns, principalmente em mulheres. Além do desenvolvimento desses novos protocolos de identificação direta pelo MALDI-TOF para amostras sanguíneas, também estão sendo

testadas novas técnicas para amostras de urina. Assim como o manejo rápido com antibióticos adequados para pacientes com sepse é crucial para um bom prognóstico, para aqueles que sofrem com cistite também é necessário um tratamento correto e o mais específico para o microrganismo causador da infecção (OROS *et al.*, 2020).

Porém, ainda, os métodos de cultura de urina são utilizados para identificação de microrganismos, sendo o padrão-ouro, já que por meio da urocultura se pode quantificar e identificar as espécies patogênicas (FERREIRA *et al.*, 2010). Normalmente, a urocultura leva em torno de 18 a 48 horas para identificar os microrganismos. Ainda, para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos são necessárias mais 18 a 24 horas (LI *et al.*, 2019). Porém, estudos mostraram que a identificação para esse tipo de amostra necessita de uma carga bacteriana acima de 10^5 UFC/mL (DE CAROLIS *et al.*, 2014).

À vista disso, Li *et al.* (2019) realizaram a análise pelo MALDI-TOF sem o cultivo prévio de amostras de urinas positivas seguindo protocolos baseados em centrifugação diferencial e lavagens do *pellet*. Obteve-se 86,42% de identificações corretas em 1 hora em amostras com um único microrganismo. O estudo apresentou algumas limitações como as identificações das bactérias Gram-negativas que foram melhores que Gram-positivas e o método foi mais efetivo em amostras que continham apenas um microrganismo.

Ferreira *et al.* (2010) desenvolveram um protocolo para identificação de microrganismos em urina também baseado em centrifugação diferencial e lavagens do *pellet* porém com algumas diferenças do estudo anterior (como tempo de centrifugação, etapas de lavagem e etapa de extração). Obteve-se 91,8% de identificações corretas a nível de espécie e 92,7% a nível de gênero. Além disso, apresentou resultados melhores para microrganismos Gram-negativos.

1.2.3 Culturas Mistas

As infecções de corrente sanguínea podem ser causadas por mais de um microrganismo. Normalmente, nesses casos de culturas polimicrobianas, as bactérias devem ser isoladas em cultura pura antes da análise; contudo, isso aumenta o tempo necessário para concluir o diagnóstico. Por isso, há estudos que buscam a identificação de microrganismos diretamente de amostras polimicrobianas pelo MALDI-TOF sem o isolamento em culturas puras, o que é particularmente difícil (FLORIO *et al.*, 2019).

Zhang, Smart e Sandrin (2015) aplicaram um biomarcador e um coeficiente de similaridade já utilizados na identificação de bactérias individuais em culturas puras e misturas simples para a caracterização de amostras polimicrobianas pelo MALDI-TOF. Embora com resultados promissores, é necessário otimizar a técnica para caracterizar rapidamente misturas bacterianas complexas.

Almuhayawi *et al.* (2020) analisaram o desempenho do MALDI-TOF na identificação direta de amostras polimicrobianas de frascos de hemocultura por meio da utilização de um método interno com saponina e compararam com os resultados do método FilmArray. O MALDI-TOF obteve apenas 27,8% de identificações dos isolados, detectando somente um dos microrganismos na maioria das amostras. Assim, o MALDI-TOF não obteve resultados satisfatórios e apresentou limitações para esse tipo de amostras.

Scohy *et al.* (2018) realizaram a identificação direta de hemoculturas polimicrobianas pelo kit Sepsityper®. O estudo identificou completamente 34,3% dos frascos de hemocultura testados, detectando em mais da metade das amostras um dos microrganismos presentes nos frascos. No entanto, são necessários mais estudos para aperfeiçoar a técnica.

Outro exemplo para a identificação de culturas polimicrobianas pelo MALDI-TOF é o trabalho de Florio *et al.* (2019), baseado pelo crescimento de curta duração em cultura em meio líquido seletivo, a partir de microrganismos recuperados de hemoculturas positivas polimicrobianas pela identificação por MALDI-TOF MS. Esse método identificou corretamente 86% das bactérias presentes nas hemoculturas com dois organismos, fornecendo resultados 24 horas antes dos métodos convencionais.

Devido às dificuldades encontradas e diante dos resultados já existentes na literatura, são necessários estudos mais aprimorados para se desenvolver uma metodologia que possa identificar diretamente amostras com mais de um microrganismo. Assim, o uso do MALDI-TOF na clínica poderá ser expandido e auxiliar os profissionais da saúde do diagnóstico e tratamento de seus pacientes.

1.2.4 Outras Aplicações do MALDI-TOF

O MALDI-TOF também pode facilitar a detecção de mecanismos de resistência a antibióticos e realizar a tipagem bacteriana, como foi relatado por Nix *et al.* (2020). Seu trabalho investigou um novo método para acelerar ainda mais o diagnóstico de sepse pela identificação de resistência à metilicina, sendo também mais econômico; porém, é um método recentemente desenvolvido e por isso necessita de padronização, requerendo mais pesquisas.

Também o MALDI-TOF pode ser útil na identificação bacteriana do líquido cefalorraquidiano. Segawa *et al.* (2014) demonstraram que o MALDI-TOF pode ser utilizado para a detecção direta de microrganismos causadores de meningite bacteriana, pois sua identificação obteve uma pontuação confiável (acima de 2,0, correspondendo ao nível de espécie). No entanto, os autores destacam que a baixa carga bacteriana e o volume pequeno de amostra podem dificultar o uso dessa técnica nesse tipo de amostra. As revisões de Sánchez *et al.* (2019) e de De Carolis *et al.* (2014) demonstram esse impacto do MALDI-TOF nas técnicas de detecção de microrganismos, principalmente na saúde pública. Além disso, sua capacidade de rápida detecção de mecanismos de resistência o torna útil para monitorar a epidemiologia de patógenos resistentes ou virulentos para uma rápida contenção de surtos.

1.3 MICROBIOTA E PATÓGENOS DO LEITE BOVINO

A Instrução Normativa-51, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento-Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo (2002), define leite como “[...] o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas”.

O leite é uma mistura composta por água, lactose, gorduras, proteínas e minerais (OLIVEIRA *et al.*, 2010; BARREIRO, 2015). A quantidade desses componentes pode variar, principalmente a fração de gordura. Assim, o leite é uma mistura nutritiva e complexa, tendo grande importância na alimentação (DIAS, 2007; MENEZES *et al.*, 2014). O leite está presente em grande quantidade no dia a dia dos brasileiros, seja o leite em si ou nos seus derivados. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite (BRASIL, 2021). Assim, a produção, a venda e o consumo do leite bovino têm impacto na agropecuária, na economia, saúde e outras áreas da população brasileira (BARREIRO, 2015).

A qualidade e as propriedades do leite são afetadas por algumas condições, como, saúde, alimentação e manejo dos animais, qualidade da mão-de-obra e manejo adequado dos equipamentos (desde durante a ordenha, a refrigeração e até o transporte). Tais fatores podem alterar a composição, sabor, cheiro e viscosidade do leite e contribuir com a presença de microrganismos indesejáveis. (DIAS, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; BARREIRO, 2015). Isso pode causar surtos alimentares acarretando em prejuízos econômicos. Além disso, a presença de microrganismos no leite também é favorecida pela sua composição nutritiva. Por isso, técnicas de controle microbiológico e de qualidade do leite são importantes para preservar a saúde do consumidor (MENEZES *et al.*, 2014).

O leite ao ser secretado é estéril, porém ao ser retirado pode se contaminar com microrganismos da própria glândula mamária, pelo manuseio de quem está fazendo a ordenha, durante o armazenamento e de fontes ambientais. Durante a ordenha, o leite pode ser contaminado com bactérias Gram-positivas como *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* e de *Streptococcus spp.* A microbiota contaminante do leite é composta por bactérias que se multiplicam no leite sob refrigeração (*Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Bacillus* e *Listeria*) e também coliformes fecais (MENEZES *et al.*, 2014).

Também *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Propionibacterium* afetam a qualidade do leite e muitos desses microrganismos podem levar a doenças nos consumidores. Essas bactérias podem ser transmitidas pelo leite aos seres humanos causando doenças zoonóticas como difteria, yersiniose, salmonelose, brucelose, micobacteriose, febre Q, colibacilose, campilobacteriose e listeriose (MENEZES *et al.*, 2014).

Além de zoonoses, esses microrganismos no leite causam doenças nas vacas que alteram a qualidade e características do leite. Por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Mycoplasma bovis* e estafilococos coagulase negativa causam mastite, uma inflamação da glândula mamária sendo na maioria das vezes subclínica. Essa doença causa muitos prejuízos econômicos ao produtor e à indústria, pois devido à inflamação provocada, há um aumento das células somáticas resultando em alterações de composição do leite, reduzindo a qualidade do alimento (BARREIRO, 2015).

1.4 IDENTIFICAÇÃO DIRETA DE AMOSTRAS POSITIVAS DE LEITE PELO MALDI-TOF

Devido aos prejuízos econômicos e na saúde dos consumidores e dos animais, é imprescindível um controle dessas doenças, pois afetam as vacas e, por conseguinte, afetam o leite produzido por elas (DIAS, 2007; MENEZES *et al.*, 2014).

A identificação das bactérias no leite ainda se baseia nos testes fenotípicos que levam mais tempo para produzir resultados. Esses testes também apresentam outras dificuldades, como, algumas estirpes dentro de espécies de bactérias podem levar a falsos resultados *in*

in vitro por terem pequenas diferenças bioquímicas. Ainda, a expressão de algumas propriedades fenotípicas é dependente de mudanças nas condições ambientais, como o pH e temperatura. Devido a essa subjetividade nesses testes, tem se buscado técnicas moleculares e proteômicas de identificação bacteriana (RODRIGUES, 2016).

Sabendo-se disso, além do uso para diagnóstico clínico, o MALDI-TOF auxiliou na detecção e identificação de microrganismos, especificamente, causadores de mastite bovina em amostras de leite por meio de colônias isoladas após cultura delas (BARREIRO, 2015). Nos casos de mastite, a técnica de identificação pelo MALDI-TOF pode ser útil no controle de adulteração do leite e seus derivados por meio da identificação de proteínas alteradas e de microrganismos que causam a sua deterioração (RODRIGUES, 2016).

Wilson *et al.* (2019) compararam a identificação de isolados microbianos de amostras de leite após cultura em placas de ágar em 3 métodos, testes bioquímicos, MALDI-TOF MS e análise de sequência de genoma parcial de rRNA 16S. Seus resultados indicam alta concordância de identificação para os 3 métodos, sendo concordância maior entre os resultados do MALDI-TOF e análise de 16S rRNA. Portanto, para controlar a qualidade do leite e da saúde do úbere, os 3 métodos podem ser utilizados para identificar bactérias isoladas do leite. Jahan *et al.* (2021) avaliaram a concordância da identificação de bactérias isoladas de amostras de leite pelo MALDI-TOF e pelo sequenciamento do gene 16S rDNA. Os resultados demonstraram que há concordância entre os dois métodos, sendo 98% a nível de gênero e 74% de concordância a nível de espécie. Assim, o estudo confirmou que o MALDI-TOF possui alto nível de precisão para identificação de microrganismos comuns causadores de mastite bovina, podendo substituir os métodos usuais de identificação em amostras de leite cru.

No entanto, como citado anteriormente, as análises pelo MALDI-TOF requerem o cultivo microbiológico das amostras, sendo essa uma etapa demorada para microrganismos causadores de mastite: em torno de 5 a 7 dias para cultivo e assim, obter resultados. Dito isso, testar e desenvolver metodologias que possam analisar e identificar diretamente amostras de leite, ou seja, pulando a etapa de cultivo dos patógenos, facilitaria e aceleraria a caracterização bacteriana precisa, contribuindo para o manejo rápido e controle de doenças (BARREIRO *et al.*, 2010).

Por isso, o estudo de Barreiro (2015) teve como objetivo avaliar a identificação das bactérias causadoras de mastite de amostras de leite contaminadas experimentalmente pelo MALDI-TOF, sem a etapa de cultura microbiológica. Utilizando o kit Sepsityper®, o estudo conseguiu identificar todas as cepas testadas pelo MALDI-TOF diretamente do leite, porém

com contagem bacteriana diferentes para cada espécie bacteriana. Além disso, também foi avaliada a eficácia da identificação direta desses patógenos causadores de mastite pelo MALDI-TOF quando essas amostras de leite são pré-incubadas utilizando o kit SepsiTyper® comparados a análise de colônias. Este último protocolo, no entanto, apresentou baixa eficácia para identificação direta pelo MALDI-TOF.

Entretanto, se há poucas referências sobre identificação de amostras de leite pelo MALDI-TOF, mais raros ainda são os estudos sobre a identificação direta de microrganismos do leite pelo MALDI-TOF. Sabendo-se disso e visto que protocolos para amostras de sangue e urina já estão sendo bem elucidados, decidiu-se por adaptar protocolos já estabelecidos para esses tipos de amostras baseados na ação de lise celular da saponina porém para amostras de leite, a fim de identificar diretamente microrganismos pelo MALDI-TOF, sem a etapa de cultivo microbiológico e determinar a sensibilidade diagnóstica da técnica. Foram testadas nesse trabalho as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

1.5 JUSTIFICATIVA

Sabendo da importância de diagnosticar precocemente microrganismos na microbiologia clínica, novas metodologias de identificação direta, ou seja, sem a etapa de cultivo, de amostras pelo MALDI-TOF devem ser desenvolvidas e protocolos já estabelecidos devem ser aprimorados e otimizados.

Ainda, não só a clínica, mas outras áreas também são afetadas pela demora em identificar microrganismos que possam ser prejudiciais, como áreas de controle microbiológico. Os setores industriais, alimentícios (que inclui saúde dos animais, higiene de equipamentos, manuseio correto) e ambientais (como qualidade da água), entre outros, necessitam de resultados precisos, confiáveis e rápidos. Indiretamente, a contaminação microbiológica nesses âmbitos também afeta a saúde da população, além de atingir outros setores como a economia.

Com o desenvolvimento de um protocolo para identificação sem cultivo prévio de amostras de leite, surge oportunidade para aplicação e também pesquisas de novas técnicas para outros tipos de amostras, expandindo as áreas de aplicações do MALDI-TOF.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por interesse avaliar a detecção de microrganismos diretamente de amostras de leite processado UHT pelo MALDI-TOF por meio de um protocolo adaptado.

1.6.2 Objetivos específicos

- a) Testar e avaliar a eficácia de um protocolo com metodologia usada para amostras de sangue baseado na lise celular por uma solução de saponina a 5% adaptado para amostras de leite UHT;
- b) Determinar a sensibilidade diagnóstica do MALDI-TOF para a identificação direta de microrganismos no leite UHT em amostras experimentalmente contaminadas.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

1 **Journal of Microbiological Methods**

2 **METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE PELO MALDI-TOF**

3 Natasha Cristine Gonçalves¹, Gertrudes Corção²

4 ¹ Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio
5 Grande do Sul, Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

6 ² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas
7 da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto
8 Alegre, Brasil.

9

10 RESUMO

11 O MALDI-TOF MS, Espectrometria de Massa de Tempo de Voo por Ionização de Dessorção
12 a Laser Assistida por Matriz, é uma técnica muito utilizada para a identificação microbiana,
13 principalmente na clínica em amostras de sangue e urina. Como o método tem a vantagem de
14 produzir resultados precisos e confiáveis mais rapidamente que as técnicas convencionais,
15 desde seu desenvolvimento, tem-se estudado novas metodologias para ampliar a aplicação da
16 técnica. Porém, para realizar a identificação bacteriana pelo MALDI-TOF, ainda é necessário
17 o cultivo das amostras, tornando o diagnóstico correto mais demorado. Por isso, pesquisas
18 vêm sendo feitas para identificar diretamente amostras pelo MALDI-TOF, ou seja, sem
19 cultivo dos microrganismos, como amostras de sangue, urina, líquido cefalorraquidiano e leite
20 também. Estudos mostraram que o MALDI-TOF é capaz de identificar amostras do leite
21 quando o microrganismo é previamente cultivado. No entanto, poucos estudos testaram a
22 possibilidade de identificar diretamente amostras de leite pelo MALDI-TOF. Sendo assim,
23 esta pesquisa objetivou desenvolver uma metodologia para a identificação direta de amostras
24 de leite pelo MALDI-TOF sem a etapa de cultivo microbiológico e, também, determinar a

25 sensibilidade diagnóstica do MALDI-TOF para esse tipo de amostras. As amostras de leite
26 UHT foram contaminadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*
27 *epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*,
28 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas*
29 *aeruginosa*, e foram testados 3 protocolos diferentes. Nos métodos 1 e 2 as amostras foram
30 tratadas com solução de lise de saponina a 5% e a extração baseada em ácido fórmico e
31 acetonitrila, com pequenas modificações. O método 1 utilizou leite semidesnatado UHT e o
32 método 2 utilizou leite desnatado UHT. O método 3 utilizou leite desnatado UHT e as
33 amostras passaram por um pré-tratamento com saponina 5%, isopropanol 75% e etapa de
34 extração com etanol etílico absoluto 75%, ácido fórmico e acetonitrila. Entretanto, os métodos
35 não foram eficazes e não identificaram os microrganismos. Acredita-se que a composição
36 complexa do leite, como lipídios e proteínas, interferiu e impossibilitou as identificações
37 bacterianas. À vista disso, é preciso rever os reagentes utilizados para desenvolver um novo
38 protocolo que permita remover esses interferentes do leite, de forma que seja possível
39 identificar microrganismos diretamente de amostras de leite pelo MALDI-TOF.

40

41 Palavras-chave: MALDI-TOF; espectrometria de massa; identificação bacteriana; leite;
42 bactérias.

43

44 **1 INTRODUÇÃO**

45 A Espectrometria de Massa de Tempo de Voo por Ionização de Dessorção a Laser
46 Assistida por Matriz, o MALDI-TOF MS, é uma técnica introduzida em 1995 e desde então
47 vêm sendo utilizada, pois permite identificar microrganismos de uma forma mais rápida,
48 precisa e sensível em nível de gênero e espécie em comparação aos métodos convencionais,
49 como cultura em meios microbiológicos, testes bioquímicos, PCR (reação em cadeia da

50 polimerase), SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato
51 de sódio), FISH (hibridização *in situ* fluorescente), LAMP (amplificação isotérmica mediada
52 por *loop*), MicroArrays e ensaios metagenômicos (Barberino et al., 2017; Singhal et al.,
53 2015).

54 De forma resumida, a técnica consiste em, após tratar a amostra com lavagens e
55 reagentes, adicionar uma matriz na amostra, que proporcionará a irradiação desse material por
56 um laser. Essas proteínas, então ionizadas, são aspiradas pelo tubo de vácuo até chegarem ao
57 detector, sendo que cada molécula possui um tempo específico de chegada. Logo, um gráfico
58 com os picos característicos de cada microrganismo será formado, gerando um espectro
59 (Pasternak, 2012). Sua base de dados computadorizada é responsável pela interpretação e
60 caracterização das espécies, fornecendo o resultado com muita rapidez, em menos de 1 hora
61 (Croxatto et al., 2012; Pasternak, 2012; Patel, 2015).

62 Com essa vantagem de identificar microrganismos de uma forma muito mais rápida
63 que as técnicas usuais, surge então a possibilidade de ampliar a utilização do MALDI-TOF
64 para além de amostras clínicas. Por exemplo, além de bactérias, o MALDI-TOF pode
65 identificar fungos e vírus, detectar mecanismos de resistência a antibióticos, realizar a
66 tipagem bacteriana e controle microbiológico de água e alimentos (Croxatto et al., 2012; Nix
67 et al., 2020; Singhal et al., 2015; Tsuchida et al., 2020).

68 Para algumas amostras, como sangue e urina, a identificação rápida do patógeno
69 causador da infecção é de extrema importância para o manejo e tratamento corretos do
70 paciente. Nos casos de infecção da corrente sanguínea, choque séptico e endocardite, a
71 demora entre a coleta das amostras e a obtenção dos resultados das hemoculturas contribuem
72 para o aumento da mortalidade dos pacientes internados em UTIs (Barberino et al., 2017;
73 Croxatto et al., 2012; De Carolis et al., 2014).

74 Com a utilização do MALDI-TOF na rotina clínica, o tempo de diagnóstico das
75 infecções foi reduzido. Entretanto, ainda assim, o MALDI-TOF ainda depende do
76 crescimento dos microrganismos em meio de cultura, o que ainda pode atrasar o início do
77 tratamento do paciente em 18 a 24 horas. Diante disso, em razão de otimizar esse tempo de
78 diagnóstico e tratamento, alguns estudos vêm desenvolvendo protocolos que possam detectar
79 microrganismos de amostras de sangue e de urina sem a etapa de cultivo microbiológico. Isso
80 fornece a vantagem de diagnósticos ainda mais rápidos, reduzindo o tempo de internação do
81 paciente e gerando economia em relação à internação e realização de testes (Barberino et al.,
82 2017; Meex et al., 2012).

83 Esses estudos têm buscado desenvolver metodologias de purificação para minimizar a
84 interferência de outros componentes que possam estar nas amostras. Assim, alguns métodos já
85 foram testados: centrifugação diferencial, lise celular por meio de dodecilsulfato de sódio
86 (SDS), de saponina, de cloreto de amônio, entre outros. Há também os kits comerciais: kit
87 SepsiTyper® da Bruker (Bruker Daltonics), o kit de hemocultura VITEK ® MS (bioMérieux)
88 e o kit BACpro ® II (Nittobo Medical Co., Tóquio, Japão) (March-Roselló et al., 2013;
89 Tsuchida et al., 2020).

90 Chien et al. (2016), desenvolveu um protocolo interno para identificar bactérias de
91 forma direta de amostras de sangue utilizando uma solução de lise de saponina a 5% para
92 permitir a detecção desses microrganismos. Seus resultados são promissores, com uma taxa
93 de 89,9% de identificação correta a nível de gênero e 73,1% de identificação correta a nível
94 de espécie, e com algumas modificações, seu protocolo poderá substituir o kit SepsiTyper®.
95 Estudos como o de Barberino et al. (2017) e de Martiny et al. (2012) também utilizaram a
96 saponina em protocolos internos para realizar a identificação direta de amostras de sangue.
97 Alguns ajustes são requeridos nos procedimentos de extração de proteínas para uma melhor

98 taxa de identificação, mas no geral ambos os artigos produziram ótimos resultados,
99 contribuindo para no futuro substituir o kit SepsiTyper®.

100 As pesquisas de Zhang et al. (2015) e Florio et al. (2019) avaliaram o desempenho do
101 MALDI-TOF em identificar diretamente amostras mistas ou polimicrobianas. Seus resultados
102 são promissores, porém para futuramente serem aplicados os métodos na rotina clínica, os
103 protocolos devem ser otimizados e elucidados.

104 Além de análises de amostras de sangue e urina, alguns estudos demonstraram a
105 eficácia do MALDI-TOF em detectar bactérias isoladas em culturas de amostras de leite como
106 as pesquisas de Wilson et al. (2019) e Jahan et al. (2021). Os trabalhos mostraram que o
107 MALDI-TOF tem resultados tão bons quanto resultados das técnicas convencionais, com alto
108 nível de precisão, podendo até substituir os métodos usuais. A identificação de
109 microrganismos pelo MALDI-TOF em amostras de leite é importante nos casos de mastite
110 nas vacas leiteiras, uma inflamação da glândula mamária devido a contaminações por
111 bactérias, vírus, fungos e algas ou por traumas que afetam a saúde do animal e a qualidade do
112 leite (Embrapa, 2014; Pinheiro et al., 2009).

113 Entretanto, o cultivo, principalmente, de bactérias causadoras de mastite leva de 5 a 7
114 dias, assim, os resultados são demorados. Portanto, há a necessidade de técnicas para
115 identificar de forma direta, sem o cultivo, esses patógenos do leite a fim de que acelere essa
116 identificação e se possa realizar o manejo correto e rápido dos animais e do leite (Barreiro et
117 al., 2010). Essa identificação bacteriana rápida e precisa de amostras de leite é importante
118 devido aos efeitos negativos causados na saúde dos animais, na qualidade do leite e na saúde
119 dos consumidores e também aos prejuízos na economia (Menezes et al., 2014).

120 Porém, pouquíssimos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de identificar
121 bactérias diretamente de amostras de leite. Barreiro (2015) realizou essa identificação direta
122 adaptando protocolos para amostras de sangue utilizando o kit SepsiTyper® e obteve

123 resultados promissores a partir de contagens bacterianas de 10^6 UFC/mL. Com isso, este
124 presente estudo teve como objetivo avaliar a detecção de microrganismos diretamente de
125 amostras de leite pelo MALDI-TOF por meio de uma adaptação de protocolo com
126 metodologia para amostras de sangue baseados em lise celular pela saponina e também
127 determinar a sensibilidade diagnóstica do MALDI-TOF para a identificação direta de
128 microrganismos no leite em amostras experimentalmente contaminadas.

129

130 **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

131 **2.1 CURVA DE CRESCIMENTO NO LEITE DAS CEPAS ANALISADAS**

132 Para a contaminação experimental do leite foram utilizadas cepas de *Staphylococcus*
133 *aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*,
134 *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e
135 *Pseudomonas aeruginosa* do acervo do laboratório 224 do Instituto de Ciências Básicas da
136 Saúde (ICBS). Todas foram previamente isoladas e identificadas pelo MALDI-TOF.

137 A fim de determinar a concentração bacteriana quando as amostras de leite fossem
138 incubadas em diferentes tempos, foi realizada uma curva de crescimento para cada bactéria
139 crescida em amostra de leite UHT.

140 Cada cepa foi incubada em caldo brain heart infusion (BHI) em uma estufa de 37 °C
141 por 24 horas. Após essa etapa, foram preparadas suspensões dessas cepas em solução salina
142 (0,9%) na concentração de 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, ou seja, concentrações
143 de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Feita a padronização de turvação, 800 μ L dessas suspensões foram
144 transferidos para frascos contendo 80 mL de leite semidesnatado UHT da marca Elegê. Esses
145 frascos foram então agitados por 3 minutos e alíquotas de 1 mL de cada bactéria foram
146 retiradas para efetuar contagem do tempo 0 da incubação. Os frascos com o volume restante
147 de leite contaminado foram incubados na estufa de 37 °C por 6 horas. A cada 2 horas uma

148 alíquota de 1 mL de cada cepa bacteriana foi retirada, obtendo no total 36 alíquotas (sendo 4
149 tempos: t_0 correspondendo a 0 hora, t_1 correspondendo a 2 horas, t_2 correspondendo a 4 horas
150 e t_3 correspondendo a 6 horas).

151 Após a retirada das alíquotas de 1 mL de cada tempo, foi realizada uma diluição
152 seriada para contagem das bactérias nos diferentes tempos. Gotas de 25 μ L de cada diluição
153 foram semeadas nas placas de PCA e TSA em duplicata e as placas foram incubadas em
154 estufa de 37° C por 24 horas.

155

156 2.2 PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DIRETA DE MICRORGANISMOS NO 157 LEITE PELO MALDI-TOF

158 Todas as cepas bacterianas foram novamente inoculadas em caldo BHI a 37 °C durante
159 24 horas. Após isso, foi feita a padronização da concentração em escala nefelométrica de
160 McFarland 0,5 (correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em solução salina 0,9% de 1 mL. Em
161 seguida, foi transferido 80 μ L (para obter 10^5 UFC/mL) de cada solução padronizada para 80
162 mL de leite UHT, de forma a obter uma concentração inicial de 10^5 UFC/mL em cada frasco.
163 A fim de obter a concentração de 10^3 UFC/mL, este inóculo inicial foi diluído 1:100.

164 Posteriormente, os frascos foram levados à estufa de 37 °C por 4 horas, sendo que a
165 cada 2 horas foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada frasco. Conforme os resultados da
166 curva de crescimento, foram retiradas alíquotas após 2 horas de incubação, alíquotas de 10^6
167 UFC/mL, e após 4 horas de incubação, alíquotas de 10^7 UFC/mL. Assim, foram obtidos 4
168 microtubos (10^3 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC/mL) por bactéria, totalizando 36 microtubos. Também,
169 foi retirada uma amostra de leite estéril de 1 mL como amostra controle do leite. Esta etapa de
170 preparo do inóculo para análise foi a mesma para os 3 protocolos.

171 Foram realizados 3 protocolos diferentes para a preparação das amostras de leite
172 descritos a seguir de forma a otimizar a identificação direta de bactérias no leite pelo MALDI-

173 TOF. Foram utilizados métodos, com algumas alterações, com base no protocolo de
174 identificação direta de bactérias de amostras de sangue por saponina 5% de Chien *et al.*
175 (2016) e também o estudo de Barreiro (2015), que desenvolveu protocolo para identificação
176 direta de bactérias causadoras de mastite no leite utilizando o Kit SepsiTyper®, ambos
177 utilizando o MALDI-TOF.

178 O método 1 utilizou leite UHT semidesnatado da marca Elegê. De acordo com o
179 protocolo de Chien et al. (2016) com algumas modificações, após obter cada alíquota de 1
180 mL, foram adicionados 200 µL de saponina a 5%, homogeneizada a solução 7 vezes e agitada
181 no vórtex por 10 segundos. Em seguida, foi feita a centrifugação das amostras a 13.000 rpm
182 por 1 minuto. Feito isso, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µL de
183 salina, de forma a suspender o *pellet*. Novamente, a solução foi centrifugada a 13.000 rpm por
184 1 minuto e descartado o sobrenadante.

185 Depois, foi seguido o protocolo de lise bacteriana (extração) para análise pelo
186 MALDI-TOF recomendado pelo fabricante (Bruker Daltonics, Inc., 2015), porém sem a etapa
187 de etanol etílico absoluto e água Milli-Q. Foi adicionado ao *pellet* obtido 50 µL de ácido
188 fórmico 70%, suspenso o *pellet* com auxílio de pipeta de 100 µL, homogeneizado em
189 vórtex e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado 50
190 µL de acetonitrila 100%, homogeneizado em vórtex e centrifugado a 13.000 rpm por 2
191 minutos. Logo após, 1 µL do sobrenadante foi colocado nos *spots* da placa de aço de leitura
192 do MALDI-TOF. Após a secagem, foi adicionado 1 µL de matriz HCCA, ácido alfa-ciano-4-
193 hidroxí-cinâmico, composta de 475 µL de água Milli-Q, 500 µL de acetonitrila e 25 µL de
194 ácido trifluoroacético. Depois da secagem dos *spots*, a leitura foi realizada. O controle de cada
195 cepa foi realizado por transferência direta (consiste em depositar pequena quantidade de
196 colônias com auxílio de palito de madeira após crescimento de 24h na placa de leitura, e
197 depois se adicionar a matriz).

198 Para os métodos 2 e 3, foi utilizado leite UHT desnatado da marca Parmalat em
199 substituição do leite semidesnatado a fim de minimizar a interferência nas identificações pela
200 camada de lipídios presentes nos microtubos do método 1. Em ambos os métodos, após obter
201 as alíquota de 1mL com as concentrações de 10^3 , 10^5 , 10^6 e 10^7 , foi novamente seguido o
202 protocolo de Chien et al. (2016) com alterações. Foram adicionados 200 μ L de saponina a 5%
203 às alíquotas, homogeneizada a solução 7 vezes e agitada no vórtex por 10 segundos e
204 incubados os microtubos a temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram
205 centrifugadas a 13.400 rpm por 1 minuto. Depois, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi
206 lavado com 1 mL de salina, de forma a suspender o *pellet*; novamente, a solução foi
207 centrifugada a 13.400 rpm por 1 minuto e descartado o sobrenadante.

208 No método 2, foi realizado o protocolo de lise bacteriana já descrito recomendado pelo
209 fabricante (Bruker Daltonics, Inc., 2015), também sem a etapa com etanol etílico absoluto e
210 água Milli-Q. Foi adicionado ao *pellet* obtido 50 μ L de ácido fórmico 70%, suspenso o
211 *pellet* com auxílio de pipeta de 100 μ L, homogeneizado em vórtex e incubado a temperatura
212 ambiente por 20 minutos. Depois, foi adicionado 50 μ L de acetonitrila 100%, homogeneizado
213 em vórtex e centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos. Após obter o sobrenadante, 1 μ L foi
214 colocado nos *spots* da placa de aço de leitura do MALDI-TOF, esperado secar, e então
215 adicionado 1 μ L de matriz HCCA. Depois da secagem da matriz nos *spots*, foi feita a leitura
216 das amostras pelo equipamento. O controle de cada cepa foi feito por protocolo de
217 transferência direta.

218 Já o método 3, após lavar o sobrenadante com 1 mL de salina, foi adicionado
219 isopropanol a 75% (900 μ L de isopropanol e 300 μ L de água Milli-Q) ao *pellet*. Os
220 microtubos foram homogeneizados 7 vezes com auxílio de pipeta, homogeneizados no vórtex
221 por 10 segundos, incubados por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugados por 1
222 minuto a 13.400 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de salina

223 0,9%. Novamente, os microtubos foram centrifugados a 13.400 rpm por 1 min e descartado o
224 sobrenadante. Foi seguido o protocolo recomendado de extração pelo fabricante (Bruker
225 Daltonics, Inc., 2015), baseando-se no protocolo de Barberino (2017), mas também com
226 alterações. O *pellet* foi diluído em 900 μ L etanol etílico absoluto e 300 μ L de água Milli-Q,
227 homogeneizado em vórtex. Os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos e
228 o sobrenadante foi descartado; novamente os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm
229 por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram deixados abertos para
230 secar em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. Após, foi adicionado 50 μ L
231 de ácido fórmico 70%, suspendido o *pellet*, homogeneizados no vórtex e incubados por 20
232 minutos a temperatura ambiente. Após, foi adicionado 50 μ L de acetonitrila e
233 homogeneizados em vórtex. Os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos e
234 foi pipetado 1 μ L do sobrenadante nos *spots* correspondentes na placa alvo. Após a secagem,
235 foi adicionado 1 μ L de matriz HCCA nos *spots*; novamente foi esperada a secagem e
236 colocada a placa para a leitura no equipamento. O controle das cepas também foi feito pela
237 etapa de extração convencional.

238 Importante destacar que para os 3 métodos uma alíquota de 1 mL de leite UHT estéril
239 para o controle do leite foi retirada, e esta passou pelos mesmos processos que as amostras em
240 cada método.

241 Cada amostra foi pipetada em 3 *spots* da placa de leitura do MALDI-TOF, sendo então
242 a análise em triplicata; exceto as amostras de controle do leite e as amostras de controle de
243 cada cepa, estas foram realizadas em duplicata.

244 Para a leitura foi utilizado o espectrômetro de massas Microflex (Bruker Daltonics) e
245 os programas MALDI Biotyper RTC 4.0 (Bruker Daltonics) e flexControl (Bruker Daltonics)
246 para então analisar os espectros obtidos. Os espectros de massas são coletados na faixa de 2 a

247 20kDa. Para obtenção dos gráficos dos espectros, foi utilizado o programa flexAnalysis
248 (Bruker Daltonics) com as configurações padrões.

249

250 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

251 3.1 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES BACTERIANAS APÓS 252 CRESCIMENTO DE 6 HORAS

253 No primeiro experimento, após o crescimento em placas de PCA e TSA, foi possível
254 realizar a contagem das colônias, possibilitando determinar as concentrações por UFC/mL de
255 cada cepa bacteriana após 0 hora (T₀), 2 horas (T₁), 4 horas (T₂) e 6 horas (T₃) de incubação
256 (Tabela 1) antes das análises por MALDI-TOF.

257 **Tabela 1 – Concentrações das cepas bacterianas por UFC/mL em um período de 6 horas**

Bactéria	UFC/mL			
	T ₀ (0h)	T ₁ (2h)	T ₂ (4h)	T ₃ (6h)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,6 X 10 ⁶	1,24 X 10 ⁷	1,08 X 10 ⁸	7,0 X 10 ⁸
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8 X 10 ⁶	2,0 X 10 ⁶	5,0 X 10 ⁷	7,8 X 10 ⁸
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,16 X 10 ⁷	1,5 X 10 ⁷	4,94 X 10 ⁸	2,0 X 10 ⁹
<i>Enterococcus faecium</i>	1,8 X 10 ⁶	1,08 X 10 ⁷	5,34 X 10 ⁸	3,3 X 10 ⁹
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,4 X 10 ⁵	5,64 X 10 ⁵	1,26 X 10 ⁸	1,08 X 10 ⁹
<i>Escherichia coli</i>	4,0 X 10 ⁶	4,6 X 10 ⁸	3,06 X 10 ¹⁰	2,54 X 10 ¹¹
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3,18 X 10 ⁵	5,28 X 10 ⁷	7,32 X 10 ⁸	5,16 X 10 ⁹
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,2 X 10 ⁶	2,42 X 10 ⁷	5,74 X 10 ⁸	5,84 X 10 ⁹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,2 X 10 ⁶	3,4 X 10 ⁶	1,64 X 10 ⁸	1,66 X 10 ⁹

258 Fonte: elaborada pelas autoras.

259

260

261 3.2 RESULTADOS DOS TRÊS MÉTODOS TESTADOS

262 As amostras bacterianas foram numeradas de forma a facilitar os experimentos.
 263 Assim, o número 2 corresponde a *S. aureus*, 3 a *S. epidermidis*, 5 a *E. faecalis*, 7 a *E. faecium*,
 264 8 a *S. agalactiae*, 11 a *E. coli*, 14 a *E. aerogenes*, 15 a *K. pneumoniae* e 19 a *P. aeruginosa*.
 265 Quando a esses números for adicionado uma letra “C”, corresponde ao controle dessas cepas.
 266 Quando apenas presente a letra “C”, corresponde à amostra de controle do leite.

267 Utilizando os programas MALDI Biotyper RTC 4.0 e flexControl para a leitura das
 268 amostras, o primeiro tratamento, com leite semidesnatado, identificou apenas uma espécie
 269 bacteriana, como *Lactobacillus paracasei* na pontuação de 1.705, correta para gênero, para a
 270 amostra contaminada com *E. faecium*. Essa espécie bacteriana é encontrada naturalmente no
 271 leite e em outros alimentos, no entanto, sua presença indica que o leite não estava estéril
 272 (Figura 1).

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
A12 (+) (B)	7	Lactobacillus paracasei	1.705	not reliable identification	1.423

273
 274 **Figura 1- Resultado de classificação gerado pelo programa Biotyper após processamento do espectro de**
 275 **massa da amostra 7 do tratamento 1.**

276 Nenhuma das outras amostras obtiveram identificações, sendo suas pontuações abaixo
 277 de 1.7, portanto, nenhuma identificação confiável. Entretanto, o controle realizado por etapa
 278 de transferência direta das cepas isoladas em ágar foi identificado corretamente, tanto a nível
 279 de gênero quanto de espécie, sendo a pontuação acima de 2.0 em pelo menos 1 *spot* da
 280 duplicata (Figuras 2 e 3).

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
B9 (+) (B)	2C	Staphylococcus aureus	1.917	Staphylococcus aureus	1.916
B10 (++) (A)	2C	Staphylococcus aureus	2.096	Staphylococcus aureus	2.064
B11 (++) (A)	3C	Staphylococcus epidermidis	2.141	Staphylococcus epidermidis	2.093
B12 (++) (A)	3C	Staphylococcus epidermidis	2.099	Staphylococcus epidermidis	2.092
D9 (++) (A)	5C	Enterococcus faecalis	2.273	Enterococcus faecalis	2.241
D10 (+++)(A)	5C	Enterococcus faecalis	2.332	Enterococcus faecalis	2.163
D11 (++) (A)	7C	Enterococcus faecium	2.259	Enterococcus faecium	2.192
D12 (+++)(A)	7C	Enterococcus faecium	2.327	Enterococcus faecium	2.204
F9 (++) (A)	8C	Streptococcus agalactiae	2.282	Streptococcus agalactiae	2.126
F10 (++) (A)	8C	Streptococcus agalactiae	2.238	Streptococcus agalactiae	2.061

281

282 **Figura 2– Resultado de classificação gerado pelo programa Biotyper das amostras de controle das cepas 2**283 **a 8 do tratamento 1.**

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E1 (++) (A)	11C	Escherichia coli	2.285	Escherichia coli	2.223
E2 (+++)(A)	11C	Escherichia coli	2.32	Escherichia coli	2.199
E3 (++) (C)	14C	Enterobacter aerogenes	2.257	Enterobacter aerogenes	2.224
E4 (+++)(C)	14C	Enterobacter aerogenes	2.473	Enterobacter aerogenes	2.447
E5 (+++)(B)	15C	Klebsiella pneumoniae	2.359	Klebsiella pneumoniae	2.31
E6 (+++)(B)	15C	Klebsiella pneumoniae	2.373	Klebsiella pneumoniae	2.323
E7 (+++)(A)	19C	Pseudomonas aeruginosa	2.362	Pseudomonas aeruginosa	2.308
E8 (++) (A)	19C	Pseudomonas aeruginosa	2.212	Pseudomonas aeruginosa	2.081

284

285 **Figura 3 – Resultado de classificação gerado pelo programa Biotyper das amostras de controle das cepas**286 **11 a 19 do tratamento 1.**

287 Após observar a formação de camada lipídica mesmo com o tratamento, foi optado por
 288 substituir o leite semidesnatado pelo leite desnatado nos protocolos seguintes, pois foi
 289 concluído que esses lipídios seriam um interferente determinante nas análises.

290 Os tratamentos 2 e 3 também não apresentaram nenhuma identificação confiável,
 291 todas as pontuações foram abaixo de 1.7. Apenas seus controles de cepas obtiveram
 292 pontuações acima de 2.0, para pelo menos 1 *spot*, sendo confiável para espécie e gênero
 293 (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
B9 (++) (A)	2C	Staphylococcus aureus	2.069	Staphylococcus aureus	2.052
B10 (++) (A)	2C	Staphylococcus aureus	2.116	Staphylococcus aureus	2.042
B11 (++) (A)	3C	Staphylococcus epidermidis	2.047	Staphylococcus epidermidis	1.992
B12 (+) (B)	3C	Staphylococcus epidermidis	1.992	Staphylococcus epidermidis	1.919
D9 (++) (A)	5C	Enterococcus faecalis	2.272	Enterococcus faecalis	2.232
D10 (++) (A)	5C	Enterococcus faecalis	2.152	Enterococcus faecalis	2.151
D11 (++) (A)	7C	Enterococcus faecium	2.092	Enterococcus faecium	1.942
D12 (+) (B)	7C	Enterococcus faecium	1.962	Enterococcus faecium	1.842
F9 (++) (A)	8C	Streptococcus agalactiae	2.22	Streptococcus agalactiae	2.182
F10 (++) (A)	8C	Streptococcus agalactiae	2.122	Streptococcus agalactiae	2.082

294

295 **Figura 4 – Resultado de classificação gerado pelo programa Biotyper das amostras de controle das cepas 2**
 296 **a 8 do tratamento 2.**

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E1 (+++)(A)	11C	<i>Escherichia coli</i>	2.329	<i>Escherichia coli</i>	2.328
E2 (++) (A)	11C	<i>Escherichia coli</i>	2.232	<i>Escherichia coli</i>	2.189
E3 (+++)(C)	14C	Enterobacter aerogenes	2.361	Enterobacter aerogenes	2.32
E4 (+++)(C)	14C	Enterobacter aerogenes	2.444	Enterobacter aerogenes	2.335
E5 (++) (B)	15C	Klebsiella pneumoniae	2.269	Klebsiella pneumoniae	2.24
E6 (++) (B)	15C	Klebsiella pneumoniae	2.252	Klebsiella pneumoniae	2.241
E7 (++) (A)	19C	Pseudomonas aeruginosa	2.262	Pseudomonas aeruginosa	2.189
E8 (++) (A)	19C	Pseudomonas aeruginosa	2.218	Pseudomonas aeruginosa	2.165

297

298 **Figura 5 – Resultado de classificação gerado pelo programa Biotyper das amostras de controle das cepas**
 299 **11 a 19 do tratamento 2.**

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
B9 (++) (A)	2C	Staphylococcus aureus	2.082	Staphylococcus aureus	2.038
B10 (++) (A)	2C	Staphylococcus aureus	2.038	Staphylococcus aureus	1.969
B11 (++) (A)	3C	Staphylococcus epidermidis	2.182	Staphylococcus epidermidis	2.062
B12 (++) (A)	3C	Staphylococcus epidermidis	2.248	Staphylococcus epidermidis	2.222
D9 (+++)(A)	5C	Enterococcus faecalis	2.492	Enterococcus faecalis	2.385
D10 (+++)(A)	5C	Enterococcus faecalis	2.418	Enterococcus faecalis	2.439
D11 (++) (A)	7C	Enterococcus faecium	2.152	Enterococcus faecium	1.926
D12 (++) (A)	7C	Enterococcus faecium	2.162	Enterococcus faecium	2.027
F9 (+++)(A)	8C	Streptococcus agalactiae	2.538	Streptococcus agalactiae	2.209
F10 (+++)(A)	8C	Streptococcus agalactiae	2.411	Streptococcus agalactiae	2.21

300

301 **Figura 6 – Resultado de classificação gerado pelo programa Biotyper das amostras de controle das cepas 2**
 302 **a 8 do tratamento 3.**

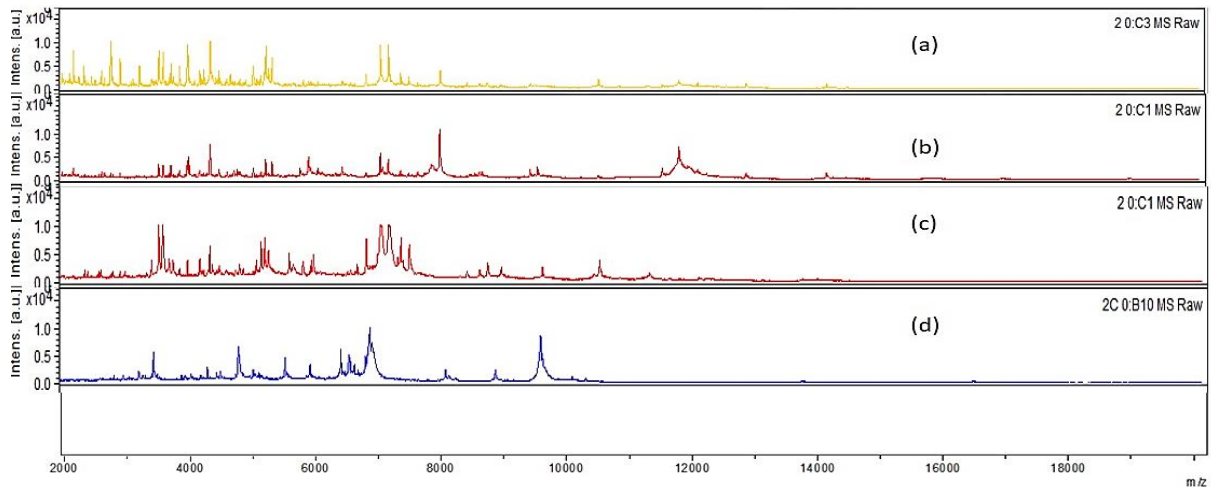
Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E1 (++) (A)	11C	<i>Escherichia coli</i>	2.218	<i>Escherichia coli</i>	2.218
E2 (++) (A)	11C	<i>Escherichia coli</i>	2.225	<i>Escherichia coli</i>	2.188
E3 (+++)(C)	14C	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.352	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.309
E4 (+++)(C)	14C	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.464	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.416
E5 (+++)(B)	15C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.384	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.351
E6 (++) (B)	15C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.268	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.236
E7 (+++)(A)	19C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.369	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.355
E8 (+++)(A)	19C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.357	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.186

303

304 **Figura 7 – Resultado de classificação gerado pelo programa Biotyper das amostras de controle das cepas**
 305 **11 a 19 do tratamento 3.**

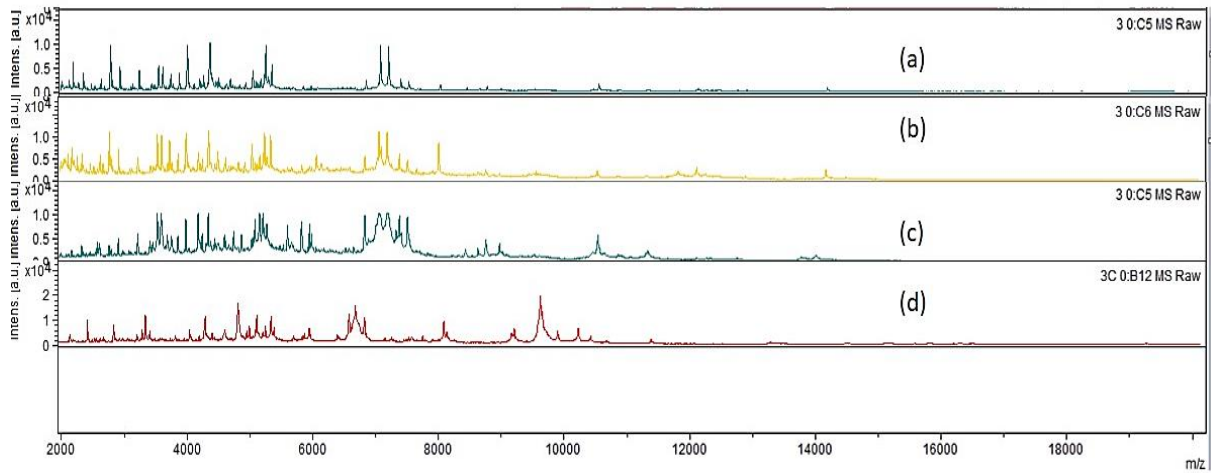
306 Após a leitura das amostras de cada tratamento, pelo programa flexAnalysis (Bruker
 307 Daltonics) foram obtidos os gráficos correspondentes aos espectros e picos de cada método e
 308 cada concentração (10^3 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC/mL). Apesar de não ter sido possível a
 309 identificação microbiana, pôde-se observar que, não houve diferenças significativas entre os
 310 espectros de uma mesma cepa nas diferentes concentrações, mesmo quando a concentração
 311 era maior.

312 Para uma identificação correta do microrganismo pelo MALDI-TOF é necessário
 313 aproximadamente 10^4 a 10^6 UFC/mL (Segawa et al., 2014). Barreiro (2015) obteve
 314 identificações confiáveis a partir de uma concentração de 10^6 UFC/mL e Ferreira et al. (2010)
 315 obteve a partir de 10^5 UFC/mL para amostras de urina. Croxatto et al. (2012) afirmam que a
 316 taxa de identificação precisa está ligada à quantidade da bactéria presente na amostra.
 317 Sabendo-se disso e, que, os espectros do presente estudo correspondentes a concentração de
 318 10^5 UFC/mL de quase todas as cepas apresentaram mais picos, sendo mais próximos do
 319 espectro de seu controle, foi realizada uma comparação dos espectros dessa concentração dos
 320 3 tratamentos de cada bactéria com o espectro de seu respectivo controle de extração, obtido
 321 no último tratamento (Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16).



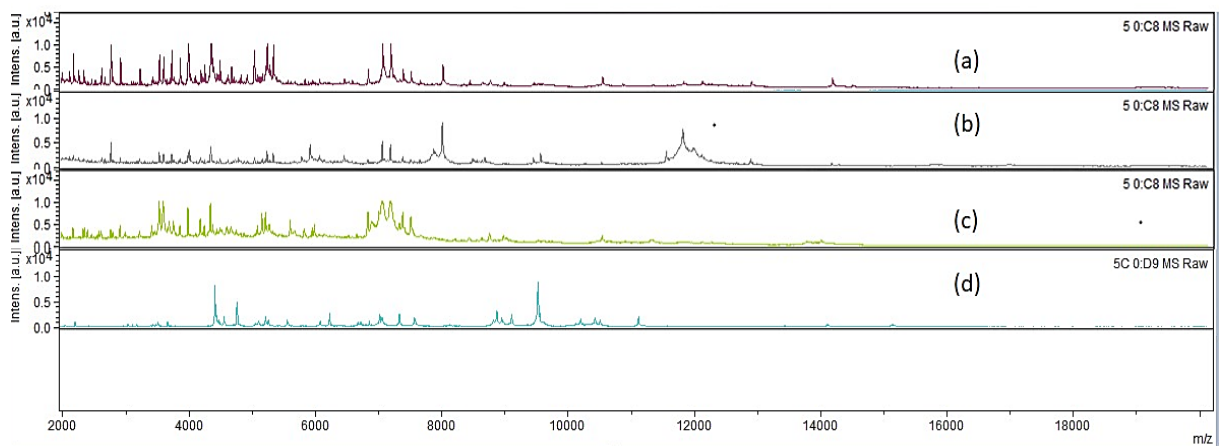
322

323 **Figura 8 – Espectros obtidos das amostras contaminadas por *S. aureus* com 10^5 UFC/mL nos (a)**
 324 **Tratamento 1, (b) Tratamento 2, (c) Tratamento 3 e (d) Controle da cepa.**



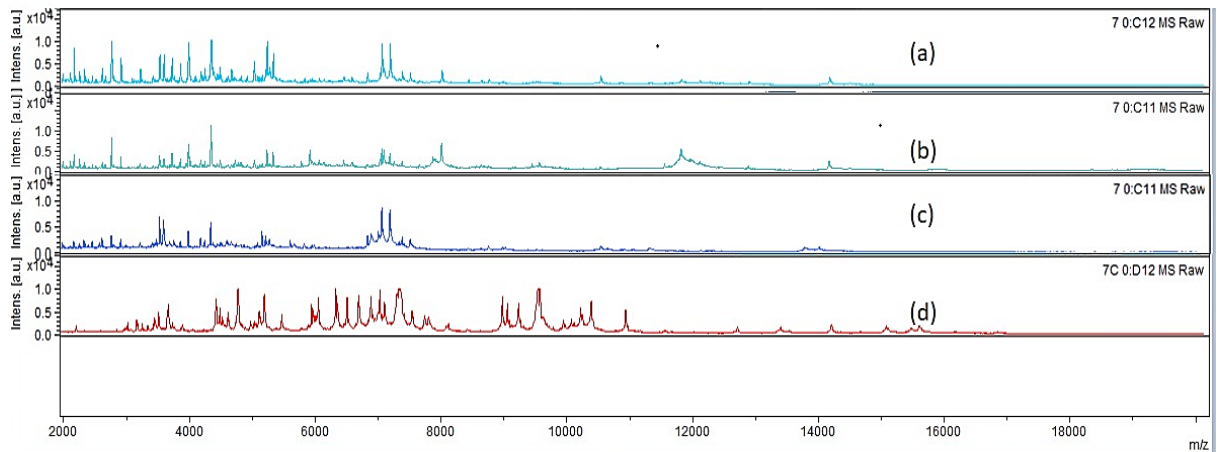
325

326 **Figura 9 – Espectros obtidos das amostras contaminadas por *S. epidermidis* com 10^5 UFC/mL nos (a)**
 327 **Tratamento 1, (b) Tratamento 2, (c) Tratamento 3 e (d) Controle da cepa.**

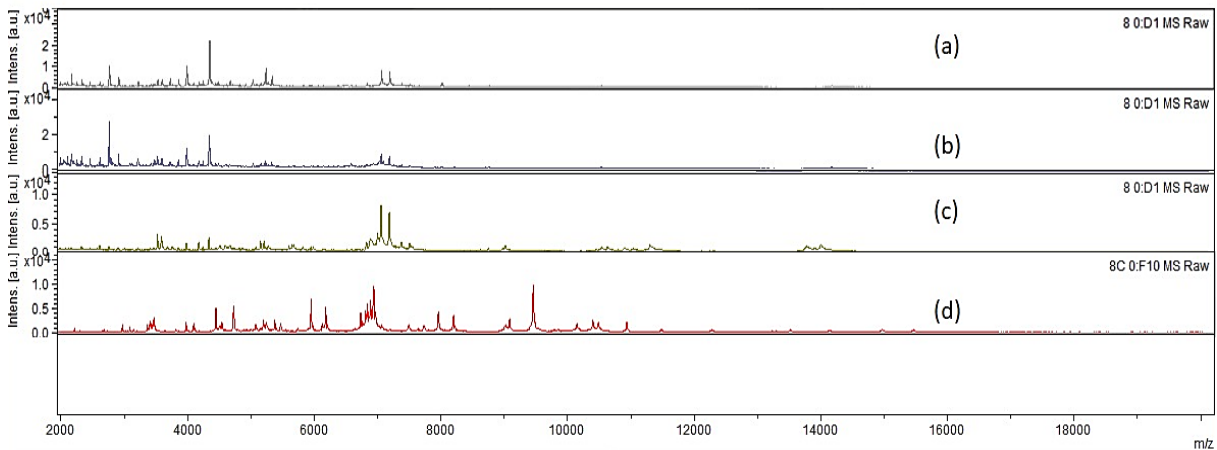


328

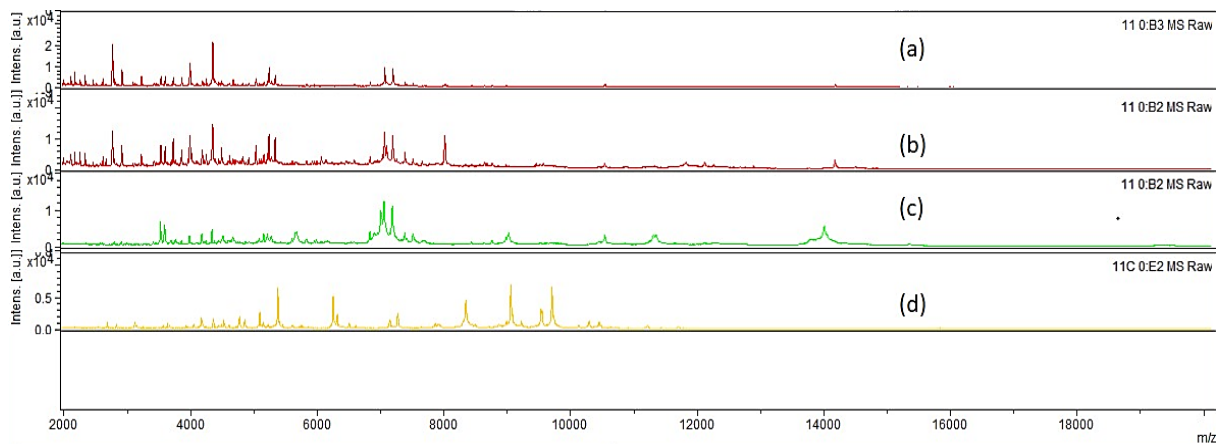
329 **Figura 10 – Espectros obtidos das amostras contaminadas por *E. faecalis* com 10^5 UFC/mL nos (a)**
 330 **Tratamento 1, (b) Tratamento 2, (c) Tratamento 3 e (d) Controle da cepa.**



331

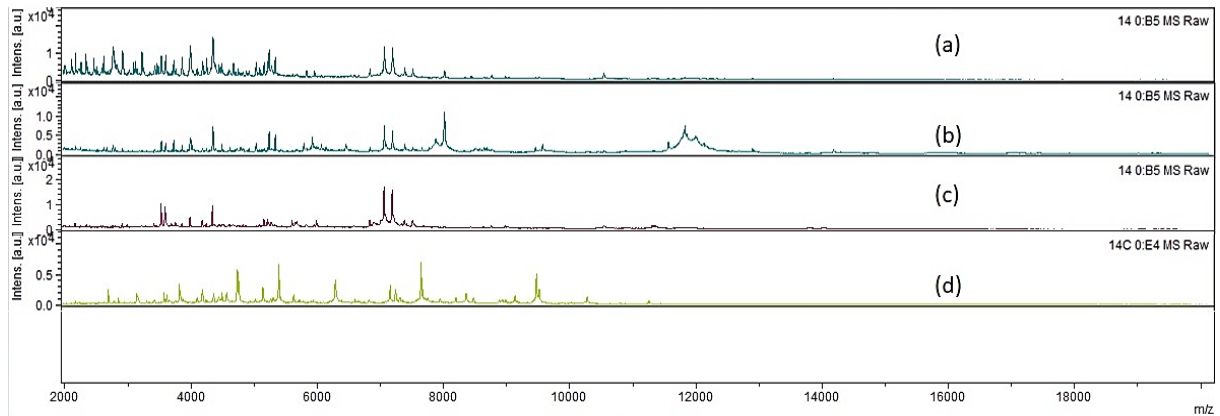
332 **Figura 11 – Espectros obtidos das amostras contaminadas por *E. faecium* com 10^5 UFC/mL nos (a)**333 **Tratamento 1, (b) Tratamento 2, (c) Tratamento 3 e (d) Controle da cepa.**

334

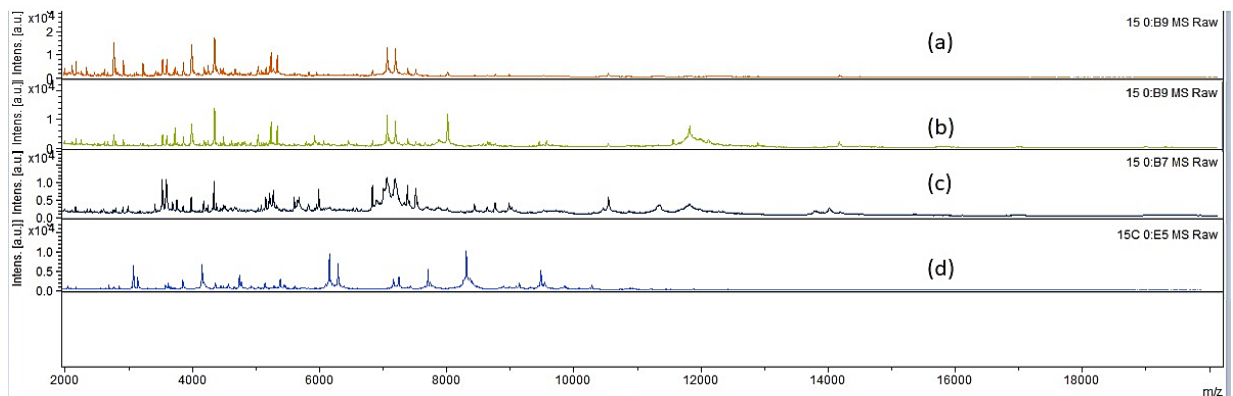
335 **Figura 12 – Espectros obtidos das amostras contaminadas por *S. agalactiae* com 10^5 UFC/mL nos (a)**336 **Tratamento 1, (b) Tratamento 2, (c) Tratamento 3 e (d) Controle da cepa.**

337

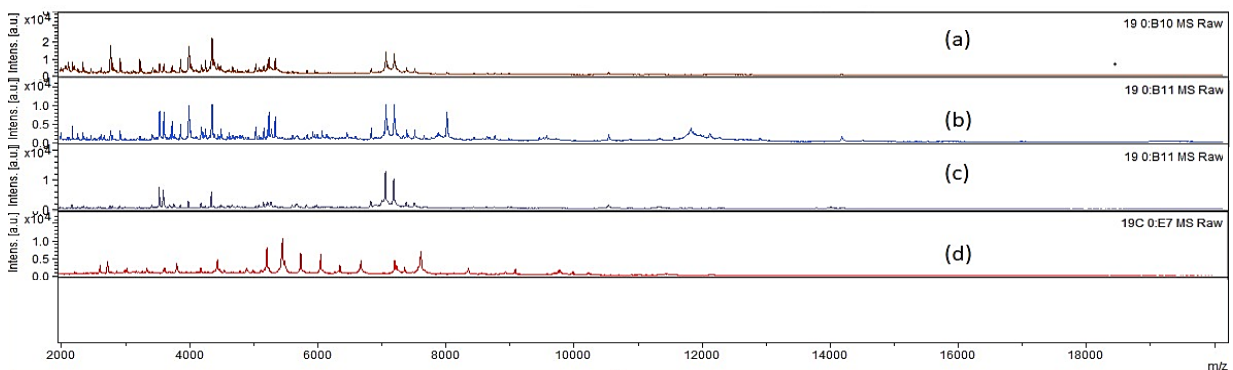
338 **Figura 13 – Espectros obtidos das amostras contaminadas por *E. coli* com 10^5 UFC/mL nos (a)**339 **Tratamento 1, (b) Tratamento 2, (c) Tratamento 3 e (d) Controle da cepa.**



340
341 **Figura 14 – Espectros obtidos das amostras contaminadas por *E. aerogenes* com 10^5 UFC/mL nos (a)**
342 **Tratamento 1, (b) Tratamento 2, (c) Tratamento 3 e (d) Controle da cepa.**

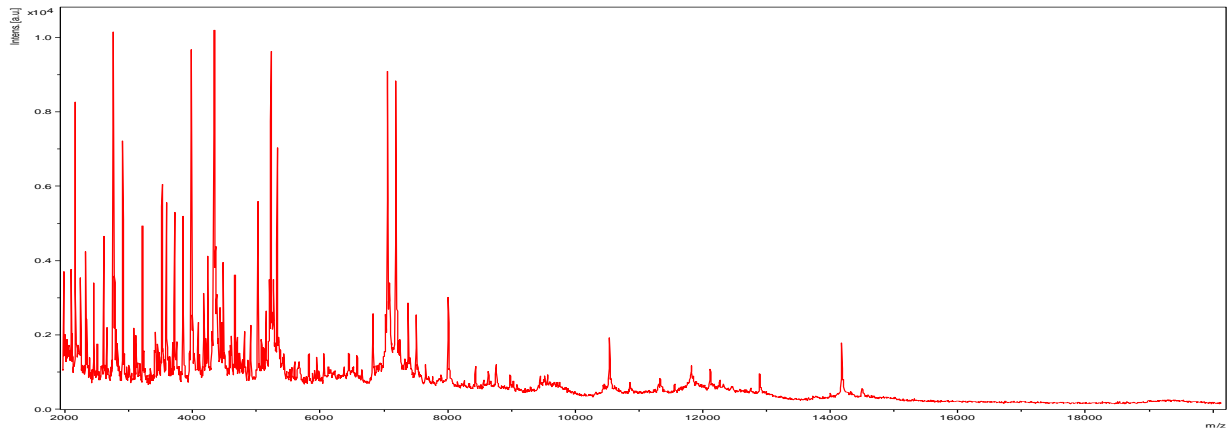


343
344 **Figura 15 – Espectros obtidos das amostras contaminadas por *K. pneumoniae* com 10^5 UFC/mL nos (a)**
345 **Tratamento 1, (b) Tratamento 2, (c) Tratamento 3 e (d) Controle da cepa.**

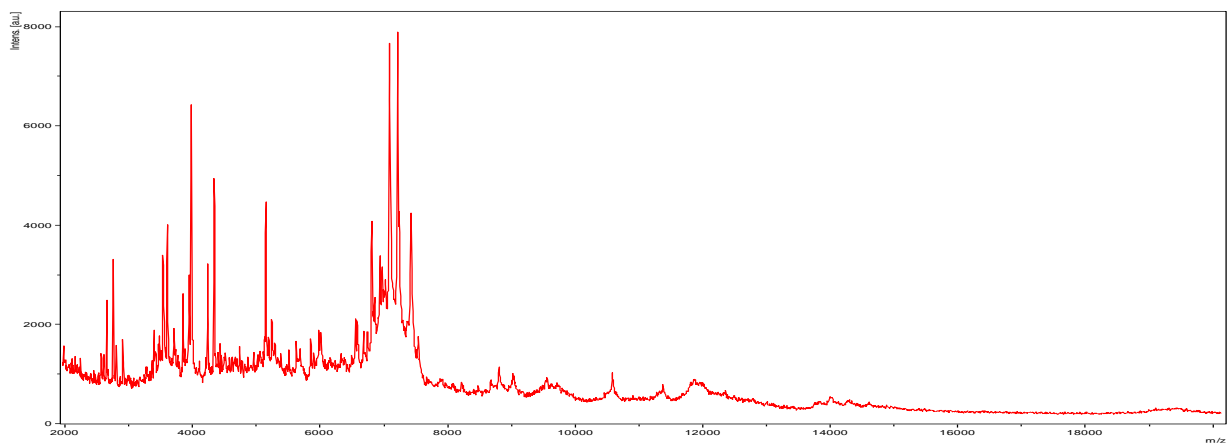


346
347 **Figura 16 – Espectros obtidos das amostras contaminadas por *P. aeruginosa* com 10^5 UFC/mL nos (a)**
348 **Tratamento 1, (b) Tratamento 2, (c) Tratamento 3 e (d) Controle da cepa.**

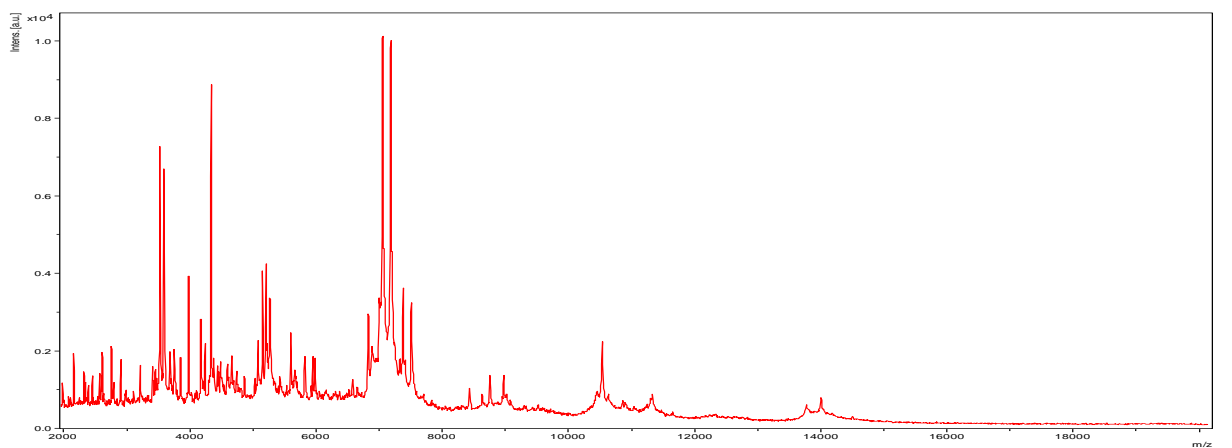
349 Nos espectros gerados dos controles de amostras que continham apenas leite UHT dos
350 3 tratamentos podemos observar que eles possuem picos parecidos entre si, porém não
351 geraram nenhuma identificação.



352

353 **Figura 17 – Espectro do controle de leite do tratamento 1.**

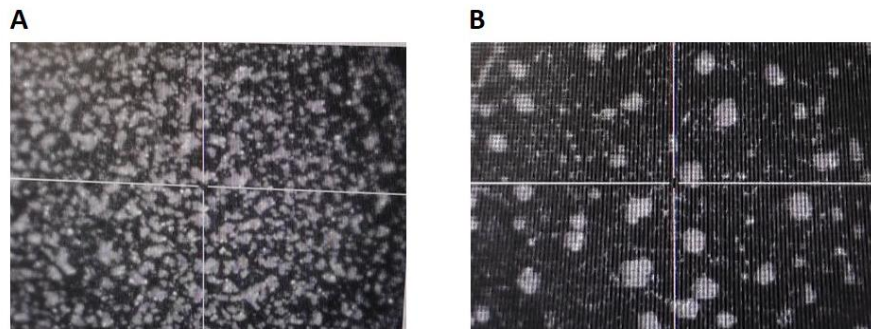
354

355 **Figura 18 – Espectro do controle de leite do tratamento 2.**

356

357 **Figura 19 – Espectro do controle de leite do tratamento 3.**

358 Para uma identificação confiável a nível de gênero e espécie, a matriz deve estar bem
 359 depositada e homogênea no *spot* (Figura 20.A). Entretanto, os *spots* das amostras tratadas nos
 360 3 protocolos testados neste estudo não apresentaram uma deposição homogênea, com matriz
 361 acumulada em alguns pontos e escassa em outros, prejudicando a identificação (Figura 20. B).



362
363 **Figura 20 – (A) Exemplo de *spot* correto com matriz homogênea da amostra**
364 **de controle processada por extração do tratamento 3 e (B) *spot* incorreto**
365 **representando as amostras tratadas pelos três protocolos com matriz**
366 **depositada de forma desigual.**

367
368 Portanto, os 3 tratamentos utilizados foram ineficazes para a identificação direta de
369 microrganismos de amostras de leite.

370 Após a verificação da não identificação dos tratamentos 1 e 2, foi adicionado um passo
371 a mais de lise de lipídios por isopropanol. Ainda assim, o pré-tratamento com saponina a 5%
372 mais isopropanol não apresentou eficácia.

373 Como o estudo de Barreiro (2015) conseguiu identificar bactérias de amostras de leite
374 contaminadas experimentalmente pelo Kit SepsiTyper®, utilizado para amostras de sangue,
375 foi suposto que talvez uma preparação mais barata para amostras de sangue também
376 identificaria microrganismos em amostras de leite. A saponina apresentou uma performance
377 razoável para identificações bacterianas em amostras de sangue (Chien et al., 2016); por isso a
378 decisão de testá-la como um pré-tratamento das amostras de leite.

379 A identificação pelo MALDI-TOF ocorre pela determinação da abundância de
380 proteínas ribossomais bacterianas (Croxatto et al., 2012), e assim gera um gráfico do espectro
381 correspondente ao microrganismo. O leite apresenta uma composição complexa, que pode
382 então interferir nos espectros para a identificação dos microrganismos pelo MALDI-TOF
383 (Barreiro, 2015), sendo esta uma limitação da técnica.

384 Portanto, o insucesso dos tratamentos pode ter sido causado, possivelmente, devido a
385 presença de proteínas e lipídios do leite que, mesmo com os métodos de preparação das
386 amostras, não foram removidos totalmente, apresentando, então, as baixas pontuações e
387 espectros inadequados. Assim, esses componentes do leite podem ter interferido na
388 identificação bacteriana por sobrepor às proteínas das bactérias. Portanto, talvez o pré-
389 tratamento com saponina não seja o mais adequado quando são amostras de leite.

390

391 **4 CONCLUSÃO**

392 Não foi possível pelos 3 métodos de extração testados identificar microrganismos
393 diretamente de amostras de leite UHT contaminadas experimentalmente pelo MALDI-TOF.
394 Os métodos não foram eficazes e são necessários estudos com outros reagentes, que não a
395 saponina, ou então uma etapa adicional para que se possa quebrar e remover os constituintes
396 interferentes do leite.

397

398 **REFERÊNCIAS**

399 Barberino, M. G., Silva, M. O., Arraes, A. C. P., Correia, L. C., Mendes, A. V., 2017. Direct
400 identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization
401 time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Braz. J. Infect. Dis.* 21, 3, 339-342.
402 <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.03.007>.

403

404 Barreiro, J. R., Ferreira, C. R., Sanvido, G. B., Kostrzewa, M., Maier, T., Wegemann, B.,
405 Böttcher, M. N., Santos, M. V., 2010. Short communication: Identification of subclinical cow
406 mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass
407 spectrometry. *J. Dairy Sci.* 93, 12, 5661-5667. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3614>.

408

409 Barreiro, J. R., 2015. Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por
410 espectrometria de massas. Tese (Doutorado em Ciências: Nutrição e Produção Animal) –
411 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
412 <https://doi:10.11606/T.10.2016.tde-25082015-165957>.

413

414 Bruker Daltonics, Inc., 2015. MALDI Biotyper 4.0 User Manual Revision B. Germany, pp.
415 174- 175.

416

417 Chien, J. Y., Lee, T. F., Du, S. H., Teng, S. H., Liao, C. H., Shend, W. H., Teng, L. J, Hsueh,
418 P. R., 2016. Applicability of an in-House Saponin-Based Extraction Method in Bruker

- 419 Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
420 System for Identification of Bacterial and Fungal Species in Positively Flagged Blood
421 Cultures. *Front. Microbiol.* 7, 1432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01432>.
- 422
- 423 Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass
424 spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 2, 380-407.
425 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
- 426
- 427 De Carolis, E., Vella, A., Vaccaro, L., Torelli, R., Spanu, T., Fiori, B., Posteraro, B.,
428 Sanguinetti, M., 2014. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic
429 microbiology. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8, 1081-1088. <https://doi.org/10.3855/jidc.3623>.
- 430
- 431 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, 2014. Mastite bovina prejudica
432 qualidade de leite. [https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1831530/mastite-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1831530/mastite-bovina-prejudica-qualidade-de-leite?p_auth=PKrR1K20)
433 [bovina-prejudica-qualidade-de-leite?p_auth=PKrR1K20](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1831530/mastite-bovina-prejudica-qualidade-de-leite?p_auth=PKrR1K20) (acessado em 28 de dezembro de
434 2021).
- 435
- 436 Ferreira, L., Juanes, F. S., Ávila, M. G., Fuciños, D. C., Hernández, A. H., Buitrago, J. M. G.,
437 Bellido, J. L. M., 2010. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples
438 by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin.*
439 *Microbiol.* 48, 6, 2110-2115. <https://doi.org/10.1128/JCM.02215-09>.
- 440
- 441 Ferroni, A., Suarez, S., Beretti, J. L., Dauphin, B., Emanuelle, B., Meyer, J., Bougnoux, M.
442 E., Alanio, A., Berchel, P., Nassif, X., 2010. Real-Time Identification of Bacteria and
443 *Candida* Species in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption
444 Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48, 5, 1542-1548.
445 <https://doi.org/10.1128/JCM.02485-09>.
- 446
- 447 Florio, W., Cappellini, S., Giordano, C., Vecchione, A., Ghelardi, E., Lupetti, A., 2019. A
448 new culture-based method for rapid identification of microorganisms in polymicrobial blood
449 cultures by MALDI-TOF MS. *BMC Microbiol.* 19, 267. [https://doi.org/10.1186/s12866-019-](https://doi.org/10.1186/s12866-019-1641-1)
450 [1641-1](https://doi.org/10.1186/s12866-019-1641-1).
- 451
- 452 Jahan, N. A., Godden, S. M., Royster, E., Schoenfuss, T. C., Gebhart, C., Timmerman, J.,
453 Fink, R. C., 2021. Evaluation of the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight
454 mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system in the detection of mastitis pathogens from
455 bovine milk samples. *J. Microbiol. Methods.* 182, 106168.
456 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106168>.
- 457
- 458 March-Rosselló, G. A., Muñoz-Moreno, M. F., García-Loygorri-Jordán de Urriés, M.C.,
459 Bratos-Pérez, M. A., 2013. A differential centrifugation protocol and validation criterion for
460 enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood
461 culture growth bottles. *Eur. J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis.* 32, 699–704.
462 <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1797-1>.
- 463
- 464 Martiny, D.; Dediste, A.; Vandenberg, O., 2012. Comparison of an in-house method and the
465 commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture
466 broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur. J.*
Clin. Microbiol. Infect. Dis. 31, 2269–2281. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1566-1>.
- 467

- 468 Menezes, M. F. C., Simeoni, C. P., Etchepare, M. A., Huer-ta, K., Bortoluzzi, D. P., Menezes,
469 C. R., 2014. Microbiota e Conservação do Leite. *Rev. Eletron. Gest. Educ. Tecnol. Ambient.*
470 18, 76-89. <http://dx.doi.org/10.5902/2236117013033>.
471
- 472 Meex, C., Neuville, F., Descy, J., Huynen, P., Hayette, M. P., Mol, P., Melin, P., 2012. Direct
473 identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-
474 TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction.
475 *J. Med. Microbiol.* 61, 11, 1511–1516. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.044750-0>.
476
- 477 Nix, I. D., Idelevich, E. A., Storck, L. M., Sparbier, K., Drews, O., Kostrzewa, M., Becker,
478 K., 2020. Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* From Agar Cultures
479 and Directly From Positive Blood Cultures Using MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based
480 Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay. *Front. Microbiol.* 11, 232.
481 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00232>.
482
- 483 Pasternak, J., 2012. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF.
484 *Einstein*, 10, 1, p.118-119. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082012000100026>.
- 485 Patel, R., 2015. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin. Chem.* 61, 1,
486 100-111. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>.
487
- 488 Pinheiro, M. L. M., Albino, F. T., Fonseca, E. G., Teixeira, R. B., Paiva, A. L. C., 2009.
489 Avaliação de Mastite Clínica e Subclínica no Setor de Bovinocultura do Instituto Federal de
490 Minas Gerais – Campus Bambuí. In: II Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG Campus
491 Bambuí, Bambuí. II Jornada Científica.
492 [https://www.bambui.ifmg.edu.br/jornada_cientifica/sct/trabalhos/Recursos%20Naturais/188-](https://www.bambui.ifmg.edu.br/jornada_cientifica/sct/trabalhos/Recursos%20Naturais/188-PT-1.pdf)
493 [PT-1.pdf](https://www.bambui.ifmg.edu.br/jornada_cientifica/sct/trabalhos/Recursos%20Naturais/188-PT-1.pdf).
494
- 495 Segawa, S., Sawai, S., Murata, S., Nishimura, M., Beppu, M., Sogawa, K., Watanabe, M.,
496 Satoh, M., Matsutani, T., Kobayashi, M., Iwadate, Y., Kuwabara, S., Saeki, N., Nomura, F.,
497 2014. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid
498 pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin. Chim. Acta*, 435, 59-61.
499 <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.04.024>.
500
- 501 Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., Virdil, J., S., 2015. MALDI-TOF mass
502 spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front.*
503 *Microbiol.* 6, 791. <https://doi:10.3389/fmicb.2015.00791>.
504
- 505 Tsuchida, S., Umemura, H., Nakayama, T., 2020. Current Status of Matrix-Assisted Laser
506 Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical
507 Diagnostic Microbiology. *Mol.* 25, 20, 4775. <https://10.3390/molecules25204775>.
508
- 509 Wilson, D. J., Middleton, J. R., Adkins, P. R. F., Goodell, G. M., 2019. Test Agreement
510 among Biochemical Methods, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
511 Mass Spectrometry, and 16S rRNA Sequencing for Identification of Microorganisms Isolated
512 from Bovine Milk. *J. Clin. Microbiol.* 57, 3. <https://doi.org/10.1128/JCM.01381-18>.
513
- 514 Zhang, L., Smart, S., Sandrin, T. R., 2015. Biomarker- and similarity coefficient-based
515 approaches to bacterial mixture characterization using matrix-assisted laser desorption

516 ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Sci. Rep.* 5, 15834.
517 <https://doi.org/10.1038/srep15834>

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Infelizmente, os 3 protocolos testados para análise direta do leite não foram eficazes. Os tratamentos com etapa de pré-tratamento com saponina a 5%, etapas de extração e também etapa de lise com isopropanol não foram suficientes para identificar as bactérias das amostras de forma confiável e precisa, resultando em baixas pontuações e espectros inadequados.

Foi observada uma camada lipídica após as etapas de centrifugação nos microtubos, e isso pode ter interferido na identificação das análises. Além disso, o insucesso da técnica pode também estar relacionado a uma maior abundância das proteínas do leite sobre as proteínas bacterianas, assim, as proteínas dos microrganismos se encontram em menor quantidade dificultando sua detecção pelo MALDI-TOF.

Como perspectiva desse trabalho está a pesquisa de outros reagentes que possam remover as proteínas do leite, de forma que as proteínas bacterianas possam ser identificadas pelo MALDI-TOF, visto que, talvez, a saponina não seja a solução de lise mais adequada para esse tipo de amostras. É preciso também uma etapa adicional para retirar os lipídios. Assim, os efeitos interferentes dos componentes do leite podem ser minimizados e permitindo, então, a análise direta em amostras de leite pelo MALDI-TOF.

REFERÊNCIAS

- ALMUHAYAWI, Mohammed S. *et al.* Identification of microorganisms directly from blood culture bottles with polymicrobial growth: comparison of FilmArray and direct MALDI-TOF MS. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 129, n. 4, p. 178-185, Dec. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/apm.13107>. Acesso em: 28 dez. 2021.
- ALTUN, Osman *et al.* Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 64, n. 11, p. 1346–1352, Nov. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000168>. Acesso em: 16 nov. 2021.
- BARBERINO, Maria Goreth *et al.* Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 339-342, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.03.007>. Acesso em: 16 nov. 2021.
- BARREIRO, J. R. *et al.* Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 93, n. 12, p. 5661-5667, dez. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3614>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- BARREIRO, Juliana Regina. **Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por espectrometria de massas**. 2015. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências: Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-25082015-165957/publico/JULIANA_REGINA_BARREIRO_Original.pdf. Acesso em: 16 nov. 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mapa do Leite: Políticas Públicas e Privadas para o Leite**. Brasil, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em: 15 nov. 2021.
- BRUKER. **MALDI-TOF/TOF Microflex® LRF**. 2021. Disponível em: <https://www.bruker.com/pt/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof/microflex.html>. Acesso em: 16 nov. 2021.
- CHIEN, Jung-Yien *et al.* Applicability of an in-House Saponin-Based Extraction Method in Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Bacterial and Fungal Species in Positively Flagged Blood Cultures. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 1432, Sept. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01432>. Acesso em: 16 nov. 2021.
- CROXATTO, Antony; PROD'HOM Guy; GREUB Gilbert. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, England, v. 36, n. 2, p. 380-407, Mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>. Acesso em 16 nov. 2021.

DE CAROLIS, Elena *et al.* Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Italy, v. 8, n. 9, p. 1081-1088, Sept. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3855/jidc.3623>. Acesso em: 16 nov. 2021.

DIAS, Regina Valéria da Cunha Dias. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasileira**, Mossoró, v. 1, n. 1, p. 23-27, maio 2007. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/255/95>. Acesso em: 27 nov. 2021.

FERREIRA, Laura *et al.* Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 6, p. 2110-2115, Jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.02215-09>. Acesso em: 16 nov. 2021.

FERREIRA, Marcio Martins Casaes. **Espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) aplicada ao laboratório de microbiologia clínica: uma revisão bibliográfica**. 2019. 44 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/bitstream/handle/1/21724/Meu%20TCC%20com%20altera%20a%203%20b5es%20da%20banca%2023-07-19.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 27 nov. 2021.

FERRONI, Agnes *et al.* 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**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1542-1548, May. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.02485-09>. Acesso em: 16 nov. 2021.

FLORIO, Walter *et al.* A new culture-based method for rapid identification of microorganisms in polymicrobial blood cultures by MALDI-TOF MS. **BMC Microbiology**, London, v. 19, n. 267, Nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1641-1>. Acesso em: 16 nov. 2021.

INSTITUO LATINO AMERICANO DE SEPSE – ILAS. **O que é sepse?** 2021. Disponível em: <https://ilas.org.br/o-que-e-sepse.php>. Acesso em: 29 nov. 2021.

JAHAN, Nusrat A. *et al.* Evaluation of the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system in the detection of mastites pathogens from bovine milk samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 182, Mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106168>. Acesso em: 27 nov. 2021.

LI, Wei *et al.* Rapid Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing for Urinary Tract Pathogens by Direct Analysis of Urine Samples Using a MALDI-TOF MS-Based Combined Protocol. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, n. 1182, June 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01182>. Acesso em: 16 nov. 2021.

MARCH-ROSSELLÓ, G. A. *et al.* A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. **European Journal of Clinical Microbiology &**

Infectious Diseases, Berlin, v. 32, p. 699–704, May 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1797-1>. Acesso em: 16 nov. 2021.

MARTINY, D.; DEDISTE, A.; VANDENBERG, O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 31, p. 2269–2281, Feb. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1566-1>. Acesso em: 16 nov. 2021.

MENEZES, Maria Fernanda Cáceres *et al.* Microbiota e Conservação do Leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**, Santa Maria, v. 18, p. 76-89, mai. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5902/2236117013033>. Acesso em: 16 nov. 2021.

MOUSSAOUI, W. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 16, n. 11, p. 1631-1638, Nov. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03356.x>. Acesso em: 16 nov. 2021.

NIX, Ilka D. *et al.* Detection of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus From Agar Cultures and Directly From Positive Blood Cultures Using MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, n. 232, Feb. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00232>. Acesso em: 16 nov. 2021.

OLIVEIRA, Emanuel Neto Alves de *et al.* Composição físico-química de leites em diferentes fases de lactação. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 409-415, out./dez. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v8i4.10982>. Acesso em: 15 nov. 2021.

OROS, Damir *et al.* Identification of pathogens from native urine samples by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. **Clinical Proteomics**, London, v. 17, n. 25, June 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12014-020-09289-4>. Acesso em: 16 nov. 2021.

PASTERNAK, Jacyr. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **Einstein**, São Paulo, v. 10, n. 1, p.118-119, mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082012000100026>. Acesso em: 20 nov. 2021.

PATEL, Robin. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. **Clinical Chemistry**, London, v. 61, n. 1, p. 100-111, Jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>. Acesso em: 14 nov. 2021.

PINHEIRO, Melina Laura Moretti *et al.* Avaliação de Mastite Clínica e Subclínica no Setor de Bovinocultura do Instituto Federal de Minas Gerais – Campus Bambuí. In: II Semana De Ciência e Tecnologia do IFMG Campus Bambuí, 2009, Bambuí. **II Jornada Científica**. Disponível em: https://www.bambui.ifmg.edu.br/jornada_cientifica/sct/trabalhos/Recursos%20Naturais/188-PT-1.pdf. Acesso em: 15 nov. 2021.

PROD'HOM, Guy *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1481-1483, Apr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01780-09>. Acesso em: 16 nov. 2021.

RODRIGUES, Naiara de Miranda Bento. **Identificação de enterobactérias através da técnica de MALDI-TOF MS e compreensão da disseminação destes agentes em ambiente de produção leiteira.** 2016. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária, – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/1213>. Acesso em: 15 nov. 2021.

SAFFERT, Ryan T. *et al.* Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 73, n. 1, p. 21-26, May 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.01.010>. Acesso em: 16 nov. 2021.

SÁNCHEZ, Belén Rodríguez *et al.* Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 24, n. 4, Jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.4.1800193>. Acesso em: 16 nov. 2021.

SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura e Abastecimento-Coordenadoria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa-51 de 18/09/2002.** São Paulo, 2002. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-51-de-18-09-2002,654.html>. Acesso em: 15 nov. 2021.

SCOHY, Anaïs *et al.* Evaluation of the Bruker® MBT Sepsityper IVD module for the identification of polymicrobial blood cultures with MALDI-TOF MS. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 37, p. 2145-2152, Jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3351-2>. Acesso em: 28 dez. 2021.

SEGAWA, Shunsuke *et al.* Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 435, p. 59-61, Aug. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.04.024>. Acesso em: 27 nov. 2021.

SENG, Piseth *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 543–551, Aug. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/600885>. Acesso em: 30 nov. 2021.

SINGHAL, Neelja *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 791, Aug. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>. Acesso em: 16 nov. 2021.

TSUCHIDA Sachio; UMEMURA Hiroshi; NAKAYAMA Tomohiro. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 4775, Oct. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>. Acesso em: 16 nov. 2021.

WILSON, David J. *et al.* Test Agreement among Biochemical Methods, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, and 16S rRNA Sequencing for Identification of Microorganisms Isolated from Bovine Milk. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 57, n. 3, Mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01381-18>. Acesso em: 27 nov. 2021.

WYKOWSKI, Rachel. **Saponinas: uma promessa da ciência contra o câncer.** 2012. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/143507/000898769.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 nov. 2021.

ZHANG, Lin; SMART, Sonja; SANDRIN, Todd R. Biomarker- and similarity coefficient-based approaches to bacterial mixture characterization using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Scientific Reports**, London, v.5, n. 15834, Nov. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep15834>. Acesso em: 16 nov. 2021.

ZHOU, Menglan *et al.* An Improved In-house MALDI-TOF MS Protocol for Direct Cost-Effective Identification of Pathogens from Blood Cultures. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 1824, Sept. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01824>. Acesso em: 16 nov. 2021.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS



JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0167-7012

DESCRIPTION

The *Journal of Microbiological Methods* publishes scholarly and original articles, notes and review articles. These articles must include novel and/or state-of-the-art **methods**, or significant improvements to existing methods. Novel and innovative applications of current methods that are validated and useful will also be published. JMM strives for scholarship, innovation and excellence. This demands scientific rigour, the best available methods and technologies, correctly replicated experiments/tests, the inclusion of proper controls, calibrations, and the correct statistical analysis. The presentation of the data must support the interpretation of the method/approach.

All aspects of **microbiology** are covered, except virology. These include agricultural microbiology, applied and environmental microbiology, bioassays, bioinformatics, biotechnology, biochemical microbiology, clinical microbiology, diagnostics, food monitoring and quality control microbiology, microbial genetics and genomics, geomicrobiology, microbiome methods regardless of habitat, high through-put sequencing methods and analysis, microbial pathogenesis and host responses, metabolomics, metagenomics, metaproteomics, microbial ecology and diversity, microbial physiology, microbial ultra-structure, microscopic and imaging methods, molecular microbiology, mycology, novel mathematical microbiology and modelling, parasitology, plant-microbe interactions, protein markers/profiles, proteomics, pyrosequencing, public health microbiology, radioisotopes applied to microbiology, robotics applied to microbiological methods, rumen microbiology, microbiological methods for space missions and extreme environments, sampling methods and samplers, soil and sediment microbiology, transcriptomics, veterinary microbiology, sero-diagnostics and typing/identification.

The editors, editorial board members and scholarly reviewers are active scientists with an immense amount of collective experience that is used during the review and revision stages of articles. We encourage the submission of proposals for scholarly reviews and special issues on emerging microbiological methods that are central to advancing microbiological knowledge. We look forward to receiving your proposals and articles.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

All microbiologists, biotechnologists, and geneticists

IMPACT FACTOR

2020: 2.363 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

ABSTRACTING AND INDEXING

Biosis Previews
 Embase
 Pascal Francis
 Current Contents
 Web of Science
 Elsevier BIOBASE
 PubMed/Medline
 UnCover
 CAB International
 Global Health
 FSTA (Food Science and Technology Abstracts)
 Current Biotechnology Abstracts
 TOXFILE
 Science Citation Index Expanded
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

J.T. Trevors, Guelph, Canada

Editors

Manuscripts can be submitted to any of the 4 editors

M.J. Bailey, Natural Environment Research Council, Swindon, United Kingdom

M. Calcutt, University of Missouri, Columbia, Missouri, United States of America

V. Gurtler, RMIT University School of Applied Sciences- Bundoora Campus, Bundoora, Victoria, Australia

J.T. Trevors, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

Editorial Board

Armstrong, Stoneville, Mississippi, United States of America

A.S. Ball, Melbourne, Victoria, Australia

S.W. Bearden, Fort Collins, Colorado, United States of America

A. Bej, Birmingham, Alabama, United States of America

W.H. Benjamin, Birmingham, Alabama, United States of America

B. Brehm-Stecher, Ames, Iowa, United States of America

E. Breitschwerdt, Raleigh, North Carolina, United States of America

H.J. Busscher, Groningen, Netherlands

J. Capobianco, Beltsville, Maryland, United States of America

V. Catalan, Alicante, Spain

K.L. Cook, Lexington, Kentucky, United States of America

N. Decaro, Bari, Italy

D. Dong, Shanghai, China

M. Elshahed, Stillwater, Oklahoma, United States of America

A. Ericsson, Columbia, Missouri, United States of America

A. Fernández Scavino, Carmelones, Uruguay

R.H. Findlay, Tuscaloosa, Alabama, United States of America

J. Fowler, Burnaby, British Columbia, Canada

K. Fox, Columbia, South Carolina, United States of America

H. Gang, Baltimore, Maryland, United States of America

D. Grando, Bundoora, Victoria, Australia

N. Gray, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom

M.E. Hart, Jefferson, Arkansas, United States of America
H. Hendrickson, Palmerston North, New Zealand
J. Higgins, Beltsville, Maryland, United States of America
T. Hsiang, Guelph, Ontario, Canada
E.S. Kanshiro, Cincinnati, Ohio, United States of America
M. Karrasch, Jena, Germany
G.A. Köhler, Tulsa, Oklahoma, United States of America
D.R. Korber, Saskatoon, Saskatchewan, Canada
M.P. Kozar, Silver Spring, Maryland, United States of America
H.C. Lai, Taoyuan, Taiwan
P. Lau, Montreal, Quebec, Canada
J.R. Lawrence, Saskatoon, Saskatchewan, Canada
J.O. Lay, Fayetteville, Arkansas, United States of America
K.P. Leung, Great Lakes, Illinois, United States of America
L. Lindler, Bethesda, Maryland, United States of America
E. Lutter, Stillwater, Oklahoma, United States of America
T McAllister, Ottawa, Ontario, Canada
M. Minnick, Missoula, Montana, United States of America
S. Mitarai, Tokyo, Japan
J. Mosher, Huntington, West Virginia, United States of America
N. Nykytczuk, Sudbury, Ontario, Canada
H. Nakatsu, West Lafayette, Indiana, United States of America
D. Naumann, Berlin, Germany
P.A. Noble, Seattle, Washington, United States of America
C.R. Osorio, Santiago de Compostela, Spain
van Overbeek, Wageningen, Netherlands
O.A. Oyarzabal, South Burlington, Vermont, United States of America
R.J. Palmer, Jr., Bethesda, Maryland, United States of America
H.W.J. van Passel, Wageningen, Netherlands
M. A. Patrauchan, Stillwater, Oklahoma, United States of America
C. Pavia, Old Westbury, New York, United States of America
M. Prieto, Leon, Spain
H. Rautenbach, Stellenbosch, South Africa
D. Ren, Rochester, New York, United States of America
M. Ridell, Göteborg, Sweden
J.R. Rose, Columbia, South Carolina, United States of America
R.F. Schell, Madison, Wisconsin, United States of America
L. Schena, Reggio, Italy
D. Schofield, Charleston, South Carolina, United States of America
R. Sevlour, Bundoora, Victoria, Australia
H.M. Shapiro
A. Soares Rosado, Rio de Janeiro, Brazil
G.C. Stewart, Columbia, Missouri, United States of America
L. Suh, Auburn, Alabama, United States of America
R. Tenreiro, Lisbon, Portugal
E. Trees, Atlanta, Georgia, United States of America
O. Tresse, Nantes, France
G. Ulet, Southport, Queensland, Australia
J.D. Van Elsas, Haren, Netherlands
K. Waites, Birmingham, Alabama, United States of America
K. Warriner, Guelph, Ontario, Canada
A. Whiteley, Wallingford, United Kingdom
J. Whittum-Hudson, Detroit, Michigan, United States of America
J. Withey, Detroit, Michigan, United States of America
D. Wunschel, Richland, Washington, United States of America
Y. Yang, Beltsville, Maryland, United States of America

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

The journal publishes full-length articles describing original work, notes (short concise communications), and review articles on methods, including their development, applicability, and present status. Microbiologists are encouraged to submit to the editors product information and a summary of articles published elsewhere with relevance to the readers of the journal. This information is subject to editorial approval. Articles describing the use of computers with software description are welcome. Submissions of a paper to this journal is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere.

Types of paper

Full length Original Research Articles: Describing original work.

Review Articles: Reviews that do not contain experimental (hands-on) establishment of a method, but instead concern a summary or an evaluation of previously described methods, are welcome. Generally, the author should contact an editorial board member or editor familiar with the area who would then act as a sponsor. The name and address of the sponsor should be listed on the front page of the manuscript and will appear in the front page of the published article. Unsolicited articles may be sent to an Editor or Editor-in-Chief but it is preferred that approval of the topic area is obtained before the review is written.

Short Communications: A " Short Communication " is intended for the presentation of brief observations that do not warrant full-length papers. A Short Communication should be brief descriptions of novel apparatus or techniques, requiring real ingenuity on the author's part, that offer definite advantages over those already available. The abstract should be no more than 50 words, have no section headings in the body and report methods, results, and discussion in a single section. The text should be kept to a minimum and if possible should not exceed 1,000 words; the number of figures and tables should also be kept to a minimum (2-3 maximum). Materials and methods should be described in the text, not in figure legends or table footnotes. Acknowledgments should be presented as in full-length papers, but no separate heading is used. The References section is identical to the **full-length papers**.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors whose primary language is not English, are strongly encouraged to submit manuscripts after their being edited for correct English. This will speed up and increase the likelihood of acceptance of an article during the reviewing process. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <https://webshop.elsevier.com/language-editing-services/language-editing/> or our customer support site at <https://service.elsevier.com> for more information.

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Declaration of competing interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. **Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.** If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. [More information.](#)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We

suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the Journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

•Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

•Also the manuscript should be double line spaced

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written

by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handed independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on [electronic artwork](#).

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

For 'Notes' Abstract should be no longer than 50 words

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

US or GB spelling 3-6 (Alphabetized)

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of [electronic artwork](#).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Tables should be compiled on separate pages with a short descriptive title, and legend if required, and numbered consecutively.

References**Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support *Citation Style Language styles*, such as *Mendeley*. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

References should be listed by author name and year of publication in parentheses in the body of the text [i.e.(Crissman and Hadley, 1995) two authors; (Crissman et al., 1998) more than two authors] and listed alphabetically in the reference section. References to journals should contain the names and initials of all authors, the year of publication, the title of the paper, the title of the periodical abbreviated according to List of Serial Title Word Abbreviations (available from the International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8), the volume number, and page number. References to books should also include the title of the book, the editors, and publishers. See examples below.

Schüler, D., Uhl, R., Bäuerlein, E., 1995. A simple light scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 132, 139–145.

Tyssen, P., 1993. Hybridization with nucleic acid probes. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24, Elsevier, Amsterdam, pp. 375–436.

Shockman, G.D., Høltje, J.-V., 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolase. In: Ghuysen, J.-M., Hakenbeck, R. (Eds.), *Bacterial Cell Wall*. Elsevier, Amsterdam, pp. 131–166.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. *Cancer statistics reports for the UK*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Salto, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinson, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for Journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>