

EVOLUÇÃO DAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

*Evolution of diagnostic techniques
in clinical microbiology*

Larissa Morbi Perantoni¹

Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes²

¹*Bióloga, especialista em Análises Clínicas pela Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, SP, Brasil.*

²*Doutora em Ciências Farmacêuticas com ênfase em Microbiologia e Biotecnologia. Faculdade São Leopoldo Mandic, Araras, SP, Brasil.*

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

RESUMO

Introdução: A identificação microbiana é importante por gerar impacto tanto no tratamento do paciente quanto na saúde pública, pois o diagnóstico rápido e preciso propicia o direcionamento adequado da terapia antibiótica e o rápido controle da infecção. Por conta disso, atualmente, os laboratórios de microbiologia clínica estão passando por mudanças significativas, com o desenvolvimento de sistemas de automação que aceleram o diagnóstico. Esses avanços foram possíveis devido ao progresso tecnológico e à busca de novas estraté-

Recebido em: 05/02/2019

Aceito em: 30/04/2019

gias que reduziram os custos dessas ferramentas, tornando-as mais acessíveis. **Objetivo:** Este estudo buscou ressaltar a importância da implantação de novas e avançadas tecnologias nos laboratórios de microbiologia. **Metodologia:** Realizou-se revisão de literatura em bases de dados científicas. **Desenvolvimento:** As técnicas tradicionais de diagnóstico microbiológico incluem desde métodos diretos como coloração e microscopia ótica até métodos indiretos como, por exemplo, cultura e testes bioquímicos. O principal problema é o fato de que essas técnicas demandam tempo para fornecer uma resposta ao clínico e, em muitos casos, necessita de técnicos bem treinados para a interpretação correta dos resultados. Por isso, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas. As principais técnicas inovadoras incluem a Biologia Molecular, os Imunoensaios e a Espectrometria de Massa. **Considerações finais:** O acesso às novas tecnologias permite resolver questões diagnósticas que estão cada vez mais desafiadoras e também contribuem para a melhoria do cenário clínico e a saúde pública.

Palavras-chave: Avanços tecnológicos. Biologia molecular. Imunoensaios. MALDI TOF.

ABSTRACT

Introduction: *Microbial identification is important due to its impact on both the patient and public health, because the rapid and accurate diagnosis allows of correct antibiotic treatment and control of infection. Currently, clinical microbiology laboratories are undergoing significant changes due to the development of automation systems, which enables faster and more accurate diagnosis. These advances were possible due to technological progress and the search for new strategies that reduced the costs of these tools, making them more accessible.* **Objective:** *This study aimed to highlight the importance of the implantation of new and advanced technologies in microbiology laboratories.* **Methodology:** *A review of scientific literature was carried out in scientific databases.* **Development:** *Traditional techniques of microbiological diagnosis include direct methods such as staining methods and optical microscopy to indirect methods such as culture and biochemical tests. The main problem is the fact that these techniques take time to provide a response to the clinician and, in many cases, need well-trained technicians for the correct interpretation of the results. It is, therefore, becoming increasingly important to develop rapid and accurate techniques.*

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

The innovative techniques include molecular biology, immunoassays, and mass spectrometry. Final considerations: Access to new technologies makes it possible to solve diagnostic issues that are increasingly challenging and also contribute to the improvement of the clinical setting and public health.

Key words: *Technological advances. Molecular biology. Immunoassays. MALD TOF.*

INTRODUÇÃO

As técnicas desenvolvidas em microbiologia clínica têm como finalidade identificar os micro-organismos causadores de determinadas infecções (MÜHLHAUSER; RIVAS, 2014). Essa identificação microbiana, assim como a determinação de sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos é importante devido ao fato de gerar impacto tanto no paciente quanto na saúde pública, pois a partir do diagnóstico rápido e preciso, é possível direcionar adequadamente o tratamento antibiótico e o controle da infecção (ROSSELLÓ; PÉREZ, 2016).

Nota-se que aumenta cada vez mais a necessidade de técnicas de diagnóstico rápido, principalmente por conta dos elevados números de infecções graves causadas por micro-organismos resistentes. Consequentemente, nos dias atuais, os laboratórios de microbiologia clínica estão passando por mudanças significativas, devido ao desenvolvimento de sistemas de automação, apoiadas pelos avanços tecnológicos como o diagnóstico molecular, microbiologia digital e espectrometria de massas, o que possibilita um diagnóstico mais rápido (VILA *et al.*, 2017).

Ao contrário das outras áreas laboratoriais, a evolução tecnológica na área de microbiologia clínica não foi algo simples e rápido de ser incorporado, devido principalmente à diversidade de micro-organismos e à grande variedade de amostras quando comparado a outros exames, como bioquímicos e hematológicos, o que levou inicialmente à implementação de tecnologias menos rentáveis (HERVÉ, 2015).

Os sistemas automatizados foram introduzidos nos laboratórios de microbiologia por volta de 1960, inicialmente com sucesso limitado. Atualmente, instrumentos automatizados são partes fundamentais nos laboratórios microbiológicos para o gerenciamento de espécies, detecção microbiana, amplificação de ácido nucléico e testes de susceptibilidade (QUIROGA, 2016).

Todos esses avanços foram possíveis devido ao progresso tecnológico e a busca de novas estratégias que reduziram os custos dessas ferramentas tornando-as mais acessíveis. O acesso às novas tecnologias não permite apenas resolver novas questões científicas que estão cada vez mais desafiadoras, mas também que possam ser inseridas no cenário clínico e levadas para a comunidade (QUIROGA, 2016).

Nas duas últimas décadas, o desenvolvimento de técnicas rápidas de diagnóstico proporcionou um grande e importante avanço, pois os resultados podem ser obtidos em poucas horas (VILA *et al.*, 2017). Além disso, a automação trouxe diversos outros benefícios, como: o aumento da produtividade do laboratório, melhor qualidade dos processos analíticos, menor probabilidade de erros, redução de custos, facilidade de realizar estatísticas para o gerenciamento laboratorial e a sistematização na emissão dos laudos (PUMAROLA, 2010).

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se revisão de literatura com o intuito de enfatizar as evoluções tecnológicas do diagnóstico em microbiologia clínica. As buscas foram realizadas em bases de dados como PubMed, Science Direct, Google Acadêmico e Scielo. Foram selecionados artigos escritos em Língua Portuguesa, Inglesa e Espanhola, e livros didáticos publicados entre 2000 e 2018.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Técnicas Tradicionais

As técnicas tradicionais de diagnóstico microbiológico incluem desde métodos diretos como métodos de coloração e microscopia ótica até métodos indiretos como, por exemplo, cultura e testes bioquímicos, em que características metabólicas específicas são detectadas nos micro-organismos (VILA *et al.*, 2017).

Os métodos fenotípicos de identificação microbiana, incluindo a coloração de Gram, o crescimento em cultura e testes bioquímicos, ainda são os métodos de primeira escolha para a realização do diagnóstico microbiológico na maioria dos laboratórios de todo o mundo, por serem técnicas que permitem a identificação da maioria das bactérias isoladas e possuem menor custo. Entretanto, demandam tempo para fornecer uma resposta ao clínico e, em muitos casos,

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

necessita de técnicos bem treinados para a interpretação correta dos resultados. Por isso, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas (MIMICA *et al.*, 2013).

Durante anos, a identificação microbiana nos laboratórios de microbiologia foi realizada de acordo com a morfologia, a estrutura da parede e a capacidade de crescer em diferentes meios de cultura seletivos e diferenciais ou em condições de temperatura variadas. Recentemente, algumas dessas técnicas sofreram avanços significativos na miniaturização em formatos que permitiram aumentar o número de testes e, eventualmente, a automatização da leitura desses resultados, apresentando melhorias em relação ao tempo de resposta. No entanto, ainda apresentam limitações em relação à confiabilidade, especialmente, quando se trata de micro-organismos que demoram a crescer ou que não se desenvolvem em todos os meios de cultura (BELLIDO *et al.*, 2012).

A cultura é um método básico que permite isolar o micro-organismo e posteriormente identificá-lo, sendo ainda, a principal etapa para se alcançar o diagnóstico de doenças bacterianas, pois possibilita ainda determinar a sensibilidade microbiana. Entretanto, essa técnica necessita de meios de cultura especializados e tempo, o que muitas vezes é crucial no tratamento do paciente (VILA *et al.*, 2017).

A cultura tradicional requer tempo maior por ser necessário aguardar a reprodução suficiente de células do micro-organismo, o que pode levar horas (18 a 24 para a maioria das bactérias) ou até mesmo dias ou meses (caso de micobactérias e fungos filamentosos), e como em toda técnica manual, pode sofrer interferências devido a falha dos analistas (MÜHLHAUSER; RIVAS, 2014).

Após o isolamento do micro-organismo, a identificação pode ser realizada por diferentes metodologias, como pela observação macroscópica da colônia, sendo limitada, pois é possível observar apenas a morfologia da colônia e as reações produzidas no meio de cultura, pela observação microscópica com coloração, em que pode ser observada a afinidade do micro-organismo pela coloração ou pelo estudo do comportamento bioquímico, podendo ser realizado através de testes manuais como culturas cromogênicas, testes bioquímicos, testes diretos ou através de sistemas automatizados, onde é possível a realização de testes bioquímicos e metabólicos de forma miniaturizada (MÜHLHAUSER; RIVAS, 2014).

A análise das características morfológicas e alguns testes bioquímicos permitem apenas a identificação presuntiva dos patógenos, sendo muitas vezes necessários outros testes complementares para confirmar a identificação (PEREIRA; PETRECHEN, 2011). Essas reações, juntamente com a diferenciação sorológica, podem demo-

rar cerca de 48 horas para determinar o diagnóstico (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013).

Um meio cromogênico recentemente desenvolvido é o *Chromagar Orientation*®, em que as culturas assumem diferentes cores de acordo com as suas características enzimáticas (SAMRA *et al.*, 2008) e é utilizado para identificação direta, diferenciação e enumeração de agentes patogênicos comuns do aparelho urinário. O meio é apropriado para o isolamento de muitos micro-organismos de crescimento aeróbio e foi introduzido na rotina laboratorial com o intuito de substituir as técnicas de cultura tradicionais, pois a identificação do micro-organismo é mais rápida, além de possuir um menor custo em comparação às demais técnicas (XIMENES, 2009). Entretanto, possui algumas limitações, pois ainda é necessário realizar testes de confirmações e não é seletivo, podendo haver o crescimento de outros micro-organismos (BD).

A identificação de fatores de virulência é de extrema importância, pois determina os fatores responsáveis pela patogenicidade do micro-organismo. Três métodos podem ser utilizados para identificação de virulência: biológicos, imunológicos ou genéticos. Os testes biológicos consistem na inoculação de culturas purificadas em linhagens celulares *in vitro*. Uma das utilidades dessa técnica é a pesquisa de enterotoxinas ST e LT de *Escherichia coli*. Os métodos imunológicos consistem na utilização de anti-soros específicos contra estruturas associadas à patogenicidade bacteriana e os métodos genéticos são capazes de identificar o fator de virulência do patógeno através do seu genoma (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Sistemas de cultura automatizados vêm sendo utilizados em alguns laboratórios, como o BD BACTEC™. Esse sistema consiste em um método sensível e específico para identificação do micro-organismo em amostras de sangue, em que é possível a incubação simultânea de várias amostras, eliminando a necessidade da verificação diária e a necessidade de realizar subculturas (MINASSIAN *et al.*, 2014).

Há uma grande variedade de equipamentos automatizados para cultura. Dentre os disponíveis nos laboratórios brasileiros, podemos citar: MGIT (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, USA), BacT/ALERT® 3D 60/120/240 (BioMérieux, Durham, NC, EUA), e BACTEC® modelos FX, série 9000 (9050, 9120, 9240).

O BD BACTEC MGIT é utilizado para o isolamento de micobactérias, permitindo o crescimento em um menor tempo. Entretanto, é um método trabalhoso, e exige que os laboratórios lidem com diversas normas de segurança associadas ao uso de radioisótopos

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

(WILLIAMS-BOUYER *et al.*, 2000). Essas técnicas reduziram o tempo de identificação de micro-organismos causadores de septicemias para cerca de 8 a 10 horas (HERVÉ, 2015).

Apesar de a cultura automatizada apresentar benefícios significativos, algumas desvantagens podem dificultar sua implementação, dentre elas, o alto custo e o tamanho dos equipamentos, que pode ser um problema em laboratórios menores (GUAREZE; BORDIGNON, 2016).

Visando sanar as limitações das técnicas tradicionais descritas acima, metodologias inovadoras baseadas principalmente em características genéticas, sorológicas ou de massa molecular dos constituintes dos micro-organismos começaram a ser desenvolvidas, contribuindo assim, em diversos aspectos, como para a credibilidade da identificação e o diagnóstico direto da amostra, sem a necessidade de cultivo prévio, reduzindo o tempo para iniciar o correto tratamento do paciente (BELLIDO *et al.*, 2012).

Técnicas Inovadoras

Biologia Molecular

As técnicas que envolvem biologia molecular representam um dos maiores avanços do século XX, trazendo grandes benefícios em diversas áreas, inclusive no diagnóstico de doenças infecciosas. Gerou grande interesse, principalmente pela possibilidade de reduzir o tempo necessário para identificar um micro-organismo, o que é um fator crucial no sucesso do tratamento (VALONES *et al.*, 2008) (CAMARGO; SILVA, 2014).

Estas técnicas têm sido muito aplicadas no diagnóstico de doenças infecciosas e, diferentemente dos métodos imunológicos em que se identifica a doença através de anticorpos, as técnicas moleculares amplificam a molécula de DNA na amostra e analisam as características genéticas dos micro-organismos (CAVALCANTI *et al.*, 2008).

Os métodos de biologia molecular tiveram grandes avanços na última década, devido à sua sensibilidade e especificidade para detectar e amplificar pequenas quantidades de DNA dos micro-organismos. Esse método permitiu também o estudo da resistência bacteriana (MÜHLHAUSER; RIVAS, 2014).

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é considerada um método inovador dentro da biologia molecular, que consiste na duplicação de cadeias de DNA *in vitro*, por meio de etapas de variações de temperatura, permitindo assim, a obtenção de diversas cópias de uma determinada sequência de ácidos nucleicos (CAMARGO;

SILVA, 2014). É uma técnica altamente flexível, pois permite a sua aplicação em uma grande variedade de amostras. Dentre as principais variações da PCR, podemos citar o PCR *multiplex*, a *nested-PCR* e a PCR em tempo real (CAVALCANTI *et al.*, 2008; HAAS; TORRES, 2016).

No *multiplex* PCR, é possível a amplificação de mais de uma sequência de DNA em uma mesma amostra. Essa variação da PCR foi desenvolvida com o intuito de diferenciar as espécies microbianas. É considerado um teste altamente específico, contando ainda com a vantagem da maior rapidez na obtenção de resultados e um menor custo devido à economia de reagentes, afinal, a amplificação das diferentes sequências é realizada simultaneamente (CAVALCANTI *et al.*, 2008; HAAS; TORRES, 2016).

Na *nested-PCR* são utilizados dois pares de iniciadores para a amplificação e, ao invés de se usar uma amostra primária para fazer a PCR, utiliza-se o produto de amplificação da primeira reação como molde para a segunda, ou seja, é a PCR do produto da PCR. Entretanto, por ser uma técnica de amplificação simultânea, pode ocorrer contaminação das amostras (LIMA *et al.*, 2009).

A PCR em tempo real permite o monitoramento e a quantificação dos ácidos nucleicos com maior especificidade. É uma técnica baseada no uso de sondas fluorescentes e, dentre suas vantagens, podemos citar a facilidade na quantificação, análise rápida e precisa, maior sensibilidade e menor risco de contaminação (VALONES *et al.*, 2008).

A possibilidade de resultados falso-positivos e falso-negativos ainda são limitações das técnicas de amplificação de DNA, mesmo sendo técnicas consideradas avançadas tecnologicamente. Os falso-positivos, geralmente, são decorrentes de possíveis contaminações, e os resultados falso-negativos podem estar ligados à presença de inibidores da PCR (CAVALCANTI *et al.*, 2008).

Imunoensaios

As técnicas de imunoensaios são utilizadas para detectar e/ou quantificar antígenos e anticorpos. Nos últimos anos, os métodos de imunoensaios sofreram significativos avanços tecnológicos na produção de antígenos e anticorpos e de analisadores automáticos. Esses avanços favoreceram a rapidez na realização dos testes (BENDER; MÜHLEN, 2008).

Através dos métodos de diagnóstico imunológicos, é possível realizar a classificação sorológica da bactéria *Escherichia coli*, que é

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

baseada em elementos que provocam uma resposta imune: Antígeno O (encontrado na parede celular), Antígeno K (encontrado na cápsula) e o Antígeno H (encontrado nos flagelos) (FAÚLA, 2016).

Diversas técnicas de imunoenaios são utilizadas para o diagnóstico microbiológico. Dentre as principais e mais utilizadas, está a imunocromatografia, que permite detectar o micro-organismo diretamente da amostra, utilizando uma membrana de nitrocelulose ligada a uma tira de acetato que contém o primeiro anticorpo. Para realizar a detecção do antígeno, utiliza-se um anticorpo de captura, que fica ligado à membrana e um anticorpo específico para o antígeno pesquisado. Para detectar o anticorpo, utiliza-se um antígeno específico ligado à membrana e um anticorpo anti-imunoglobulina marcado. Com esse método, se obtêm resultados qualitativos e de simples interpretação, pois basta comparar a olho nu os controles positivos e negativo. Além disso, é um método rápido e barato (CAVALCANTI *et al.*, 2008) (MÜHLHAUSER; RIVAS, 2014). A imunofluorescência que consiste em duas modalidades, a técnica de anticorpo fluorescente direto (DFA) e a técnica do anticorpo fluorescente indireto (IFA) (MÜHLHAUSER; RIVAS, 2014) e ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*), que se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Um anticorpo específico para o antígeno pesquisado é fixado em uma fase sólida. O antígeno presente na amostra se liga ao anticorpo específico. Posteriormente, um segundo anticorpo específico é adicionado ao antígeno, ligado a uma enzima. Após um período de incubação e lavagem, o complexo anticorpo-antígeno-anticorpo é detectado pela adição do substrato da enzima ligada ao segundo anticorpo. A enzima atua no substrato, produzindo cores, que podem ser lidas através de um espectrofotômetro (CAVALCANTI *et al.*, 2008; MÜHLHAUSER; RIVAS, 2014).

Diversas doenças infecciosas são diagnosticadas pelos métodos imunológicos, principalmente por ELISA, pois sua simplicidade permite a análise de um grande número de micro-organismos, mesmo com um volume menor de amostras. A principal desvantagem das técnicas de imunoenaios é a baixa especificidade. Além disso, apesar dos avanços ligados à automatização dos imunoenaios, a intervenção humana ainda se faz necessária em diversas etapas do processo (CAVALCANTI *et al.*, 2008) (BENDER e MÜHLEN, 2008).

MALDI TOF

A aplicação da espectrometria de massa na análise de biomoléculas para o diagnóstico microbiológico teve um aumento expressivo

por volta dos anos 70 e 80 (MINGORANCE *et al.*, 2016) e, durante décadas, a técnica de MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry*) foi utilizada na análise de diferentes biomoléculas e sua aplicação no diagnóstico microbiológico aparenta ser promissora (MIMICA *et al.*, 2013).

Essa técnica foi utilizada pela Química durante décadas, e apenas em 1975 que Anhalt e Fenselau propuseram que essa técnica fosse utilizada para a identificação bacteriana (CROXATTO *et al.*, 2011).

Nas primeiras experiências, apenas moléculas de baixas massas moleculares - como os lipídeos - foram analisadas. Somente depois da evolução da ionização, por volta do final da década de 80, que foi possível a análise de biomoléculas maiores, como as proteínas (CROXATTO *et al.*, 2011).

A tecnologia MALDI-TOF permite a identificação de micro-organismos por meio da análise de proteínas, principalmente ribossômicas, através da criação de um espectro de massa específico para cada espécie (LEGARRADA *et al.*, 2013).

Os três principais elementos que formam um espectrômetro de massa são: uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector, que são mantidos em uma atmosfera de vácuo. Sua função é produzir, separar e detectar íons em fase de gás (RUIZ *et al.*, 2012). Essa técnica consiste em um sistema no qual o material biológico é inserido em uma placa na qual se encontra a matriz polimérica. Esse material é irradiado com um laser que vaporiza a amostra e leva à ionização de várias moléculas. Essas moléculas são aspiradas em um tubo de vácuo e levadas a um detector. O tempo de chegada ao detector é diferente para cada molécula, gerando um gráfico específico para cada espécie de bactéria ou fungo (PASTERNAK, 2012), o que gera assinaturas de impressões digitais das proteínas de toda a célula microbiana, que quando comparada a um banco de dados, pode ser rapidamente identificada (BIZZINI *et al.*, 2010).

A capacidade de identificar micro-organismos rapidamente favorece a aplicação da MALDI-TOF em diversas áreas, como: diagnóstico médico, monitoramento ambiental e controle de qualidade dos alimentos. Além disso, por ser uma técnica de identificação rápida, de alto rendimento e de baixo custo, é uma ótima alternativa para laboratórios convencionais (CROXATTO *et al.*, 2011).

Tendo em vista que MALDI-TOF é uma das técnicas mais revolucionárias atualmente para o diagnóstico microbiológico, podemos citar como principal benefício a agilidade na obtenção dos resultados, que pode ocorrer em menos de trinta minutos (JUNIOR *et al.*, 2014).

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

O baixo custo, a possibilidade de se utilizar pouco material biológico, sua aplicação em larga escala e a detecção de resistência bacteriana por MALDI-TOF são outras vantagens importantes, pois a escolha terapêutica correta impacta diretamente nas taxas de mortalidade causadas por infecções (ASSIS *et al.*, 2011; JUNIOR *et al.*, 2014).

Além dos itens mencionados, há ainda a vantagem de o espectrômetro necessitar apenas de instalação elétrica e atender as exigências ambientais, pois não gera nenhum tipo de resíduo (ASSIS *et al.*, 2011).

Apesar dos inúmeros benefícios da técnica MALDI TOF, algumas limitações foram identificadas. A principal delas é o fato de que a análise depender de um banco de dados que está disponível apenas comercialmente, e esses bancos de dados necessitam de novas versões que incluam as espécies que ainda não estão representadas. Além disso, algumas espécies de bactérias podem apresentar perfis de espectrometria de massa idênticos, devido à sua similaridade genética, ou seja, essas espécies não são diferenciadas pela MALDI TOF (ASSIS *et al.*, 2011; JUNIOR *et al.*, 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico microbiológico é extremamente importante por permitir identificar os micro-organismos causadores de infecções e apontar o correto tratamento antibiótico, evitando a seleção de micro-organismos resistentes e reduzindo os índices de morbidade e mortalidade, especialmente relacionados a cepas multirresistentes.

Nos últimos anos, devido ao avanço da tecnologia, os laboratórios de diagnóstico microbiológico evoluíram consideravelmente, implementando técnicas como espectrometria de massa nas análises, beneficiando pacientes, médicos e também os analistas clínicos, afinal, tanto os procedimentos quanto os resultados tornaram-se mais simples, rápidos e seguros, contribuindo diretamente para a melhoria da saúde pública, uma vez que houve redução do tempo de espera pelos resultados e do número de internações. Entretanto, muitos laboratórios ainda não implantaram técnicas mais avançadas de diagnóstico, principalmente devido ao alto custo dos equipamentos e à necessidade de profissionais bem treinados e constantes atualizações.

Assim, os avanços nas técnicas diagnósticas microbiológicas ainda são necessários com intuito de tornar estas tecnologias mais acessíveis de maneira que possam, cada vez mais, contribuir com a melhoria do cenário clínico e da saúde pública.

REFERÊNCIAS

- BD. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO - MEIOS EM PLACAS PRONTOS A USAR. 2011. Disponível em: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9114>.
- BELLIDO, J. L. M.; CASTAÑO, S. V.; FERREIRA, L.; JUANES, F. S.; BUITRAGO, J. M. G. Aplicaciones de la proteómica en el laboratorio de Microbiología Clínica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Madrid, v. 30, n. 7, p. 383-393, 2012.
- BENDER, A. L.; VON MUHLEN, C. A. Testes laboratoriais aplicados à Imunologia Clínica. **Imunologia Clínica na Prática Médica**. Cap. 5, p. 73 - 94, 2008.
- CAMARGO, C. F.; SILVA, P. R. Q. **Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular**. 2014. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLORENCIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>.
- CAVALCANTI, M. P.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Rev Patol Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2008.
- CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. **FEMS Microbiol Rev**, England, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2011.
- FAÚLA, L. L. **Fatores de virulência, sorotipos e susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de alimentos no Estado de Minas Gerais, Brasil**. 2016. Disponível em: //home/teste/Downloads/fatores_de_virulencia_sorotipos_e_susceptibilidade_antimicrobiana_de_.pdf
- GUAREZE, G. M.; BORDIGNON, J.C. Estudo comparativo entre hemocultura automatizada e manual em um laboratório do sudoeste do Paraná, Brasil. **RBAC**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p. 223-8, 2016.
- HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Rev Científica Med Vet**, Belo Horizonte, n. 26, Janeiro, 2016.
- HERVÉ, B. E. Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: autoatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. **Rev Med Clin Condes**, Santiago, v. 26, n. 6, p. 753-763, 2015.
- PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. **SALUSVITA**, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

LEDEBOER, N. A.; DALLAS, S. D. The Automated Clinical Microbiology Laboratory: Fact or Fantasy? *J Clin Microbiol*, Washington, v. 52, n.9, p. 3140-3146, 2014.

LEGARRADA, P; MORAGA, M.; LAM, M.; GEOFFROY, E.; ZUMARÁN, C.; GARCIA, P. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Rev Chilena Infectol*, Santiago, v. 30, n. 2, p. 140-146, 2013.

LIMA, J. F. C.; MONTENEGRO, L. M. L.; MONTENEGRO, R. A.; CABRAL, M. M. L.; LIMA, A. S.; ABATH, F. G. C.; SCHINDLER, H. C. Desempenho da técnica nested PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. *J Bras Pneumol*, Brasília, v. 35, n. 7, p. 690-697, 2009.

MIMICA, M. J.; MARTINO, M. D. V.; PASTERNAK, J. MALDI-TOF MS in the clinical microbiology laboratory. *J Bras Patol Med Lab*, Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 256-259, 2013.

MINASSIAN, A. M.; NEWNHAM, R.; KALIMERIS, E.; BEJON, E.; ATKINS, B. L.; BOWLER, C. J. W. Use of an automated blood culture system (BD BACTEC™) for diagnosis of prosthetic joint infections: easy and fast. *BMC Infect Dis*, London, v. 14, n. 4, p. 233, 2014.

MINGORANCE, J.; REGUEIRO, B.; MUÑOZ-BELLIDO, J. L. Perspectiva histórica de la espectrometría de masas en Microbiología. *Enfermedades Infecciosas Microbiol Clin*, Madrid, v. 32, n. 2, p. 3-7, 2016.

MÜHLHAUSER, M. P.; RIVAS, L. J. Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. *Rev Med Clin Condes*, Santiago, v. 25, n. 3, p. 569-579, 2009.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S. BACTERIOLOGIA. In: Etelcia Molinaro; Luzia Caputo; Regina Amendoeira (Org). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**, Rio de Janeiro, 2013, v. 4, p. 221-397.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Einstein*, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 118-119, 2012.

PEREIRA, R.E.P.; PETRECHEN, G. G. Principais métodos diagnósticos bacterianos. *Rev Científica Eletrônica Med Vet*, Garça, v.16, 2011.

PUMAROLA, T. Influencia de las nuevas tecnologías en la microbiología moderna. *Enfermedades Infecciosas Microbiol Clin*, Madrid, v. 28, n. 3, p. 59-62, 2010.

QUIROGA, C. Las tecnologías ómicas: situación actual y desafíos futuros. **Rev Argent Microbiol**, Buenos Aires, v. 48, n. 4, p. 265-266, 2016.

ROSSELLÓ, G. A. M.; PÉREZ, M. A. B. Antibiograma rápido en Microbiología Clínica Rapid antibiotic susceptibility test in Clinical Microbiology. **Enfermedades Infecciosas Microbiol Clin**, Madrid, v. 34, n.1, p. 61-68, 2016.

SAMRA, Z.; BAHAR, J.; MADAR-SHAPIRO, L.; AZIZ, N. N.; ISRAEL, S.; BISHARA, J. Evaluation of chromagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3110-3111, 2008.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

VALONES, M. A. A.; GUIMARÃES, R. L.; BRANDÃO, L. A. C.; SOUZA, P. R. E.; CARVALHO, A. A. T.; CROVELA, S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Braz J Microbiol**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2009.

VILA, J.; GÓMEZ, M. D.; SALAVERT, M.; BOSCH, J. Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas. **Enfermedades Infecciosas Microbiol Clin**, Madrid, v. 35, n. 1, p. 41-46, 2017.

WILLIAMS-BOUYER, N.; YORKE, R.; LEE, H. I.; WOODS, G. L. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 38, n. 11, p. 4167-4170, 2000.

XIMENES, L. A. **Avaliação técnica e financeira entre o chromagar e os meios usuais de análises Microbiológica**, 2009. Disponível em: http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/microbiologia/artigoximenes.pdf.

PERANTONI, Larissa Morbi e QUEIROZ-FERNANDES, Geisiany Maria de. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. **SALUSVITA**, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.