

GUIA COMPLETO

Identificação de Micro-organismos

Comparação de Metodologias

Índice

Introdução.....	03
Métodos Bioquímicos.....	05
Métodos Automatizados.....	07
Espectrometria de Massa.....	09
Sequenciamento de DNA.....	11
DMD.....	14
Comparação de Metodologias.....	16
Referências.....	23
Sobre a Autora.....	24
Outros Materiais.....	25
Sobre a Neoprospecta.....	26



The background of the slide features a large, semi-transparent image of a petri dish containing various bacterial colonies on the left, and a gloved hand holding a pipette tip on the right. The overall color scheme is a gradient of teal and blue.

1 Introdução

A detecção e a identificação microbiológica são essenciais para a adoção e manutenção de medidas preventivas e corretivas relacionadas aos procedimentos operacionais

Introdução

O monitoramento ambiental e o controle microbiológico em áreas críticas no processo de produção de produtos, é uma garantia de qualidade das indústrias, principalmente das que dependem de ambientes controlados, como a indústria de alimentos, ou medicamentos.

Além disso, o monitoramento ambiental é uma importante ferramenta para a avaliação da eficácia de medidas de controle de contaminação e para a identificação de ameaças específicas para a qualidade e a segurança dos produtos fabricados.

A detecção e a identificação microbiológica são essenciais para a adoção e manutenção de medidas preventivas e corretivas relacionadas aos procedimentos operacionais, validação dos processos de limpeza e sanitização das instalações e treinamento de pessoal [1,2].

Atualmente, o monitoramento de micro-organismos se dá através de quatro técnicas: amostragem volumétrica de ar, placas de sedimentação, placas de contato ou *swabs*, e amostras para avaliação de contaminantes presentes na superfície das luvas de operadores.

A identificação bacteriana, em sua maioria, é feita por meio de testes fenotípicos como: fermentação de açúcares, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos [2]. Esses meios de cultura possuem um indicador de pH e a interpretação dos resultados é dada através da mudança de coloração nos meios, pelo consumo ou não dos substratos presentes.

Com exceção da técnica de amostragem volumétrica do ar, todas as outras são dependentes da cultura em meio não seletivo para a avaliação do crescimento microbiológico e posterior identificação. O período de incubação do meio de cultura pode variar de um a sete dias [1].

The background of the slide features a large, semi-transparent image of a petri dish containing various bacterial colonies on the left side. On the right side, a gloved hand is visible, holding a small, circular object, possibly a test strip or a small petri dish. The overall color scheme is a gradient of dark blue and teal.

2 Métodos Bioquímicos

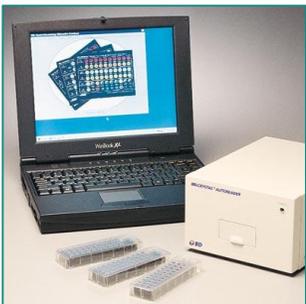
Para a utilização desses kits na identificação bacteriana é necessário conhecer o grupo de bactéria em que a amostra pertence.



1. Cultura bacteriana.



2. Preparação da suspensão bacteriana e inoculação.



3. Interpretação dos resultados.

Métodos Bioquímicos

Estão disponíveis no mercado alguns kits como: RapID™ ONE System (Oxoid-Thermo Fisher, Cambridge, UK), BD BBL Crystal™ Identification System (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) e API®/ID32 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) que possuem uma série de provas bioquímicas compiladas em um único painel de identificação padronizados para cada grupo de bactérias.

Portanto, para a utilização desses kits na identificação bacteriana **é necessário conhecer o grupo de bactéria em que a amostra pertence**, seja por um meio seletivo ou pela coloração de Gram. Para a inoculação das amostras nesses kits é necessário fazer uma suspensão bacteriana e distribuí-la de maneira homogênea por todo o painel.



API®/ID32 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) – 600 espécies identificáveis

Período de Incubação

O período de incubação varia entre 4 a 72 horas dependendo do grupo de bactérias e do fabricante do kit. Também, o número de espécies bacterianas identificadas vai variar de acordo com o kit (veja figura abaixo).

A interpretação dos resultados pode ser feita visualmente, com exceção do BBL Crystal™ que permite a leitura automatizada (BD BBL™ Crystal™ AutoReader).

Interpretação

Para todos os sistemas de identificação, a interpretação dos resultados das provas bioquímicas gera um algoritmo, que varia de 7 a 10 dígitos, que plotando no software do kit resulta na identificação da espécie bacteriana com um valor de confiança dado em porcentagem (veja exemplo no esquema acima) [3-5].



3. Método Automatizado

O método surgiu com o intuito de aperfeiçoar a identificação e diminuir a interferência e dependência do operador;

Introdução

O método automatizado de identificação de micro-organismos surgiu com o intuito de aperfeiçoar a identificação e diminuir a interferência e dependência do operador. O aparelho mais conhecido é o VITEK® Systems (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Essa metodologia faz a identificação microbiológica através de 64 provas colorimétricas dispostas em um cartão.

É um método dependente da cultura bacteriana, cada cartão abrange um grupo de bactérias diferentes, portanto crescimento em ágar seletivo ou coloração de Gram são necessários para a escolha do cartão de identificação corretos. A leitura das provas é feita a cada 15 minutos com três comprimentos de ondas diferentes.

Período de Identificação

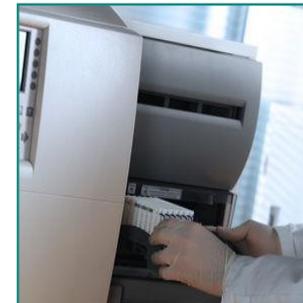
O período de identificação pode variar de 2 a 18 horas dependendo do grupo de bactérias que está se identificando. Mais de 330 espécies bacterianas podem ser identificadas, devido à base de dados contida no aparelho e às provas colorimétricas. Todos os estágios de identificação de leitura e reporte de resultados é automatizado, o que otimiza o workflow.

Passo-a-passo

O sistema é operado com códigos de barras, o que aumenta a rastreabilidade das amostras. Essa metodologia também dispõe de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e testes fenotípicos de mecanismos de resistência (veja no esquema abaixo) [8].



1. Cultura bacteriana.



2. Preparação da suspensão bacteriana e inoculação.



3. Interpretação dos resultados.



4 Espectrometria de massa

Esse método detecta e identifica proteínas pela determinação seu peso molecular individual e fragmentos específicos.



1. Cultura bacteriana.

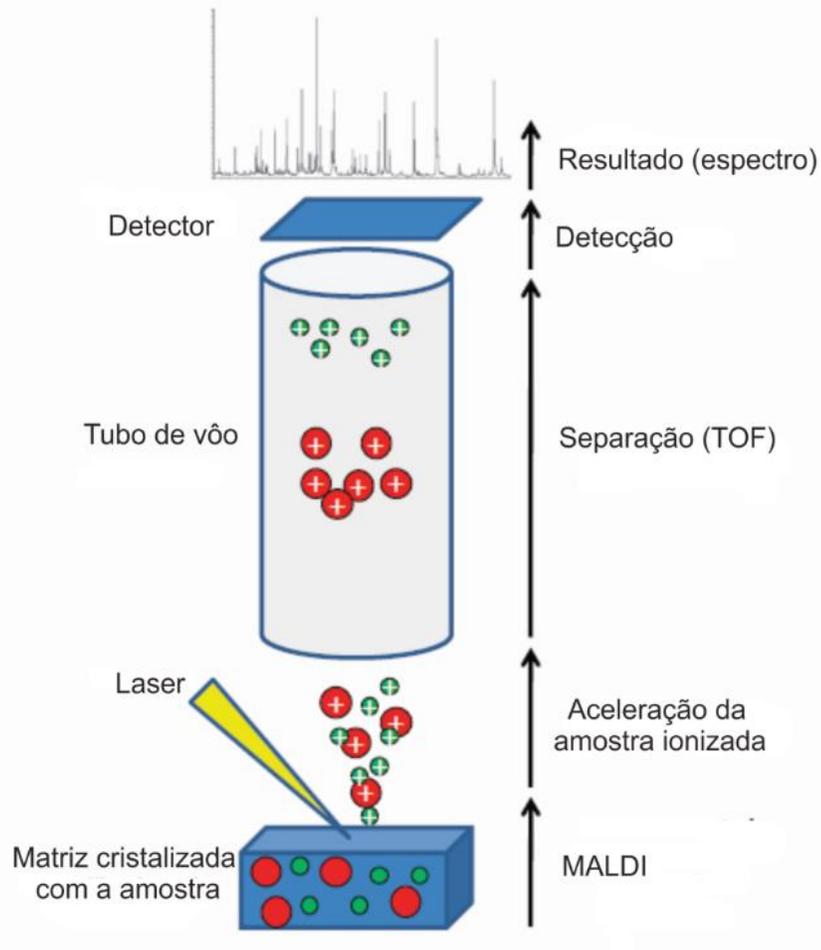


2. Preparação da amostra.



3. Inoculação da amostra.

Esquema ilustrativo do fluxo de trabalho utilizando a tecnologia MALDI-TOF.



Tecnologia MALDI-TOF.

MALDI-TOF MS

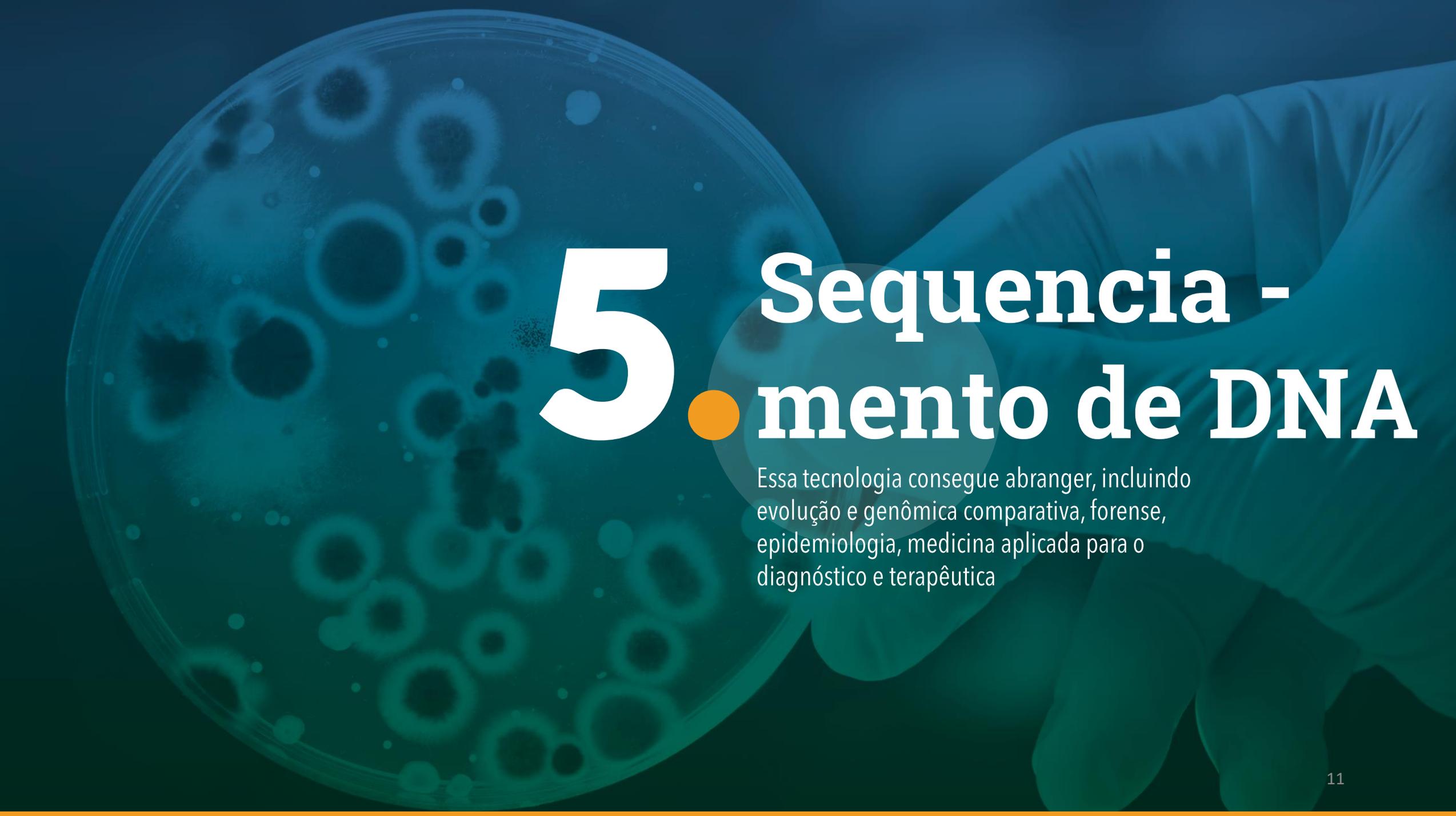
Mais recentemente, a tecnologia MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) atraiu rapidamente os microbiologistas pelo seu poderoso recurso de identificação microbiológica rápida [10].

Esse método detecta e identifica proteínas pela determinação seu peso molecular individual e fragmentos específicos [11].

Para a identificação de micro-organismos na indústria, essa é ainda uma técnica dependente de cultura, porém para o laboratório clínico já é possível fazer a identificação bacteriana a partir de amostras clínicas [12, 13].

Metodologia

A primeira fase dessa metodologia é a preparação da suspensão bacteriana, que então é colocada em uma placa junto com a matriz polimérica, onde um laser é irradiado e ocorre a ionização de várias moléculas. Essas moléculas são aspiradas por um tubo e ocorre a detecção de cada molécula através do tempo de chegada ao detector (time of flight). Isso gera um gráfico que é específico para cada espécie bacteriana e uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado [10].



5 Sequencia - mento de DNA

Essa tecnologia consegue abranger, incluindo evolução e genômica comparativa, forense, epidemiologia, medicina aplicada para o diagnóstico e terapêutica

Introdução

Atualmente, a necessidade de sequenciamento tem se tornado cada vez maior, haja vista a variedade de aplicações que essa tecnologia consegue abranger, incluindo evolução e genômica comparativa, forense, epidemiologia, medicina aplicada para o diagnóstico e terapêutica [15].

Sanger

O método de Sanger é o procedimento tradicional de sequenciamento de DNA, criado em 1977 [16]. É um processo que envolve a síntese de um molde de DNA de um gene de interesse, por reação de PCR.

Metodologia

No caso da identificação bacteriana, o gene mais utilizado é o 16S rDNA, que está intimamente relacionado com a classificação filogenética de procariontes [17]. Essa metodologia utiliza deoxinucleotídeos naturais (dNTPs) e dideoxinucleotídeos (ddNTPs) de terminação de síntese, que se diferem dos nucleotídeos normais por conterem um hidrogênio no carbono 3', ao invés de um grupo hidroxila (OH).

Esses nucleotídeos quando integrados em uma sequência, evitam a incorporação de outros nucleotídeos nesta sequência. Na metodologia de Sanger original, os ddNTPs eram marcados com fósforo radioativo e a sequência sintetizada era lida manualmente, quando as bases identificadas eram colocadas em um filme de raio X [16].

O método de Sanger automatizado utiliza sequenciadores com eletroforese vertical em placa ou eletroforese em capilar, onde os ddNTPs são marcados com substância fluorescentes (veja esquema abaixo) [15].



1. Isolamento de colônias

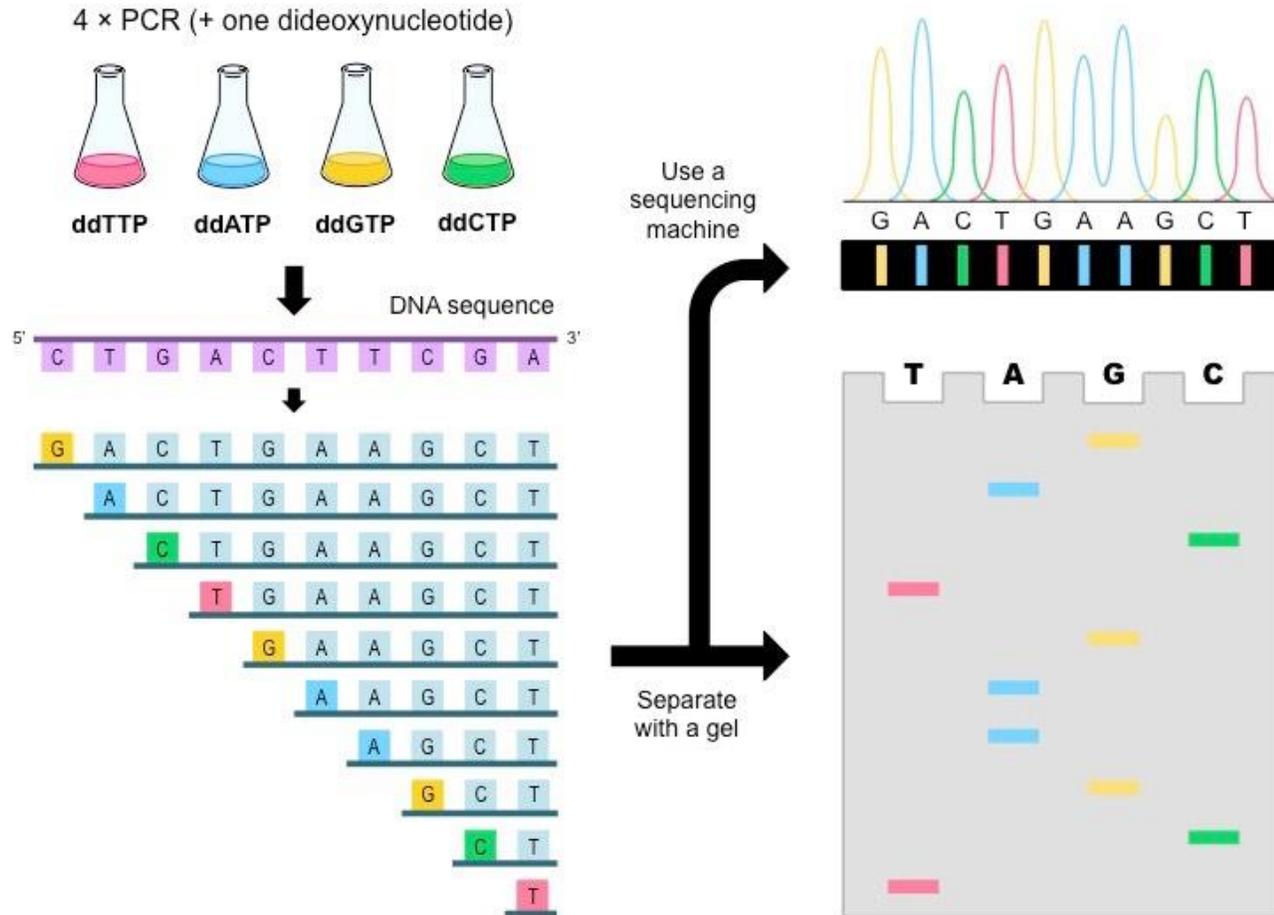


2. Extração de DNA e isolamento do marcador



3. Amplificação do material genético e sequenciamento de DNA por Sanger

Esquema ilustrativo do fluxo de trabalho do sequenciamento Sanger



Metodologia

No caso da identificação bacteriana, o gene mais utilizado é o 16S rDNA, que está intimamente relacionado com a classificação filogenética de procaríotos [17]. Essa metodologia utiliza deoxinucleotídeos naturais (dNTPs) e dideoxynucleotídeos (ddNTPs) de terminação de síntese, que se diferem dos nucleotídeos normais por conterem um hidrogênio no carbono 3', ao invés de um grupo hidroxila (OH).

Esses nucleotídeos quando integrados em uma sequência, evitam a incorporação de outros nucleotídeos nesta sequência. Na metodologia de Sanger original, os ddNTPs eram marcados com fósforo radioativo e a sequência sintetizada era lida manualmente, quando as bases identificadas eram colocadas em um filme de raio X [16].

O método de Sanger automatizado utiliza sequenciadores com eletroforese vertical em placa ou eletroforese em capilar, onde os ddNTPs são marcados com substância fluorescentes (veja esquema abaixo) [15].

Sequenciamento de Nova Geração

Em 2005, surgiu no mercado a tecnologia de sequenciamento de nova geração. Essa tecnologia engloba um número amplo de métodos quanto à preparação do DNA molde, sequenciamento, imagem e análise de dados.

A combinação de protocolos específicos distingue uma tecnologia da outra e determina o tipo de dado produzido de cada plataforma.

A imobilização do DNA em suportes sólidos, separados espacialmente permite que milhares de bilhões de reações de sequenciamento sejam realizadas ao mesmo tempo (observe o esquema acima) [18].

Essas plataformas conseguem gerar informações maiores que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo.

Essa maior eficiência advém do uso da clonagem in vitro e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento [19].

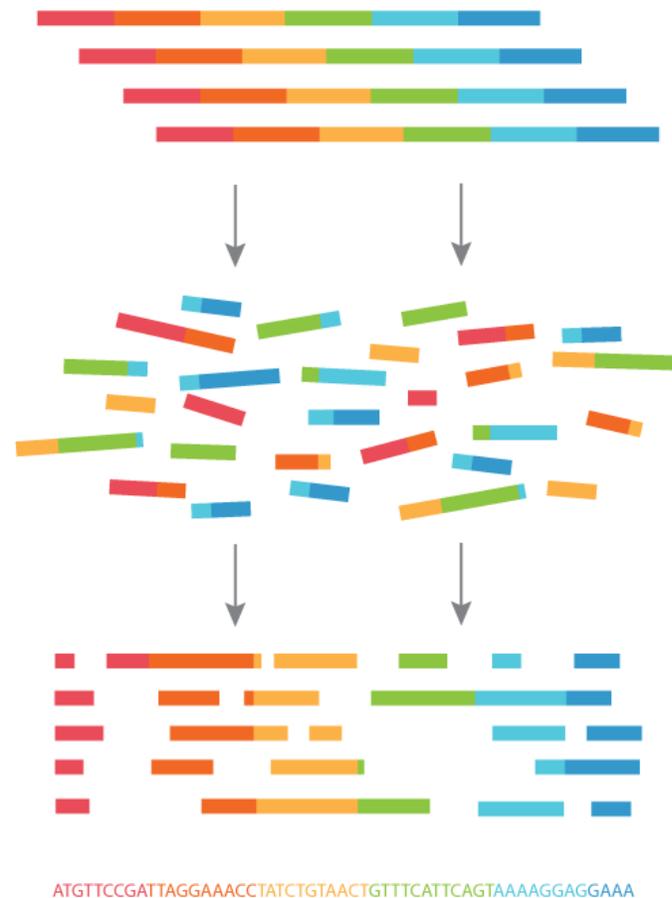


Ilustração explicativa da metodologia de sequenciamento.

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS



1. Isolamento de colônias



2. Extração de DNA e isolamento do marcador



3. Amplificação do material genético e sequenciamento de DNA por NGS

Procedimento para identificação de micro-organismos por sequenciamento de DNA por NGS (Next Generation Sequencing).

A large petri dish filled with various bacterial colonies is shown on the left side of the image. On the right side, a hand wearing a blue nitrile glove is visible, holding a small, clear, circular object, possibly a microfluidic chip or a small petri dish. The background is a dark blue gradient.

6

DMD

Diagnóstico Microbiológico Digital – Metodologia desenvolvida pela Neoprospecta Microbiome Technologies.

1. Coleta da amostra com swab



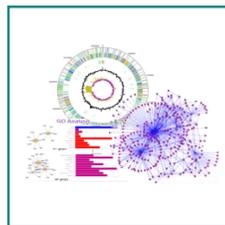
2. Extração de DNA e isolamento do marcador



3. Sequenciamento do DNA por NGS



4. Análise de Bioinformática



Diagnóstico Microbiológico Digital

É uma metodologia desenvolvida pela [Neopropecta Microbiome Technologies](#) que é independente da cultura bacteriana e a coleta das amostras é feita com o auxílio de swab seco. A partir da coleta, as amostras são enviadas aos laboratórios da empresa onde é feita a extração do DNA diretamente do swab.

O marcador molecular utilizado para a identificação de bactérias é o gene 16S rDNA, enquanto o gene ITS (Internal Transcribed Spacer) é utilizado para a identificação de fungos, os quais estão intimamente ligados a filogenia bacteriana e fúngica. Estes marcadores moleculares permitem identificar bactérias e fungos no nível de espécie com bastante acurácia e sensibilidade [20].

Protocolos

Um conjunto de protocolos moleculares são auxiliares ao sequenciamento em larga escala de centenas de amostras em paralelo, utilizando a plataforma MiSeq Sequencing System (Illumina, Inc).

Ferramentas biocomputacionais, desenvolvidas pela empresa, permitem a identificação e o rastreamento de centenas a milhares de micro-organismos em uma única amostra.

Visualização dos Resultados

Os resultados de toda a análise são dados por meio do software Neobiome, também desenvolvido pela empresa, onde é possível observar o panorama detalhado dos micro-organismos encontrados na análise.

O tempo de processamento, desde a extração de DNA até a emissão dos resultados leva em torno de cinco dias (observe o esquema abaixo).



A petri dish containing various bacterial colonies is shown on the left side of the slide. On the right side, a hand wearing a blue nitrile glove is visible, holding a pipette. The background is a dark teal color with a subtle pattern of light blue circles.

7 Comparação

Comparação entre as metodologias citadas anteriormente. Você encontrará as características, vantagens e desvantagens.

Introdução

As metodologias convencionais utilizadas na identificação de bactérias são dependentes da cultura. E apesar da cultura ser um método bastante importante na recuperação de micro-organismos, dependendo do patógeno, a positividade da mesma pode demorar de poucas horas a semanas, e os testes fenotípicos podem demorar mais 24 a 48 horas [21], levando um tempo demasiadamente grande para o diagnóstico microbiológico. Portanto, quando há urgência na detecção dos micro-organismos presentes em determinado processo, as metodologias dependentes de cultura podem não ser a melhor alternativa.

O problema

O problema de dependência da cultura se agrava quando há necessidade de recuperação e isolamento de um micro-organismo mais exigente nutricionalmente ou quando se pretende recuperar micro-organismos presentes no ambiente.

Relatos

ITÁLIA

Um exemplo claro disso ocorreu na Itália, em 2014, quando um paciente adquiriu uma infecção por *Legionella pneumophila*, um bacilo Gram negativo não fermentador fastidioso, em que o diagnóstico da infecção foi feito por MALDI-TOF, porém a investigação sobre o reservatório da infecção, que foi feita colhendo várias amostras do ambiente hospitalar, submetidas à cultura, não houve o crescimento da bactéria, portanto, não se descobriu a fonte da infecção [22].

BRASIL

Um segundo relato ocorreu no Brasil, na investigação de um surto de infecções de corrente sanguínea causadas por *Burkholderia cepacia complex*, um bacilo Gram negativo não fermentador fastidioso. Na investigação de amostras hospitalares ambientais que foram submetidas à cultura, em nenhuma foi observado o crescimento. Porém, as amostras ambientais onde o diagnóstico por sequenciamento genético foi realizado, *B.cepacia complex* foi encontrada no refrigerador, na geladeira da farmácia e em pacotes de gelo reutilizáveis [23].

Sobre a Sensibilidade

Esses exemplos provam que a cultura de amostras ambientais não é a metodologia mais sensível, principalmente porque dependem de vários fatores como: micro-organismos viáveis para formar uma colônia, transporte adequado dessas amostras, incubação sob condições que favoreçam o crescimento dos micro-organismos e isso pode variar de espécie para espécie. Neste sentido, o diagnóstico por sequenciamento genético torna-se uma boa alternativa.

Um estudo revelou que os kits de identificação de enterobactérias e bacilos não fermentadores disponíveis no mercado conseguem identificar apenas cerca de 90% dos isolados e ainda, podem ocorrer discrepâncias entre os kits em algumas provas bioquímicas [24]. Quando se trata de bactérias anaeróbias a porcentagem de identificação é ainda menor, cerca de 80% [25]. Esses índices podem ocorrer devido às limitações do teste. Por serem testes colorimétricos, se o meio de cultura utilizado para o isolamento do micro-organismo for colorido, isso pode interferir na coloração do inóculo e conseqüentemente, na coloração dos testes.

Além disso, a preparação da suspensão bacteriana em uma densidade adequada, a sua distribuição homogênea por todo o painel são etapas críticas para a correta identificação dos micro-organismos, além de um operador bem treinado. Ainda, deve-se levar em conta alguns achados incomuns como: reações de interpretação ambígua, variação fenotípica de uma mesma espécie, características bioquímicas atípicas, lenta taxa de crescimento bacteriano, que podem ocasionar identificação errônea pelo curto espaço de tempo de incubação utilizado nestes painéis [3, 26].

MALDI-TOF vs VITEK® Systems

Em estudo comparativo entre os sistemas MALDI-TOF e VITEK® Systems (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) mostrou que a taxa de concordância na identificação do isolados entre os dois métodos foi de 92.6%. No nível de gênero, o MALDI-TOF não fez nenhum erro de identificação contra 0.6% do sistema VITEK® e no nível de espécie a taxa de erro na identificação foi de 5.56% e 6.24% para MALDI-TOF e VITEK®, respectivamente [27].

O sistema VITEK® utiliza ainda a metodologia convencional de identificação fenotípica de bactérias, portanto a interpretação equivocada das provas bioquímicas ou resultados inconclusivos sobre essas provas podem interferir nos resultados. Ainda, o período de incubação é relativamente baixo, cerca de 6 horas, podendo gerar resultados falso-negativos em provas que necessitam de um período mais longo de incubação.

Outra questão bastante relevante entre as duas metodologias é o alto valor dos consumíveis do sistema (cartões de identificação), que chegam a ser mais caros que os consumíveis do sistema MALDI-TOF [28].

Na tabela 1 é possível observar um resumo das vantagens e desvantagens das metodologias convencionais de microbiologia.

É importante ressaltar que em todos os estudo comparativos de metodologias de identificação de micro-organismos, seja fenotípica ou por espectrometria de massa, a análise do sequenciamento do gene 16S rDNA foi utilizado como contraprova na classificação e identificação bacteriana [24, 25, 27, 28], comprovando ser uma metodologia confiável e acurada na identificação de micro-organismos.

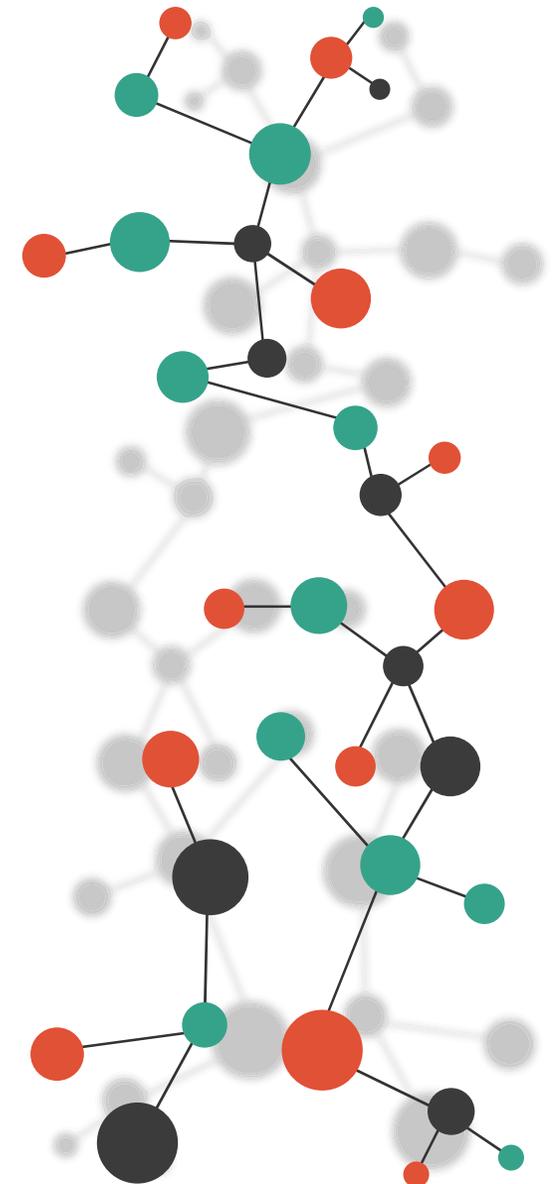


1. VITEK® Systems

X



2. MALDI-TOF.



MALDI-TOF vs VITEK® Systems

A tecnologia de MALDI-TOF se mostra bastante promissora na área, com vários estudos de identificação de fungos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Mucorales* e dermatófitos [30-33], porém a grande limitação dessa técnica é banco de dados [29, 34].

Nesses estudos os bancos de dados foram feitos pelos próprios pesquisadores. O diagnóstico por sequenciamento genético seria uma alternativa para suprir a escassez de metodologias na identificação fúngica. A técnica mostrou-se eficaz na caracterização da diversidade de fungos em amostras ambientais em que são encontradas muitas espécies que nem sempre crescem nas culturas laboratoriais [35].

Estudos de diversidade fúngica são baseados na região ITS (Internal Transcribed Spacer) do ribossomo nuclear, que é uma pequena região que ocorre em múltiplas cópias no genoma nuclear dos fungos e mostrou um alto grau de variação mesmo entre espécies intimamente relacionadas [36, 37]. Recentemente, essa região foi designada como o marcador molecular universal para a identificação de fungos [38].

Tabela 1 - Comparação

Metodologia	RapID™ ONE System, BBL Crystal™ e API®/ID32	VITEK® Systems	MALDI-TOF	Sequenciamento de DNA NGS, Diagnóstico Microbiológico Digital
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Diminuição do tempo de preparação; ✓ Maior rapidez nos resultados; ✓ Redução do uso de materiais. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Automatizado; ✓ Configuração simples; ✓ Fácil manuseio; ✓ Mínimo de reagentes requeridos; ✓ Rastreabilidade da amostra; ✓ Redução do manuseio do operador; ✓ Interface intuitiva. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Integração dos resultados para otimização do workflow; ✓ Rastreabilidade completa; ✓ Resultados rápidos; ✓ Menor tempo de manipulação; ✓ Capacidade para grandes volumes de trabalho (192 amostras/corrida). 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Identificação robusta e específica; ✓ Permite identificar fungos, protozoários e algas; ✓ Alta sensibilidade e precisão; ✓ Precisa de uma quantidade mínima de DNA para possibilitar a identificação; ✓ Permite identificar várias bactérias em uma única amostra.
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dependente de cultura; ✓ Laborioso; ✓ Depende bastante do operador; ✓ A interpretação dos resultados pode ser subjetiva. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dependente de cultura; ✓ Alto custo dos consumíveis; ✓ Resultados falso-positivos; ✓ Resultados falso-negativos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dependente de cultura; ✓ Alto custo do aparelho; ✓ Banco de dados são proprietários; ✓ Não existe banco de dados próprio disponível para fungos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Difícil implementação em laboratórios de microbiologia; ✓ Alto custo dos consumíveis.



Considerações finais

Todas as metodologias convencionais da microbiologia utilizadas na identificação bacteriana possuem um fator limitante que é a cultura. Além disso, os métodos que utilizam testes fenotípicos para identificação microbiana, além de demandar mais tempo para chegar a um resultado, muitas vezes estes não são satisfatórios, devido ao número limitado de provas ou de resultados falso-negativos. O sistema MALDI-TOF mostrou ser um importante avanço na microbiologia, porém a aquisição do aparelho se justifica apenas se o laboratório apresentar uma grande demanda na rotina de identificação microbiológica, devido ao seu alto custo.

Neste panorama, o Sequenciamento de DNA torna-se uma importante ferramenta na identificação e rastreamento de micro-organismos, especialmente em áreas estéreis, onde a presença de micro-organismos não é permitida, principalmente por não depender de culturas e por ter alta escalabilidade.

Referências

1. Anvisa. Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013.
2. Couto M. Monitoramento e controle microbiológico. Revista Sbccc 2010; 55: 10-4.
3. BD BD. BBL™ Crystal™ Identification Systems. 2015 [cited 26 de setembro de 2015]; Available from: <http://www.bd.com/ds/productCenter/IS-Crystal.asp>
4. bioMérieux. API®/ID32: Standardized manual identification method. 2015 [cited 26 de setembro de 2015]; Available from: <http://www.biomerieux-industry.com/food/api-id32-microbial-identification>
5. Scientific TF. RapID™ ONE System. 2015 [cited 26 setembro de 2015]; Available from: <http://www.thermoscientific.com/en/product/rapid-one-system.html>
6. Dickinson B. BD BBL™ Crystal™ - Sistema de Identificação de micro-organismos Clinicamente Relevantes. 2015 [cited 17 de outubro de 2015]; Available from:
7. Freitas P, Cabral Y, Veras A. Microbiologia Didática: Aspectos culturais. 2012 [cited 17 de outubro de 2015]; Available from: <https://microdidatica.wordpress.com/microbiologia-geral/aspectos-culturais/>
8. bioMérieux. VITEK® 2 Compact: Fully automated microbial identification system. 2015 [cited 26 de setembro de 2015]; Available from: <http://www.biomerieux-industry.com/food/vitek-2-compact-microbial-identification?dest=view>
9. biomerieux. Identification and Microbial genotyping / Vitek®2 compact. 2015 [cited 17 de outubro de 2015]; Available from: <http://www.ecatalogue-biomerieux.com/us/pharma/fo/product.php?fam=IDENTIFICATION%20AND%20MICROBIAL%20GENOTYPING&cat=IDENTIFICATION%20AND%20MICROBIAL%20GENOTYPING&gamme=36>
10. Benagli C, Rossi V, Dolina M et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. PLoS One 2011; 6: e16424.
11. Lay JO, Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. Mass Spectrom Rev 2001; 20: 172-94.
12. Cattani ME, Posse T, Hermes RL, Kaufman SC. [Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry in a blood culture system. Comparison of two procedures]. Rev Argent Microbiol 2015.
13. Kim Y, Park KG, Lee K, Park YJ. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens From Urine Samples Using the Vitek MS System Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Ann Lab Med 2015; 35: 416-22.
14. Medical M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. 2013 [cited 17 de outubro de 2015]; Available from: <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communiquer/2013/01-maldi-tof-mass-spectrometry/>
15. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. Genome Res 2005; 15: 1767-76.
16. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74: 5463-7.
17. Farrell JJ, Hujer AM, Sampath R, Bonomo RA. Salvage microbiology: opportunities and challenges in the detection of bacterial pathogens following initiation of antimicrobial treatment. Expert Rev Mol Diagn 2015; 15: 349-60.
18. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet 2010; 11: 31-46.
19. Carvalho MCG, Silva DCG. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. Ciência Rural 2010; 40: 735-44.
20. Snel B, Bork P, Huynen MA. Genome phylogeny based on gene content. Nat Genet 1999; 21: 108-10.
21. Pasternak J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. Einstein 2012; 10: 118-9.
22. Durando P, Orsi A, Alicino C et al. A Fatal Case of Nosocomial Legionnaires' Disease: Implications From an Extensive Environmental Investigation and Isolation of the Bacterium From Blood Culture. Infect Control Hosp Epidemiol 2015: 1-3.
23. Schmitt C, Maciel ALP, Baraldi MM et al. Bloodstream infection outbreak caused by Burkholderia cepacia complex: the role of genetic sequencing in the investigation. Antimicrobial Resistance and Infection Control 2015; 4: P228.
24. Micklewright LJ, Sartory DP. Evaluation of the BBL Crystal Enteric/Nonfermenter kit for the identification of water-derived environmental Enterobacteriaceae. Lett Appl Microbiol 1995; 21: 160-3.
25. Blairon L, Maza ML, Wybo I et al. Vitek 2 ANC card versus BBL Crystal Anaerobe and RapID ANA II for identification of clinical anaerobic bacteria. Anaerobe 2010; 16: 355-61.
26. Paim TGS, Reiter KC, Oliveira CF, d'Azevedo PA. Desempenho da metodologia por MALDI-TOF MS na identificação de cocos gram-positivos isolados na cidade de Porto Alegre/RS, Brasil. J Infect Control 2013; 3: 112-6.
27. Guo L, Ye L, Zhao Q et al. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. J Thorac Dis 2014; 6: 534-8.
28. Deng J, Fu L, Wang R et al. Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. J Thorac Dis 2014; 6: 539-44.
29. Becker PT, de Bel A, Martiny D et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. Med Mycol 2014; 52: 826-34.
30. Chen HY, Chen YC. Characterization of intact Penicillium spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2005; 19: 3564-8.
31. De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C et al. Species identification of Aspergillus, Fusarium and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 475-84.
32. Del Chierico F, Masotti A, Onori M et al. MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. J Proteomics 2012; 75: 3314-30.
33. Iriart X, Lavergne RA, Fillaux J et al. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. J Clin Microbiol 2012; 50: 2107-10.
34. Ranque S, Normand AC, Cassagne C et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. Mycoses 2014; 57: 135-40.
35. Ferro M, Antonio EA, Souza W, Bacchi M, Jr. ITSscan: a web-based analysis tool for Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. BMC Res Notes 2014; 7: 857.
36. Liu YT, Chen RK, Lin SJ et al. Analysis of sequence diversity through internal transcribed spacers and simple sequence repeats to identify Dendrobium species. Genet Mol Res 2014; 13: 2709-17.
37. Rittenour WR, Ciaccio CE, Barnes CS et al. Internal transcribed spacer rRNA gene sequencing analysis of fungal diversity in Kansas City indoor environments. Environ Sci Process Impacts 2014; 16: 33-43.
38. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiol 2010; 10: 189.

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS

Sobre a autora

CAETANA PAES ZAMPARETTE

Possui graduação em farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina (2009) e graduação em Habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Federal de Santa Catarina (2011). Possui pós-graduação *latu sensu* em Farmácia Hospitalar e Clínica (2011) e mestrado em Farmácia com ênfase em microbiologia e resistência bacteriana (2014) Tem experiência na área de Farmácia e Análises Clínicas, com ênfase em Farmácia Hospitalar e Clínica e Microbiologia.

SABER MAIS

Outros materiais

Veja aqui alguns outros materiais que podem te interessar.
Caso fique com alguma dúvida não hesite em nos procurar!



E-BOOK

Métodos de Tipagem Microbiológica

BAIXAR



WHITEPAPER

Técnicas de rastreamento e identificação de bactérias multirresistentes

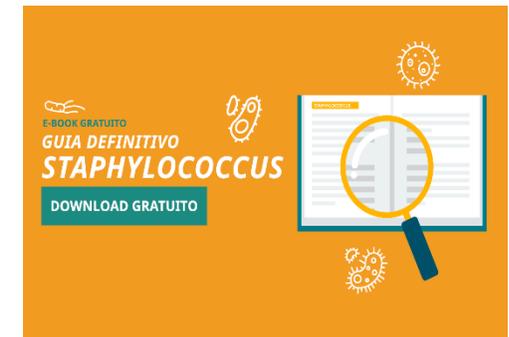
BAIXAR



INFOGRÁFICO

Plataforma Neobiome

BAIXAR



E-BOOK

Guia Definitivo de Staphylococcus - Tudo o que você precisar

BAIXAR





neoprospecta
microbiome technologies

A Neoprospecta é uma empresa dedicada ao desenvolvimento e comercialização de análises microbiológicas inovadoras, baseadas em sequenciamentos de DNA de nova geração, análises biocomputacionais e técnicas de PCR quantitativo.

institucional@neoprospecta.com

OUTROS MATERIAIS EDUCATIVOS

Nossas mídias sociais:

