

---

# Especiação de bactérias encontradas no gelo através do método MALDI-TOF-MS

*Specification of bacteria found in ice through the MALDI-TOF-MS method*

Patrícia Azevedo Soares Cordeiro<sup>1</sup>, Renata Bazante Rodrigues<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, Aphaville-SP, Brasil.

---

## Resumo

**Objetivo** – Determinar a especiação de bactérias gram-negativas em quatro diferentes marcas de gelo através do método MALDI-TOF-MS e avaliar sua potabilidade. **Metodos** – Com o equipamento multiparâmetros, da marca Hanna®, foram avaliados: pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e temperatura. Preparou-se meio Agar Mac Conkey para observação do crescimento bacteriano de Gram-negativas, sua morfologia através da coloração de Gram e a sua especiação pelo método MALDI-TOF-MS. **Resultados** – Houve crescimento na amostra 4 e como método MALDI-TOF-MS foi identificada a espécie *Pseudomonas monteilli*. **Conclusão** – Os parâmetros físico-químicos estão de acordo com a Resolução 357/05 do CONAMA e a portaria 2.914/11 do MS. A espécie *P. monteilli* foi detectada em 15 minutos, podendo substituir o método tradicional que levaria dias para identificação, tornando um método revolucionário e de importância à saúde pública.

**Descritores:** Análise físico-química; Gelo; *Pseudomonas*

## Abstract

**Objective** – To determine the speciation of gram-negative bacteria in four different ice brands using the MALDI-TOF-MS method and to evaluate their potability. **Methods** - With the Hanna® multiparameter equipment, the following parameters were evaluated: pH, electrical conductivity, dissolved oxygen and temperature. Mac Conkey Agar medium was prepared for observation of Gram-negative bacterial growth, its morphology by Gram staining and its speciation by the MALDI-TOF-MS method. **Results** – There was growth in sample 4 and as the MALDI-TOF-MS method was identified the species *Pseudomonas monteilli*. **Conclusion** – The physicochemical parameters are in accordance with CONAMA Resolution 357/05 and MS Ordinance 2.914 / 11. *P. monteilli* was detected within 15 minutes and could replace the traditional method that would take days to identify, making it a revolutionary method of public health importance.

**Descriptors:** Physicochemical analysis; Ice; *Pseudomonas*

---

## Introdução

Em pleno século XXI, São Paulo e seus municípios vêm apresentando um rápido crescimento urbano e a escassez de água vem acompanhando esse ritmo. Contudo, a contaminação dos corpos hídricos é uma realidade, onde a população está ficando doente, de forma direta ou indireta, através do consumo de água contaminada devido à falta de saneamento básico.<sup>1,2</sup>

Água submetida ao processo de congelamento poderá ser classificada potável e destinada ao consumo humano, podendo ser comercializada em pacotes, devidamente registrados pelos órgãos fiscalizadores.<sup>3</sup>

Muitos estabelecimentos adquirem gelos processados para seus clientes, seja durante um pedido de uma bebida ou para refrigerar alimentos e, independente da forma de utilização, o gelo deverá apresentar padrões específicos de qualidade e não apresentar contaminação cruzada quando estiver em contato com outros alimentos. A falta de cuidados básicos durante sua fabricação, manuseio, embalagem, conservação e distribuição pode ocasionar riscos de contaminação, além de gerar diversas infecções, intoxicação e viroses.<sup>4,5</sup>

Uma das profilaxias para ter o acesso a água potável é seguir portaria 2.914 do Ministério da Saúde que regulamenta as diretrizes da qualidade da água, além

disso, deve-se observar e seguir as boas práticas de fabricação do gelo de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada Nacional de Vigilância Sanitária (RDC) nº274, de 23 de setembro de 2005, onde descreve requisitos, desde a fabricação até a sua comercialização, de forma a evitar o risco de contaminação.<sup>6</sup>

Outro código importante é o Código de Proteção e Defesa do Consumidor; consta no Art. 31 a determinação sobre o produto, uma vez que este deve conter informações concretas, tais como, quantidade, preço, prazo de validade, origem, identificação do lote, lista de ingredientes, conteúdo líquido, além das condições necessárias para armazenamento como temperatura máxima e mínima.<sup>7,8</sup>

De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no 259, de 20 de setembro de 2002, a identificação na embalagem deverá conter o nome do fabricante, produtor ou titular da marca, seu código de identidade e endereço completo com o país e município do local que foi produzido.<sup>4,7,8</sup> Entretanto, nas identificações microbiológicas, geralmente são utilizados métodos que envolvem cultura, onde é possível identificar diferenças metabólicas levado tempo médio de 24 a 72 horas. Mas, em algumas circunstâncias, a demora de um diagnóstico bacteriano, principalmente em matrizes ambientais, poderá causar um risco de

toxicidade aguda e/ou crônica, resultando doenças severas e graves aos seres humanos. Nesse contexto, os novos métodos de diagnósticos, por exemplo, a espectrometria de massa (MS – Mass Spectrometry) acoplada à técnica - MALDI-TOF-MS, permite um diagnóstico precoce da etiologia bacteriana, tendo em média de 5 a 15 minutos.

A sigla MALDI-TOF está em inglês – Matrix Associate Laser Desorption- Ionization- Time of Flight; traduzindo o mesmo para o português, a palavra MALDI significa ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz e TOF significa Tempo de Vôo. Essa ionização, envolve a ação de um laser que atinge uma determinada matriz que é formada por pequenas moléculas orgânicas. O “tempo de vôo” ou detector TOF, é a parte do equipamento que permite determinar da taxa de carga no tempo que leva para os íons atingirem o detector.<sup>9-14</sup>

O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de bactérias gram-negativas em amostras de gelo e sua especificação através do método de MALDI-TOF-MS, seguidas das análises físico-químicas para o diagnóstico de sua potabilidade destinado ao consumo humano.

## Métodos

Foram adquiridas quatro diferentes marcas de gelo, compradas em postos de gasolina e mercados, ambos localizados da região de Carapicuíba (SP). Foram verificados todos os lacres das embalagens e transportados em caixas térmicas, para manter a temperatura até a análise no laboratório de microbiologia da Universidade Paulista – UNIP – campus Alphaville.

Após a chegada das amostragens, gases embebidas com álcool 70% foram passadas nas embalagens para uma prévia assepsia, em seguida com o descongelamento dos gelos em recipientes estéreis, uma alíquota de 1,0 ml de cada amostra numerada de 1 a 4 foram transferidas para placas de Petri com o meio nutritivo Ágar Mac Conkey, conforme mostra as figuras 1 e 2. Para a amostra controle, o mesmo procedimento foi realizado para a água que é fornecida para o abastecimento público pela SABESP, realizando primeiramente o seu congelamento e o descongelamento. Em seguida, todas as amostras foram incubadas a  $37 \pm 2,0$  °C por um período de 72 horas, como mostra as figuras 1 e 2.<sup>15</sup>

Após o crescimento no meio, colônias foram fixadas em uma lâmina para a coloração de Gram. Durante essa técnica, foi utilizado o corante cristal de violeta, na sequência lugol, álcool (como descorante) e o corante fucsina, como mostra a figura 3.<sup>16</sup>

A análise físico-química do gelo ocorreu em temperatura ambiente (25°C), observando seu estágio de degelo e, com o auxílio do equipamento Multiparâmetro, da marca Hanna®, para a determinação dos seguintes parâmetros: pH, condutividade elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ ), Oxigênio Dissolvido (mg/L), temperatura da água (oC), como mostrado na figura 4.<sup>11</sup>

Em seguida, para a realização do método MALDI-TOF-MS, replicou-se o material em uma placa sólida contendo o meio Ágar-sangue para obtenção de uma

colônia junto com a solução da matriz polimérica. Na sequência, a amostra foi depositada em uma Target (conhecida como alvo). Este alvo, é feito de aço inoxidável polido, com pontos para aplicar várias amostras diferentes, como mostrado na figura 5.

O alvo foi irradiado, de forma que a amostra foi a tingida por um laser UV pulsado. Dessa maneira, a matriz (água) absorveu a energia do laser e depois sofreu evaporação. Durante esse processo, as moléculas da amostra de gelo foram ionizadas. As moléculas gasosas foram aspiradas em um tubo a vácuo ao encontro do detector –TOF. Dessa maneira, um registro do tempo que leva para cada grupo de íons foi verificado, incluindo a distância percorrida. O resultado foi mostrado em gráficos, onde picos específicos para cada espécie de microrganismo foram identificados e, por fim, um gráfico foi analisado por uma base de dados computadorizada.<sup>14,17</sup>

## Resultados

Após o período de incubação relatado na metodologia acima, foi observado crescimento em apenas uma das 4 amostras, como mostrado na figura 6. Após o crescimento, colônias foram fixadas em uma lâmina e observou-se a morfologia de bactérias do tipo Gram-negativas com o auxílio de um microscópio óptico em visualização de 1000 vezes, conforme figura 7.

Nas análises físico-químicas os resultados estão descritos na Tabela 1. O parâmetro pH está de acordo com a portaria 2.914/11 do MS e a resolução 357/05 do CONAMA para água de classe II.<sup>12,18</sup>

Os valores para Oxigênio Dissolvido (OD) foram de: 4,3 mg/L (mínima) e 5,4 mg/L (máxima). De acordo com a portaria 357 do CONAMA, os valores de OD obtidos foram abaixo de 5 mg/L nas amostras 1 e 2, entretanto, esses resultados não representam riscos para o consumo humano. A condutividade elétrica de todas as amostras sugere que o gelo contém baixa concentração de sais minerais.

O rápido resultado obtido pelo MALDI-TOF-MS possibilitou verificar a espécie gram-negativa que cresceu na amostra 4; em apenas 15 minutos foi possível a identificação da bactéria da espécie *Pseudomonas montielli*, que é uma bactéria bacilar, termotolerante e oportunista, como mostra a figura 8<sup>19,20</sup>

## Discussão

A contaminação do gelo pode ter ocorrido em qualquer etapa da produção, tanto na fonte de origem da água para produzi-lo como no processamento, armazenamento até a sua venda. Portanto, deve-se ter controle sanitário em diversas etapas e acompanhar sua qualidade com os testes físico-químicos e microbiológicos. Outro aspecto importante é à rotulagem dos produtos com informações, como a baixa condutividade elétrica. De acordo com o resultado, todas as amostras analisadas apresentaram baixa condutividade elétrica, o que implicaria numa baixa concentração de sais. De acordo com o Art. 31 do Código de Defesa do Consu-

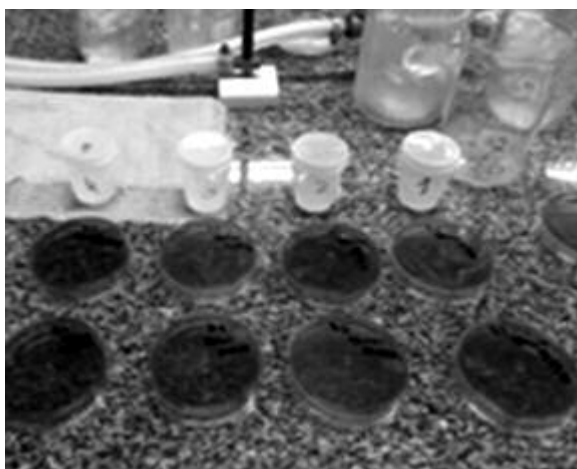


Figura 1. Placas de Petri com amostras degeladas em duplicatas

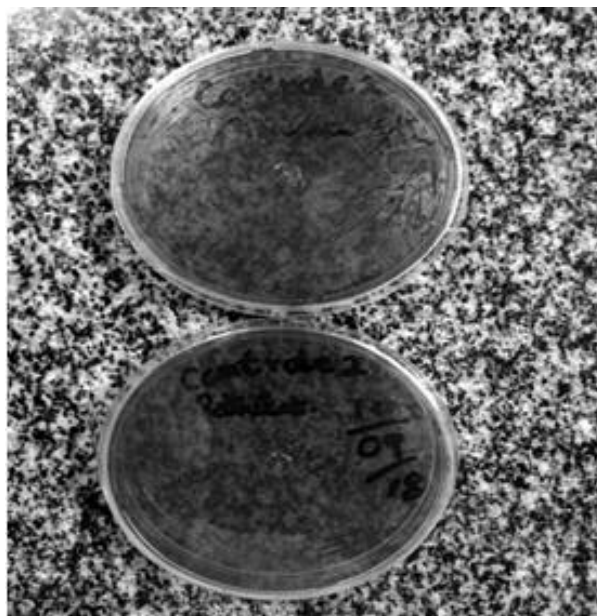


Figura 2. Amostra controle realizado com água da SABESP

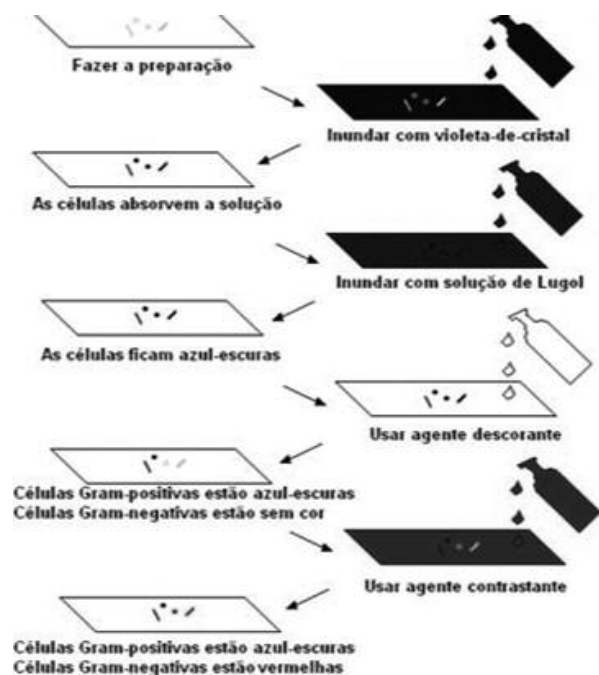
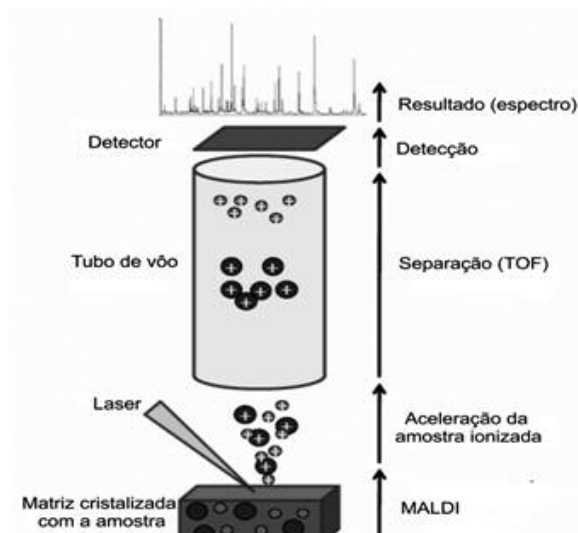


Figura 3. Preparo passo a passo da técnica de coloração de Gram.



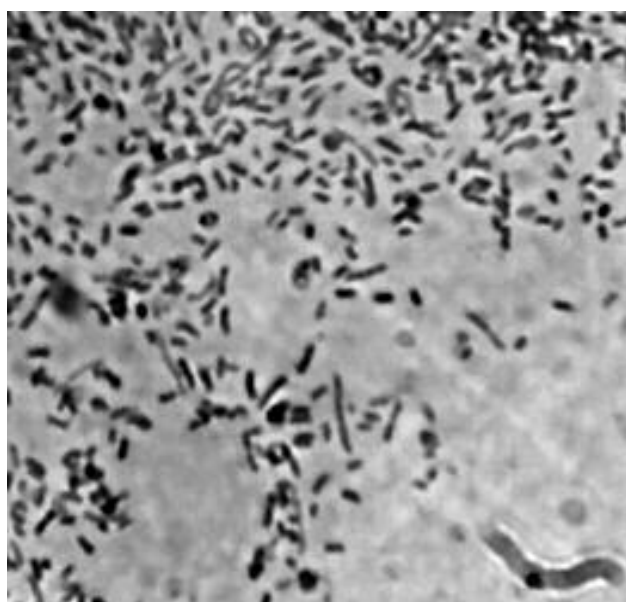
Figura 4. Equipamento Multiparâmetro utilizado nas análises físico-Químico.



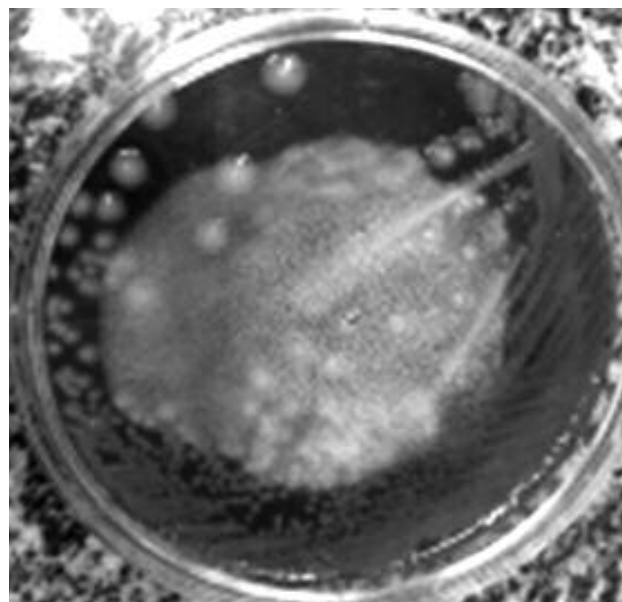
**Figura 5.** Passo-a-passo do método MALDI-TOF-MS.  
 FONTE: <http://www.nanocell.org.br/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>



**Figura 6.** Crescimento bacteriano em placa de Petri contendo o meio Mac Conkey da amostra 4.



**Figura 7.** Crescimento bacteriano em placa de Petri contendo o meio Mac-Conkey.



**Figura 8.** Crescimento bacteriano em placa de Petri contendo Ágar-sangue.

**Tabela 1. Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos das amostras degeladas**

Parâmetros	A1	A2	A3	A4	Controle	VMP
Condutividade (µS/cm <sup>2</sup> )	25,26 = 0,32	14,50=0,30	14,40=0,30	12,60=0,40	114,70=0,60	*
pH*	7,05=0,60	6,95=0,27	6,52=0,32	6,48=0,25	6,60=0,20	6,00–9,50
Oxigênio Dissolvido(mg/L)	4,74=0,82	4,31=0,9	5,32=0,59	5,42=0,53	6,52=32	> 5,00
Temperatura (°C)	17,30=0,20	17,28=0,31	17,16=0,04	17,08=0,08	23,00=0,01	*

\* Valores máximos permitidos (VMP) pela portaria 2914/11 do Ministério da Saúde \*\* Resolução 357 do CONAMA para manacial de classe2. Controle água do sistema Cantareira – distribuída pela SABESP.

midor-Lei 8079/90 os produtos devem assegurar informações sobre data de validade, origem, preço, garantia, características, quantidades, qualidades e composição.<sup>21</sup>

A utilização do método MALDI permite a ionização de moléculas orgânicas e possibilita um ganho de tempo analítico amostral. Em apenas 15 minutos a especificação da bactéria estará pronta. Esse é um método muito pouco utilizado em análises de matrizes ambientais (água, solo, sedimento, ar) e, quando comparado com o meio tradicional (cultura bacteriana em meio nutritivo) permite precocemente obter dados específicos em prol do consumo de água potável em nossa sociedade. Desse modo, o método contribui na diminuição do percentual de diagnósticos errôneos ou demorados, melhorando a fiscalização e gerando um controle de possíveis patógenos de veiculação hídrica. Há poucos estudos da técnica de MALDI-TOF-MS em amostras de gelo para avaliar as espécies de bactérias. Há evidência da ocorrência da sepse, principalmente em pacientes imunodeficientes ou imunodeprimidos, onde há uma diminuição congênita ou adquirida da imunidade no organismo, sendo sucessíveis a contaminação por microrganismos oportunistas, como é o caso da bactéria identificada neste trabalho, pertencente a espécie *Pseudomonas monteilii*, considerada uma bactéria termotolerante e que está presente no solo, lixo e esgoto doméstico e, apresenta-se muito comum em ambiente hospitalar, diversificando-se em ambiente seco, tais como, piso e/ou roupa de cama, fronhas ou em ambientes úmidos, tais como, pia, vaso sanitário. A mesma espécie causa também exalação de bronquiectasia, ou seja, a bactéria destrói as células dos brônquios, gerando dilatação e deformação irreversível, acumulando muco nos pulmões. O paciente não consegue expelir o muco, possibilitando um avanço no processo de infecção local.<sup>19</sup>

O MALDI-TOF-MS permite diversas vantagens ao paciente, ao médico, ao laboratório, pois além do diagnóstico precoce, nota-se a diminuição de resíduos gerados no setor microbiológico e possibilita o uso racional de antibióticos. A redução do tempo pela escolha adequada do antibiótico vem impactando positivamente, além disso as placas utilizadas também podem ser arquivadas e armazenadas com nitrogênio líquido ou argônio, garantindo rastreabilidade segura do laboratório clínico.<sup>17</sup>

Apesar dos benefícios do MALDI-TOF-MS, os bancos de dados de espectro de referência (ER) disponíveis precisam de atualizações, pois espécies filogeneticamente semelhantes podem não ser diferenciadas, causando erro analítico, além disso, os bancos de dados são de propriedades privadas, incluindo as instituições de pesquisas. Nesse aspecto, há desvantagem, pois, as informações desses espectros não são de livre acesso aos profissionais da área biomédica, embora seja bem avaliada perante o benefício que o diagnóstico permitirá na busca eficaz de tratamento ao paciente.<sup>17</sup>

## Conclusão

Conclui-se que a água destinada ao consumo humano em seu estado físico sólido (gelo) merece a mesma atenção dada aos critérios adotados pela potabilidade da água em seu estado líquido, embora a portaria 2.914/11 do Ministério da Saúde não apresente como critério a identificação desta específica bactéria encontrada na amostra 4, caracterizada por ser gram-negativa, bacilar, termotolerante e oportunista – *Pseudomonas monteilii*.

A técnica de MALDI-TOF-MS contribuiu de forma rápida e eficaz na identificação da bactéria gram-negativa, permitindo avaliar sobre a qualidade microbiológica desse gelo comercializado e consumido diretamente ou indiretamente pela população. É um método revolucionário e de importância à saúde pública, permitindo uma avaliação detalhada de fontes hídricas, pois a água pode ser um veículo de contaminação. Deve-se atribuir a utilização do método em diagnóstico da água potável pelos laboratórios da SABESP e demais laboratórios de análise microbiológica, assim como futuras pesquisas nas áreas de saneamento ambiental, higiene e saúde pública.

Esse trabalho, permitiu produzir informações físico-químicas relevantes que não constavam nas rotulagens de algumas marcas e que poderiam ser incluídas, tais como pH, por exemplo, além de outros parâmetros do gelo, como condutividade elétrica e oxigênio dissolvido em sua temperatura ambiente para o consumo.

## Refêrencia

1. Bazante-Yamaguishi R. Especificação de alumínio em águas subterrâneas na região do manancial Billings: aplicação da radiação ionizante na digestão amostral para fins analíticos e na proposta de remediação [Tese]. São Paulo: IPEN; 2013.
2. Scuracchio P. Qualidade da água utilizada para consumo em escola do município de São Carlos: [dissertação de Mestrado]. Araraquara-SP: UNESP; 2010.
3. Senhorinho JM, Carvalho LR. Avaliação microbiológica de gelo destinado ao consumo humano comercializado na cidade de Itabuna-Bahia. Rev Eletr. Fram. 2017; 14 (2):15-22.
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). RDC no 259, Rótulos de Alimentos segundo esta resolução de 20 de Setembro de 2002 aprova o regulamento sobre a rotulagem de alimentos. 2000 [Acesso 07 de jul 2018]. Disponível em <https://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/informes/1455824267-1ed.pdf>.
5. Leoneti AB, Prado EL, Oliveira SVB. Saneamento Básico no Brasil: considerações sobre investimentos e sustentabilidade para o século XXI. Rev Admin Pública. 2011;45(2).
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Regulamento Técnico para Águas Envasadas e Gelo. 2005 [acesso 09 jun 2019]. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC\\_274\\_2005.pdf/19d98e61-fa3b-41df-9342-67e0167bf550](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_274_2005.pdf/19d98e61-fa3b-41df-9342-67e0167bf550).
7. Grassi MT. As Águas do planeta Terra. In: Giordam M, Jardim WF (Eds). Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola; 2001; p.31-40.
8. Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial - INMETRO. Relatório da análise de gelo para consumo humano; 2015.

9. Ferreira MJ. Características microbiológicas do gelo para consumo comercializado no recôncavo baiano. [Monografia]. Cruz das Almas - BA: Universidade Federal do Recôncavo Baiano; 2013.
10. Gomes KG, Gomes FB, Ponte AFP, Silva AKM. Avaliação microbiológica e físico-química do gelo comercializado em lojas de conveniência de postos e combustíveis da cidade de Sobral-Ceará. In: Anais do VII Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste em Educação Tecnológica: 2012; Tocantins-TO. 2012.
11. Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. Manual Prático de Análises de água. Brasília: 2013.
12. Ministério da Saúde. Portaria 2.914 de 12 de Dezembro de 2011 [Acesso 07 de jul 2018]. Disponível em [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html).
13. Mendes ALS. Qualidade microbiológica do gelo para consumo em bebidas. um estudo no estabelecimento das zonas balneárias do Porto [dissertação de mestrado]. Universidade do Porto, 2009.
14. Pasternak J. Novas metodologias de identificação de microorganismos: MALDI-TOF. Eisntein. 2012;10(1):118-9.
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. 2004; p.1-66 [Acesso 07 de jul 2018]. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod\\_4\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf).
16. Martins CRF, Ferreira JAPS, Siqueira LFG, Ferreira LAP, Basso ML, Franchini M, et. al. Técnica de coloração gram. Brasília: Ministério da Saúde; 1997.
17. Bier D, Tutija JF, Pasquatti TN, Oliveira TL, Araújo FR, Verbisc NV. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella spp* e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. Pesq. Vet. Bras; 2017;37(12):.1373-9.
18. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011; 2011:58-63 [Acesso 07 de jul 2018]. Disponível em <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>.
19. Aditi SM; Beri K. Exacerbation of bronchiectasis by *Pseudomonas monteilii*: a case report. BMC Infect Dis. 2017.
20. Bogaerts P, Bouchahrouf W, Lissoir B, Denis O, Glupczynski, Y. IMP-13-producing *Pseudomonas monteilii* recovered in a hospital. J Antimicrobial Chemother. 2011;66(10): 2434-5.
21. BRASIL. Lei 8078/90 de 11 de Setembro de 1990. Código de proteção e defesa do consumidor e legislação correlata. Brasília-DF: 2011 [Acesso 07 de jul 2018]. Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l8078.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8078.htm).

**Endereço para correspondência:**

Patrícia Azevedo Soares Cordeiro  
Universidade Paulista  
Av. Yojiro Takaoka, 3500 – Tamboré  
Santana de Parnaíba-SP, CEP 06541-038  
Brasil

E-mail: [patriciaazevedo2000@gmail.com](mailto:patriciaazevedo2000@gmail.com)

Recebido em 04 de novembro de 2019  
Aceito em 29 de novembro de 2019