

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E SUAS APLICAÇÕES NA
INDÚSTRIA FARMACÊUTICA - REVISÃO DE LITERATURA**

Saori Kiam de Paula

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador(a):

Profa. Dra. Marina Ishii

São Paulo

2021

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas	i
RESUMO.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	3
3.1. METODOLOGIA.....	3
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	4
4.1. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO.....	5
4.2. HISTÓRICO.....	6
4.3. MÉTODOS FENOTÍPICOS.....	7
4.3.1. KIT DE IDENTIFICAÇÃO EM MINIATURA.....	7
4.3.2. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	9
4.3.3. ELETROFORESE.....	10
4.3.4. ELISA (ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA).....	10
4.3.5. ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF).....	11
4.3.6. ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF).....	13

4.3.7. ESPECTROMETRIA RAMAN.....	14
4.4. MÉTODOS GENOTÍPICOS.....	15
5. CONCLUSÃO.....	17
6. BIBLIOGRAFIA.....	18
7. ANEXOS.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Eletroforese capilar
ECZ	Eletroforese capilar de zona
ECFI	Eletroforese capilar por focalização isoelétrica
EG	Eletroforese em gel
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
IVTF	Infravermelha por transformada de Fourier
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MS	Mass Spectrometry
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribossomal
PCR	Reação da cadeia polimerase
TSB	Tryptic Soy Broth
USP	The United States Pharmacopeia

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1: Tira de teste de identificação API 20E.....	8
Figura 2: Tira de teste de identificação BBL Enterotube II.....	8
Figura 3: suporte de teste de identificação Vitek 2 AST.....	9
Figura 4: Diagrama esquemático da espectrometria de massa MALDI-TOF.....	12

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1: Comparação das especificações gerais do BioTyper® e VITEK® MS Plus.....	13
Tabela 2: Comparação do banco de dados e tempo de detecção dos sistemas de identificação.....	16

DE PAULA, S. K. TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E SUAS APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA - REVISÃO DE LITERATURA.

2021. no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

RESUMO

Na indústria farmacêutica, a contaminação microbiana é um fator que gera muita preocupação, pois a presença de microrganismos, seja na área de produção, em seus insumos, ou no produto acabado, afetam a qualidade do produto final. Vários protocolos e procedimentos são elaborados e realizados pela Garantia e pelo Controle da Qualidade, com o objetivo de monitorar as possíveis contaminações. E ao longo dos anos, os métodos e as técnicas de identificação evoluíram com o intuito de trazer maior precisão e rapidez às identificações. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre as técnicas e os métodos de identificação bacteriana, e suas aplicabilidade, de modo a contribuir com o profissional farmacêutico na tomada de decisão e escolha do procedimento a ser adotado. Desde a coloração de Gram para a diferenciação das características da parede celular a técnicas mais avançadas como MALDI-TOF, o que se busca é a caracterização, a identificação dos microrganismos para a definição de ações para as etapas seguintes. De uma forma geral, a indústria é a responsável por definir o método de escolha de identificação bacteriana, estando relacionado ao seu custo-benefício, e à necessidade de pessoal constantemente treinado.

Palavras-chave: Contaminação, Caracterização microbiana; identificação microbiana; métodos de identificação

1. INTRODUÇÃO

Na indústria farmacêutica, a contaminação microbiana é um fator que gera muita preocupação, pois a presença de microrganismos, seja na área de produção, em seus insumos, ou no produto acabado, afetam a qualidade do produto final e vai em contramão às Boas Práticas de Fabricação (Utescher et al., 2007). A contaminação pode ser proveniente de diversas fontes como a água, as matérias-primas e as embalagens, mas também podem estar presentes na linha de produção, como em tubulações e tanques, em áreas como as salas limpas e até mesmo no produto acabado (alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos).

Vários protocolos e procedimentos são elaborados e realizados pela Garantia e pelo Controle da Qualidade, com o objetivo de monitorar as possíveis contaminações. O monitoramento ambiental é um exemplo de protocolo que compreende desde a amostragem do ar ambiental, do ar comprimido que circula na área crítica, das superfícies, dos equipamentos, recipientes, pisos, paredes e vestimentas dos funcionários até a avaliação da eficácia dos procedimentos de limpeza e desinfecção.

Há também a preocupação com a contagem de partículas não viáveis ou totais na área de injetáveis, pois o número de partículas presentes na sala limpa é proporcional à probabilidade da quantidade de microrganismos presentes no ar. No entanto, este parâmetro não fornece informações quanto ao conteúdo microbiológico do ambiente, mas possibilita que o controle seja feito em salas e zonas limpas, e por isso a importância do monitoramento ambiental (USP, 2012; Nemati et al., 2016; ANVISA, 2019;).

A identificação microbiana é importante pois permite classificar uma cepa isolada de acordo com sua família, gênero e espécie, e, desta forma, realizar investigações mais completas, determinando a sua origem, a natureza de eventos específicos de contaminação e conhecer a biocarga presente naquele processo. Dependendo do tipo de teste realizado e do nível de identificação exigido, a identificação permite definir não só o número, mas também os tipos de microrganismos presentes, para a tomada de medidas necessárias a fim de reduzir e prevenir contaminações, garantindo a segurança do paciente, a qualidade do produto

e o cumprimento dos requisitos regulatórios e legais (Easter, 2005; Brito, 2019; Challener, 2019).

A primeira identificação de uma bactéria ocorreu em 1674, quando o biólogo holandês Antonie van Leeuwenhoek (1628-1694) obteve a primeira evidência clara sobre a existência destes seres. O cientista possuía conhecimentos de óptica e por passatempo construiu vários microscópios, e fez várias observações. As bactérias vistas por ele foram registradas por desenhos e seus tamanhos determinados por comparação com grãos de areia ou eritrócitos. Quase 100 anos depois, o biólogo dinamarquês Otto Müller (1730-1784) ampliou os estudos de van Leeuwenhoek e organizou as bactérias em gênero e espécie de acordo com os métodos de classificação de Carolus Linnaeus, dando início a classificação taxonômica dos microrganismos. Hoje, sabe-se da grande diversidade de microrganismos existentes que são subdivididos em quatro grupos: vírus, bactérias, fungos e parasitas, muitos responsáveis por causar doenças em seres humanos (Drews, 2000; Murray et al., 2014).

Existem diversos métodos para realizar uma identificação microbiana. Podem ser feitas através de técnicas fenotípicas, onde se obtém dados sobre as características físicas do isolado, como a morfologia, o crescimento, reação às condições e substâncias químicas diferentes, requisitos metabólicos, análises de proteínas, etc., que indicam o gênero de um microrganismo e, em alguns casos, até a espécie. Por serem de fácil implementação e de baixo custo, estes métodos são mais utilizados, mas, a resposta pode variar de acordo com o meio e as condições de crescimento usados, e também podem apresentar problemas na repetibilidade por envolver a resposta do microrganismo aos reagentes químicos. Para tentar contornar essas limitações, foram desenvolvidos alguns sistemas automatizados, como a espectrometria no infravermelho ou de massa e a citometria de fluxo. (USP; 2012; Franco-Duarte et al., 2019).

Além destes, existem também os métodos de identificação genotípica, que envolvem a análise da composição genética e fornecem informações sobre gênero, espécie e, em alguns casos, até a linhagem do microrganismo. Ela é obtida por meio de hibridização ou sequenciamento, onde se observa partes específicas do DNA (ácido desoxirribonucleico) do microrganismo, como o 16S RNAr (ácido ribonucleico

ribossomal), presente em quase todas as bactérias. Estes testes não são afetados pelas condições de cultura ou meio e as indústrias estão caminhando para seu uso devido ao número crescente de espécies descritas a cada ano (Woo et al., 2008; Sandle, 2016; Challener, 2019).

A estratégia de identificação microbiana aplicada depende do nível de identificação que se quer alcançar e de quais dados serão utilizados, visto que é possível realizar a identificação de gênero/espécie e tipagem de linhagem bacteriana. Estes testes requerem certo conhecimento prévio devido a subjetividade de alguns deles. Em situações que ultrapassam o nível de alerta e ação ou são encontrados eventos de contaminação, por exemplo, a identificação do gênero/espécie é mais adequada. (Challener, 2019). Atualmente, não há exigência de método específico a ser utilizado para a identificação microbiana pelas agências reguladoras, então as empresas podem escolher a técnica e/ou metodologia que melhor atenda suas necessidades, desde que apresente o nível apropriado de identificação.

Mediante o exposto, este trabalho pretende apresentar os métodos de identificação microbiana, analisando suas vantagens e desvantagens de aplicação na indústria farmacêutica, contribuindo para o conhecimento e para auxiliar na escolha do procedimento a ser adotado pelo profissional.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre as técnicas e os métodos de identificação bacteriana, e suas aplicabilidade, de modo a contribuir com o profissional farmacêutico na tomada de decisão e escolha do procedimento a ser adotado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Metodologia

A revisão bibliográfica foi realizada em bases de dados como SciELO, Google Scholar e PubMed utilizando-se palavras-chave como “identificação de bactérias”,

“identificação microbiana”, “MALDI-TOF”, “espectrometria de massa”, “indústria farmacêutica” em português, inglês e espanhol. Foram considerados artigos científicos e de divulgação, publicados no período de 2000 a 2021, que apresentassem conformidade com o tema proposto. Foram excluídos os artigos e literatura que não estivessem relacionados ao tema deste trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o ambiente de produção farmacêutica, as principais fontes de contaminação microbiana devem ser severamente controladas para que ambientes e salas limpas funcionem de forma microbiologicamente controladas (Halls, 2004).

O ar é considerado o vetor mais frequente de contaminação e, mesmo não sendo um ambiente propício para o crescimento celular e a proliferação de microrganismos, sua contaminação está associada a presença de partículas inviáveis no ar, como poeira e fragmentos da pele, que são carreadores de microrganismos e que os protege da morte por dessecação. Por isso, é comum serem detectados microrganismos como *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.* e esporos fúngicos que são resistentes à dessecação (Halls, 2004). Além disso, os dutos de ventilação dentro da área de produção são interligados ou a própria sala limpa não possui vedação adequada, o que faz com que seja possível a contaminação de uma área pelo ar transportado de outro local.

A água é a principal matéria-prima na indústria farmacêutica, seja para ser aplicada como produto, para ser usada na geração de vapor de autoclaves e tanques fermentadores, como diluente de medicamentos ou como agente de limpeza entre outras aplicações (USP, 2012; ANVISA, 2019).

Todos os materiais que entram nas salas limpas são potenciais fontes de contaminação. A água, por exemplo, deve ser esterilizada por filtração e não deve apresentar bactérias Gram-negativas e coliformes fecais. Como é inviável monitorar cada fonte, pode-se monitorar materiais suspeitos na entrada de cada lote, não sendo necessário aos produtos químicos sintéticos. Por fim, as pessoas também são fontes significativas de contaminação, pois ao se movimentarem, falarem ou tossirem, por

exemplo, há grande movimentação de partículas e, conseqüentemente, de microrganismos. Por esta razão, funcionários que atuam em salas limpas são treinados para movimentar-se e atuar adequadamente nos ambientes controlados (Halls, 2004; Sandle et al., 2013).

Na farmacopeia americana existe a informação geral 1113 direcionado à identificação microbiana, onde são citadas algumas das técnicas mais utilizadas, mas esta atribui a escolha do método à empresa, com base em suas próprias necessidades. E sua necessidade também é citada no capítulo geral 61 (USP) “Testes de limite microbiano” onde recomenda-se que microrganismos que apresentem características celulares e morfológicas em meio seletivo e/ou na presença em meio ágar em que houve ausência de microrganismo específico devem ser identificados por outros meios de cultura adequados ou por testes bioquímicos. Muitas técnicas podem ser aplicadas em diversas situações na indústria farmacêutica, mas as técnicas rápidas de identificação são priorizadas por proporcionar uma melhor determinação do potencial fonte de contaminação em produtos, no ambiente ou em sistemas de água (Halls, 2004; Sutton e Cundell, 2004; Sandle, 2017).

4.1. Métodos de identificação

O objetivo da identificação microbiana é avaliar as características do microrganismo isolado e classificá-lo de acordo com sua família, gênero, espécie, o tipo (grupo de cepas dentro de uma espécie) e cepa. A correta identificação de microrganismos é essencial tanto para as áreas de pesquisa e industrial, quanto para a área clínica ou produção de alimentos (Sandle, 2017; Franco-Duarte et al., 2019).

O método tradicional para isolamento e identificação de microrganismos em produtos farmacêuticos e alimentícios é baseado no uso de meio de cultura, enumeração e isolamento da colônia para posterior análise de identificação. O produto pode ser homogeneizado, concentrado, diluído ou enriquecido antes da análise. Esta amostra é então misturada com meio ágar fundido e colocada em placas de Petri para incubação em temperatura e tempo adequados. Este meio pode ser *não seletivo* de modo a detectar e contar a quantidade de microrganismos na amostra, *seletivo*, quando um composto inibe ou induz o crescimento de um microrganismo

específico ou *diferencial* quando distingue as bactérias por reações químicas durante o crescimento por interação com algum composto (Halls, 2004; Hakorvita, 2008). O tempo necessário para a identificação, é estimado em 2 a 5 dias e uma estratégia para reduzir o tempo de análise é o uso de técnicas de biologia molecular (Franco-Duarte et al., 2019).

A escolha do método utilizado depende das plataformas tecnológicas disponíveis, a quantidade de amostra a ser identificado, o nível de identificação desejado e o custo do teste (Sandle, 2017).

4.2. Histórico

Na última década, o interesse pela melhoria dos métodos para a identificação de bactérias aumentou. Por muitos anos, a classificação fenotípica foi o único esquema de identificação, que embora tivesse custos relativamente baixos, resultavam em incertezas e dificuldades de análise.

O primeiro teste fenotípico de diferenciação realizado foi a coloração de Gram que distingue o microrganismo pela morfologia e a coloração, seguido pelos testes de catalase e oxidase. Depois, iniciaram-se os testes de avaliação do metabolismo de carboidratos, seguido da determinação da produção de ácido (pH) e de produtos finais como o CO₂, o acetato e o lactato. Em sequência, foram introduzidos os testes de enzimas como a glucosidase e a galactosidase, os testes de metabolismo de proteínas e aminoácidos, digestão de caseína, metabolismo de lipídeos como lipase e lecitinase. Estes testes são colocados em uma ordem lógica e cada resultado determina o próximo passo (Franco-Duarte et al., 2019).

Com a disseminação das ferramentas moleculares e de bancos de dados de sequências genéticas, houve um aumento no número de espécies conhecidas de microrganismos (1971 em 1980, 8.168 em 2007 e 12.391 em 2013) graças ao uso de técnicas como sequenciamento de DNA, 16s rRNA e hibridização. Atualmente, as ferramentas de metabolômica, metagenômica e proteômica, possibilitam a caracterização e a quantificação de um pool de biomoléculas que são traduzidas em estrutura, função e dinâmica e um microrganismo (Franco-Duarte et al., 2019).

4.3. Métodos fenotípicos

Os métodos fenotípicos são os mais difundidos devido ao seu relativo baixo custo, se comparado com os métodos genotípicos. São técnicas que auxiliam o analista a identificar o gênero e, por vezes, até o nível da espécie do microrganismo alvo com um pequeno número de observações e testes. Estes iniciam-se com a coloração de Gram (apresenta coloração e morfologia do microrganismo) ou uma coloração específica para fungos e endósporos bacterianos, além da observação da morfologia macroscópica da colônia, assim como sua formação e coloração. Outros testes complementares também auxiliam na identificação, como os testes para detectar a presença das enzimas catalase, oxidase e lisostafina; da proteína A (coagulase); determinação da capacidade de motilidade; da capacidade oxidativa (metabolizar glicose na presença de oxigênio), fermentativa (metaboliza glicose na ausência e oxigênio), ou ambos; crescimento em meio ágar seletivo e condições ambientais (pH, temperatura, resistência à antibióticos, susceptibilidade a bacteriocinas) Estes testes também podem ser realizados previamente aos testes automáticos ou até substituí-los (Sutton e Cundell, 2004; Sakhno e Gunar, 2016; Sandle, 2017).

4.3.1. Kit de identificação em miniatura

Os kits são um método de identificação fenotípica tradicional que se baseia na detecção visual do crescimento microbiano na presença de um substrato. O perfil analítico do microrganismo é codificado como resultado positivo ou negativo e ao final da análise. É necessário realizar a coloração de Gram e determinados testes químicos rápidos como os testes de catalase, oxidase e coagulase em um isolado puro da bactéria para selecionar o tipo correto do kit a ser usado na identificação. A cultura é suspensa em meio salino e adicionada em uma sucessão de poços que contêm diversos substratos de crescimento, com ou sem indicador e, em seguida, é incubada na temperatura adequada. Este microrganismo fermenta e utiliza estes substratos para crescer, causando mudança de cor no reagente em diferentes padrões, dependendo do microrganismo. A combinação de cores é comparada

manualmente ou automaticamente com uma base de dados desenvolvido com o perfil de centenas de diferentes bactérias isoladas. Pode-se citar como exemplos desses kits o API (Figura 2), o Enterotube®, o Vitek®, o Biolog® e o BD Crystal®. A maioria destes testes fornece resultados em até 24 horas, identificando uma ampla variedade de bactérias, relevantes para a bacteriologia clínica e higiene alimentar, como espécies anaeróbicas, Gram-negativas não fermentadoras, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, entre outros. Entretanto, a identificação de bactérias que não constam no banco de dados do sistema pode apresentar resultados falsos, por apresentarem um perfil de substrato semelhante à alguma espécie detectável pelo sistema (Busse et al., 1996; Halls, 2004).



Figura 1: Tira de teste de identificação API 20E (Fonte: Sandle, 2016).

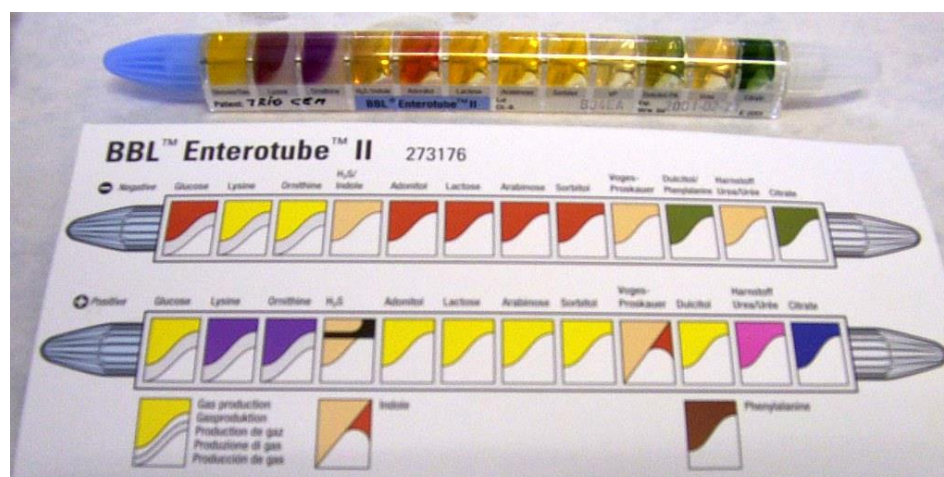


Figura 2: Tira de teste de identificação BBL Enterotube II (Fonte: <https://www.flickr.com/photos/cdepaz/2421013143>, 2021).



Figura 3: suporte de teste de identificação Vitek 2 AST (Fontes:

<https://www.biomerieux.com.br/produto/cartoes-vitekr-2-ast> e

<https://www.biomerieux-microbio.com/pt-pt/formacao/como-e-que-o-vitek-2-cria-valores-de-cmi/>

4.3.2. Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massa

A cromatografia gasosa (CG) é um sistema que consiste de um suprimento de gás, um injetor e uma coluna dentro de um forno, e tem sido usado acoplado ao espectrômetro de massa, pois enquanto a CG possui boa eficiência na separação, a espectrometria de massa (MS - mass spectrometry) fornece espectros de massa individuais que podem distinguir diversos metabólitos contidos nas bactérias, que normalmente não possuem um grupo taxonômico, mas pode auxiliar na identificação de diferentes gêneros, como moléculas não polares e ácidos graxos, por exemplo. Este conjunto oferece sensibilidade, robustez, facilidade na aplicação, baixo custo e grande faixa linear de trabalho (Halls, 2004; Franco-Duarte et al., 2019).

Karami et al, 2017 identificaram as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* a partir da detecção de compostos orgânicos voláteis (COVs), determinados após extração e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Observou-se que alguns COVs são comumente produzidos pelas bactérias, mas em diferentes quantidades como por

exemplo o benzaldeído, que para a *P. aeruginosa* corresponde a 1,96% dos compostos após 2 horas; para *K. pneumoniae* corresponde a 0,27% dos COVs após 4 horas e para *A. baumannii* corresponde a 10,61% após 2 horas de cultivo em meio TSB.

4.3.3. Eletroforese

Nesta técnica, o crescimento da cultura é realizado por curto período de tempo, na presença de proteínas radiomarcadas que são incorporadas nas células. A suspensão desta cultura é colocada sob influência de um campo elétrico homogêneo, fazendo com que as partículas migrem e separem-se de acordo com sua mobilidade eletroforética, diretamente proporcional à sua carga. As técnicas de eletromigração mais usadas incluem a eletroforese em gel (EG) de uma ou duas dimensões, eletroforese capilar de zona (ECZ), isotacoforese capilar e eletroforese capilar por focalização isoeletrica (ECFI) (Halls, 2004; Buszewski et al., 2017).

O processo de separação da eletroforese capilar (EC) com a detecção da espectrometria de massa foi desenvolvida e publicada em 1989 por Joseph Loo, apresentando uma separação mais eficiente que a cromatografia líquida e gasosa, com menor gasto de amostra, rapidez, baixo custo de reagentes, com possibilidade de separar cátions, ânions e moléculas sem carga em uma única corrida, mas possui uma quantidade restrita de dados comerciais acessíveis e reprodutibilidade do tempo de retenção reduzida (Franco-Duarte et al., 2019)

4.3.4. ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

O ensaio de imunoabsorção enzimática foi descrito pela primeira vez em 1972 por Engvall e Perlmann e consiste na detecção de antígenos presentes na superfície celular ou da toxina produzida por um organismo patógeno. É uma técnica que exige a produção de anticorpos específicos para o microrganismo e um segundo anticorpo ligado a uma enzima com capacidade de conferir cor a um substrato incolor, que deve ser específico para o primeiro anticorpo. O microrganismo isolado é fixado a um

substrato e o primeiro anticorpo é adicionado para aderir a ele se for compatível. Caso haja sucesso, quando o segundo anticorpo é adicionado, este se fixa ao conjunto. Em seguida, é adicionado um indicador, que a enzima do segundo indicador cliva para produzir um composto de cor visível. Caso não ocorra a combinação em algum estágio, não haverá o aparecimento de cor. Para este teste, um grande número de anticorpos precisam estar disponíveis e este é feito normalmente depois de uma triagem que diminua as escolhas, não sendo uma técnica adequada para uso rotineiro (Halls, 2004; Ferone et al., 2020).

4.3.5. Espectroscopia de massa (MALDI-TOF)

O MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) é uma ferramenta criada na década de 1980, e utilizada para identificação e classificação rápida de bactérias e fungos. Seu princípio é baseado na leve ionização (positiva ou negativa) de células intactas do microrganismo com pulsos curtos de laser seguido da aceleração das partículas no vácuo com auxílio de um campo elétrico (figura 3). E como resultado da ionização do microrganismo, um perfil espectral específico pode ser registrado e comparado com um banco de dados utilizando um sistema automatizado. O uso mais comum para identificar microrganismos é pela análise de proteínas, que pode ser realizada com a célula inteira, não somente com o lisado, e permite a identificação de bactérias até a sua espécie. Possui vantagens por ser rápido e preciso na identificação e diferenciação de microrganismo, chegando ao nível de gênero e espécie e, em alguns casos, até mesmo a subespécie, necessita de pouca amostra para análises adicionais e a interpretação de dados é relativamente rápida e fácil (Wieser et al., 2012; Buszewski et al., 2017)

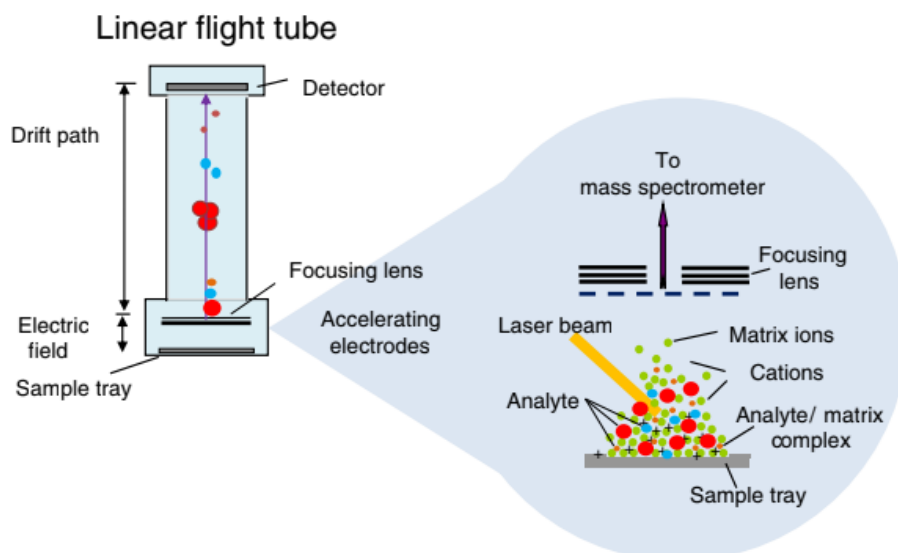


Figura 4: Diagrama esquemático da espectrometria de massa MALDI-TOF. O impacto do laser causa uma dessorção térmica das proteínas da bactéria ou levedura, incorporadas no material da matriz e aplicadas à placa alvo. Sob ação de um campo elétrico, os íons são acelerados de acordo com sua massa e carga elétrica que influencia em seu tempo de corrida até ser detectada no topo do tubo de vácuo. O tempo necessário é usado para calcular a massa exata dos polipeptídeos. (Fonte: Wieser et al., 2012)

Atualmente existem três bancos de dados disponíveis, disponibilizados por fabricantes de equipamentos: o Bruker BioTyper® (Bruker) , SARAMIS (bioMérieux), e Andromas (Andromas SAS). A última versão do sistema Bruker possui mais de 4500 espécies e baseia-se na frequência dos picos específicos da espécie da amostra, comparando-os com um espectro de massa padrão. Já o banco de dados do SARAMIS está disponível em duas versões a depender do equipamento: uma diretamente ligada ao espectrômetro de massa Shimadzu Axima e outra, ao sistema VITEK® MS Plus. Neste último, os picos no espectro de referência são colocados em uma escala de 0 a 40 de acordo com a espécie específica e o resultado é dado pela soma destes valores, os quais permitem identificar cerca de 3000 microrganismos. Este equipamento tem a vantagem de ser de mais fácil operação e preparação da amostra, comparado equipamento Bruker MS (tabela 1). O Andromas é o menos usado e possui cerca de 700 cepas de bactérias no banco de dados (Buszewski et al., 2017).

	BioTyper®	VITEK® MS Plus
Instrumento	Microflex (Bruker)	VITEK MS (bioMérieux)
Resolução de massa	3500	5000
Custo de instrumentos	+	++
Banco de dados	> 150.000 espectros > 6.903 cepas > 2.461 espécies > 424 gêneros	> 42.000 espectros de referência > 15.466 cepas > 2.500 espécies
Atualização de dados	Paga (2-3 anos)	Grátis (todo ano)
Placa de amostra	Reutilizável	Descartável
Custo analítico por amostra	Custo dos reagentes	Custo adicional da placa de amostra descartável
Banco de dados personalizado	Disponível	Disponível
Capacidade de transferência	Até 96 amostras em uma única corrida	Até 192 amostras em uma única corrida

Tabela 1: Comparação das especificações gerais do BioTyper® e VITEK® MS Plus. Fonte: Jang e Kim, 2018).

Muitos estudos comparam a efetividade dos sistemas Biotyper, VITEK MS e Shimadzu Axima e todos apresentaram boa performance de identificação com baixa porcentagem de erros (Buszewski et al., 2017).

4.3.6. Espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (IVTF)

A espectrometria infravermelha é uma técnica bem estabelecida para identificar grupos funcionais em uma molécula baseada nos seus modos vibracionais pela excitação causada pela absorção de diferentes frequências infravermelhas. Esta excitação então pode ser mensurada e determinar uma impressão digital para sua absorção máxima. E esta técnica pode ser utilizada para identificar proteínas, lipídeos, polissacarídeos, grupos polifosfatos e outros grupos carboidratos funcionais das células bacterianas. Entretanto, a limitação de ferramentas, instrumentos e dados experimentais dificultam a implementação desta técnica como prática regular para análise de microrganismos (Halls, 2004; Ojeda e Dittrich, 2012).

O uso da FTIR tem vantagens por fornecer informações relacionadas às propriedades moleculares da amostra, ser uma técnica relativamente rápida (a maioria das amostras podem ser lidas em 5 minutos), normalmente necessita de pouca amostra, é uma técnica não destrutiva. A presença de água na amostra pode trazer dificuldades por sofrer interferência. É necessário experiência na análise de espectros, uma vez que esta técnica não detecta moléculas diatômicas como N₂ ou O₂, a região espectral de vários componentes pode se sobrepor, levando a interpretação errada de resultados, e também por sofrer alterações por diferença no meio, temperatura e tempo de incubação usados, fatores que podem ser usados para estudar o impacto de diferentes condições na fisiologia bacteriana (Ojeda e Dittrich, 2012).

4.3.7 Espectrometria Raman

A técnica de espectrometria Raman baseia-se na interação da luz com as moléculas para mensurar as vibrações dos grupos funcionais. Quando uma luz incidente ou fótons (normalmente de lasers altamente focados) interagem com uma molécula, pode-se induzir a transição do estado de energia, deixando a molécula em um estado vibracional excitado com a correspondente perda de energia do fóton, que resulta em uma mudança de frequência e na mudança da luz incidente, que pode ser medida. Então, a impressão digital estrutural obtida é utilizada para identificar microrganismos, com capacidade de distinguir corretamente espécies e cepas em algumas horas. Esta técnica se diferencia por apresentar baixo custo, rapidez e extenso relatório, como a composição química, estrutura e interações das biomoléculas nos microrganismos (Ashton et al., 2011; Franco-Duarte et al., 2019).

A espectrometria Raman e IVTF são métodos de espectrometria vibracional, mas com diferença na interação luz-matéria. A primeira muda a polarizabilidade dos elétrons compartilhados entre os átomos, enquanto a outra necessita de uma mudança no momento de dipolo da ligação para ser ativado. E ainda assim, ambas fornecem a impressão digital completa do organismo (Moldenhauer, 2011; Franco-Duarte et al., 2019).

4.4. Métodos genotípicos

Os métodos genotípicos são responsáveis por estudar o genoma microbiano, e são baseados em alguma variação de análise de DNA, sendo a amplificação ou o sequenciamento. Podem abranger análises simples de amplificação (PCR, PCR em tempo real, RAPD-PCR) ou análises mais complexas baseados em fragmentos de restrição, gene direcionado e sequenciamento do genoma completo e espectrometria de massa. São técnicas que não dependem de meio de isolamento ou das características de crescimento do microrganismo e possuem um banco de dados melhorado, abrindo um novo conjunto de espécies e subespécies e até reclassificando espécies já relatadas. Entretanto, devido ao alto custo destas análises, não é possível usá-las na rotina e geralmente são realizadas por instituições externas, resultando em um maior tempo de espera pelos resultados. (Buszewski et al., 2017; Sandle, 2017; Franco-Duarte et al., 2019).

Várias tecnologias baseadas na identificação dos ácidos nucleicos das células estão sendo desenvolvidas para a caracterização de microrganismos, onde pode ser analisado o ácido desoxirribonucleico (DNA) ou o ácido ribonucleico (RNA) presente. A técnica é semelhante para ambas as opções, a cultura é submetida ao calor para desnaturação e é introduzida uma sonda específica para DNA de fita simples que se liga a um alvo no DNA celular e é detectado por indicador adequado, enquanto que para uma sonda de RNA, é utilizada uma enzima que corta o DNA bacteriano e a sonda identifica os fragmentos (Halls, 2004; Easter, 2005).

Um dos sistemas é o Gene-Trak® (Neogen), uma técnica de hibridização usada para identificar microrganismos específicos, mesmo que em uma mistura de culturas, tendo como alvo o RNAr 16s ou 23s, que demonstram relação filogenética que auxiliam na identificação. Este sistema exige que seja realizado algum pré-enriquecimento do microrganismo alvo e é um método que leva menos de 3 horas e usa apenas equipamentos básicos. Uma vantagem deste sistema é que ele possui informações consideráveis destes sequenciamentos, inclusive de bactérias Gram-negativas. Outra técnica muito utilizada e conhecida é a amplificação de ácido nucleico através da reação da cadeia polimerase (PCR), que envolve uma amplificação enzimática da sequência de DNA alvo utilizando um par de iniciadores (primers) específicos e uma DNA polimerase termotolerante. Em teoria, a técnica

fornece um método rápido, de alta sensibilidade e especificidade de esporos bacterianos e bolores, mas sua grande amplificação pode causar problemas de contaminação cruzada que podem resultar falsos positivos (Easter, 2005).

Uma importante consideração com as tecnologias de identificação microbianas é o número e os tipos de gênero e espécies requeridos para identificar cada microrganismo. A tabela 2 compara os diferentes tipos de sistemas de identificação (Sakhno e Gunar, 2016).

Método	Sistema	Fabricante	Banco de dados	Tempo
Bioquímico	API® e ID32	Biomerieux, França	Mais de 600 espécies de bactérias e fungos	18-48 h
	BBL™ Crystal™	Becton Dickinson, EUA	Mais de 400 táxons e 120 gêneros de organismos clinicamente importantes	4-24 h
	Biolog Microbial ID System	Biolog Inc., EUA	Mais de 2500 espécies de bactérias, fungos e leveduras	4-26 h
	Vitek 2 Compact	Biomerieux, França	Mais de 450 taxons	2-24 h
	BD Phoenix™	Becton Dickinson, EUA	Mais de 200 taxons	4-24h
Análise de ácidos graxos metil ester	MIDI Sherlock	MIDI, EUA	Mais de 2500 espécies, incluindo 700 de microrganismos ambientais aeróbicos, 620 anaeróbicos e 200 fungos	overnight
Espectrometria de massa MALDI-TOF	MALDI-Biotyper	Bruker Daltonik GmbH, Alemanha	Mais de 2500 espécies (5600 cepas)	Minutos
	Vitek MS	Biomerieux, França	755 espécies clinicamente importantes	Menos de 2 minutos
Espectroscopia IVTF	IFS-28B FT-IR spectrometer	Bruker Daltonik GmbH, Alemanha	730 cepas bacterianas com 220 espécies de 46 gêneros e 332 cepas de leveduras, com 74 espécies de 18 gêneros	Minutos
Extração do ácido nucleico,	MicroSeq™ Identification	Applied biosystems,	Mais e 2300 espécies de bactérias e 1100	2-4 h

amplificação PCR e sequenciamento da base de rRNA	System	EUA	espécies de fungo	
---	--------	-----	-------------------	--

Tabela 2: Comparação do banco de dados e tempo de detecção dos sistemas de identificação. Fonte: Sakhno e Gunar, 2016.

5. CONCLUSÃO

Atualmente existem diversas formas de identificação microbiana com aplicação na indústria farmacêutica, pois é uma área em constante evolução, em busca de precisão e rapidez em seus resultados. Entretanto, o desenvolvimento e aprimoramento de tais técnicas tornam seu custo mais alto, seja na aquisição do equipamento, do sistema a ser utilizado ou do banco de dados necessário.

Apesar de existir uma grande variedade de técnicas, a busca da literatura para este trabalho evidenciou que a maior parte dos estudos de identificação bacteriana estão voltados à área clínica e os sistemas disponíveis também possuem banco de dados mais direcionado ao ambiente clínico. Além disso, a indústria é a responsável por definir o método de escolha de identificação bacteriana, e este fato está diretamente ligado ao seu custo-benefício, levando em conta a criticidade dos medicamentos e das salas limpas utilizadas para produção e análise.

Mesmo com a evolução das técnicas de identificação apresentadas neste trabalho, na prática, muitas delas necessitam de testes básicos para direcionar o andamento da identificação, como por exemplo, realizar a coloração de Gram para diferenciar entre Gram-positivas e Gram-negativas; observar a presença de enzimas, como a oxidase que diferencia bactérias não fermentadoras de entéricas, além da necessidade de se realizar o isolamento adequado da bactéria a ser estudada, e por isso, tais métodos exigem pessoal devidamente treinado para sua correta execução, o que reflete em investimento de treinamento constante neste setor.

6. BIBLIOGRAFIA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2019. 8.1 Produtos estéreis. In:: *Farmacopéia Brasileira*. 6ª edição. Brasília: s.n., pp 702-713.

BRITO, N. M. R. Identificação rápida de contaminantes microbianos em produtos farmacêuticos. 2019. 109p. Dissertação para obtenção do Título de Mestre - Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BUSSE, H.-J.; DENNER E. B. M; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* v.47, pp 3-38, 1996.

BUSZEWSKI, B; ROGOWSKA, A.; POMASTOWSKI, P.; ZŁOCH, M.; RAILEAN-PLUGARU, V. Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* v. 100, n. 6, 2017.

CHALLENGER, C. A. Estratégias de identificação microbiana para controle de biocarga. *Pharmaceutical Technology Edição Brasileira*, v.23 / nº2, pp.24-26, 2019.

DREWS, G. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, pp. 225-249, 2000.

EASTER, M. C. Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry. Interpharm/CRC, 1 ed., pp. 28-39, 2005.

FRANCO-DUARTE, R.; ČERNÁKOVÁ L.; KADAM, S.; KAUSHIK K. S.; SALEHI, B.; BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; ANTOLAK, H.; DYBKA-STĘPIEŃ, K.; LESZCZEWICZ, M.; TINTINO, S. R.; SOUZA, V. C. A.; SHARIFI-RAD, J.; COUTINHO, H. D. M.; MARTINS, N.; RODRIGUES C. F. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms - from past to present. *Microorganisms*, V. 7, 130, 2019.

FERONE, M; GOWEN, A.; FANNING, S; SCANNELL, A. G. M. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches.

COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY, V. 19, pp. 3106-3129, 2020.

HAKOVIRTA, J. MODERN TECHNIQUES IN DETECTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF BACTERIA AND PEPTIDES FROM FOODS. Academic Dissertation in Microbiology, University of Helsinki, Finland, 2008.

HALLS, N. Microbiological Contamination Control in Pharmaceutical Clean Rooms. CRC Press, 1 ed., pp. 159-165, 2004.

JANG, K; KIM, Y. H. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. Journal of Microbiology, v. 56, n. 4, pp. 209-216, 2018.

KARAMI, N., KARIMI, A., ALIAHMADI, A., MIRZAJANI, F., REZADOOST, H., GHASSEMPOUR A., FALLH, F., Identification of bacteria using volatile organic compounds, Cellular and Molecular Biology, 63, pp. 112 - 121, 2017.

MOLDENHAUER, J. Proteotypic Identification Methods – A Change in Identification Methods. American Pharmaceutical Review, 2011. Disponível em: <<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/112514-Proteotypic-Identification-Methods-A-Change-in-Identification-Methods/>>. Acesso em 14/06/2021.

MURRAY, P; ROSENTHAL, K; PFALLER, M. Microbiologia Médica, 7ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NEMATI, M.; HAMIDI, A.; DIZAJ, S. M.; JAVAHERZADEH, V.; LOTFIPOUR, F. An Overview on Novel Microbial Determination Methods in Pharmaceutical and Food Quality Control. Advanced Pharmaceutical Bulletin, v. 6, n. 3, pp. 301 - 308, 2016.

OJEDA, J. J.; DITTRISH, M. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Molecular Analysis of Microbial Cells. Microbial Systems Biology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, v. 881 , pp.187-195, LLC, 2012.

SAKHNO N. G.; GUNAR O. V. Microbial Identification Methods in Pharmaceutical Analysis: Comparison and Evaluation. Mathews Journal of Pharmaceutical Science, v. 1, n. 1, art. 001, 2016.

SANDLE, T., Microbial Identification strategy for pharmaceutical microbiology, Institute of Validation Technology, 2017. Disponível em <<https://www.ivtnetwork.com/article/microbial-identification-strategy-pharmaceutical-microbiology>>, verificado em 30/05/2021.

SANDLE, T. , Pharmaceutical Microbiology. Elsevier, 1 ed., p. 103-113, 2016.

SANDLE, T.; SKINNER, K; SANDLE, J; GEBALA, B; KOTHANDARAMAN, P. Evaluation of the GEN III OmniLog® ID System microbial identification system for the profiling of cleanroom bactéria. European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences, v 18, n. 2, p. 44-50, 2013.

SUTTON, S. V. W.; CUNDELL, A. M. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. Pharmaceutical Forum, V 30, n. 5, p. 1884 - 1894, 2004.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (USP), 2012. *Microbial Characterization, Identification, ant Strain Typing 697/ General Information 1113*, USP 35, pp. 694-707

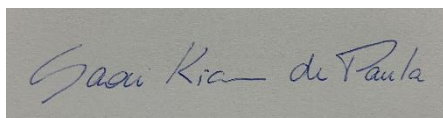
THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (USP), 2012. *Aseptic Processing Environments / General Information 1116*, USP 35, pp. 697-707.

UTESCHER, C. L. A.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R.; GAMBALE, V. Microbiological Monitoring of Clean Rooms in Development of Vaccines. Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, pp. 710-716, 2007.

WIESER, A.; SCHNEIDER, L; JUNG, J; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl Microbiol Biotechnol, v. 93, pp. 965–974, 2012.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; TSE, H.; YUEN, K.-Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clinical Microbiology and Infection, v. 14 n. 10, pp. 908–934, 2008.

3. ANEXOS

A rectangular box containing a handwritten signature in dark ink. The signature is written in a cursive style and reads "Saori Kiam de Paula".

Saori Kiam de Paula

Profa. Dra. Marina Ishii