

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Rafael Oscar da Silva

**CONTROLE DE QUALIDADE DO ACERVO DE PESQUISA DA COLEÇÃO DE  
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS (CBP) DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE  
DE QUALIDADE EM SAÚDE – INCQS/FIOCRUZ**

Rio de Janeiro

2024

Rafael Oscar da Silva

CONTROLE DE QUALIDADE DO ACERVO DE PESQUISA DA COLEÇÃO DE  
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS (CBP) DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE  
QUALIDADE EM SAÚDE – INCQS/FIOCRUZ

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutor: Dra. Debora Ribeiro de Souza Santos

Preceptor: MSc. Carla Dias de Castro

Rio de Janeiro

2024

## Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## Biblioteca

Silva, Rafael Oscar da

Controle de qualidade do acervo de pesquisa da Coleção de Bactérias Patogênicas (CBP) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ. / Rafael Oscar da Silva. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2024.  
82 f. : fig. ; graf. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2024.

Tutora: Debora Ribeiro de Souza Santos.

Preceptora: Carla Dias de Castro.

1. Coleção Biológica. 2. Microbiologia. 3. Ensaio Microbiológicos. 4. Vigilância Sanitária. I. Título.

Quality control of the research Collection of Pathogenic Bacteria (CBP) at the National Institute of Quality Control in Health – INCQS/FIOCRUZ

Rafael Oscar da Silva

CONTROLE DE QUALIDADE DO ACERVO DE PESQUISA DA COLEÇÃO DE  
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS (CBP) DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE  
QUALIDADE EM SAÚDE – INCQS/FIOCRUZ

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: 06/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Silvana do Couto Jacob

Fundação Oswaldo Cruz

Me. Nathalia Goncalves Santos Caldeira

Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Marcelo Luiz Lima Brandão

Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Debora Ribeiro de Souza Santos - (Tutor)

Fundação Oswaldo Cruz

MSc. Carla Dias de Castro - (Preceptor)

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho à minha família, amigos e a equipe do laboratório por todo o suporte durante esta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela minha vida, por me proteger e ajudar a superar todos os obstáculos durante essa jornada.

Aos meus pais e meus irmãos, pelo contínuo incentivo e suporte, principalmente nos momentos mais difíceis enquanto me dedicava à realização do presente trabalho. Obrigado por serem a minha principal fonte de inspiração, por acreditarem em mim quando eu mesmo duvidava e por serem os pilares que sustentam meus sonhos.

Aos meus amigos de Juiz de Fora, por estarem sempre comigo e que mesmo com todas as mudanças ocorridas estiveram presentes, apoiaram e fizeram esta jornada mais rica e memorável, com certeza vocês fazem parte desta conquista.

Ao meu namorado João Lucas Pinheiro Leite por ser uma inspiração para mim e principalmente por estar sempre comigo, mesmo com a distância, sempre me incentivando, motivando a ser cada dia melhor e celebrando cada conquista.

A minha tutora/orientadora Dra. Debora Ribeiro, pelo apoio, orientação e incentivo constante ao longo da jornada na elaboração deste trabalho de conclusão e na rotina do laboratório. Sua expertise e paixão pela microbiologia e pela pesquisa foram fundamentais para o meu crescimento profissional e acadêmico.

A minha preceptora MSc. Carla Dias de Castro, por todo o suporte dado ao longo desse período de residência e por ter me recebido tão bem na equipe do laboratório.

Ao curador da Coleção de Bactérias Patogênicas, Dr. Ivano de Filippis, pela confiança e apoio na realização do presente trabalho.

A minha dupla dinâmica de bancada, Ana Caroline Araújo e Ester Terra, cujo companheirismo e suporte foram fundamentais durante todas as atividades no laboratório e na realização do presente trabalho. Obrigado por enfrentarem, lado a lado, todos os desafios. O sucesso alcançado no laboratório é, sem dúvida, um resultado de nossa parceria dinâmica.

A equipe do laboratório pela recepção e por toda assistência prestada, tanto na rotina do laboratório quanto para o desenvolvimento deste trabalho. A colaboração, dedicação e suporte oferecidos por cada membro da equipe foram imprescindíveis para que este trabalho alcançasse seus objetivos.

A todas as pessoas que, diretamente ou indiretamente, estiveram envolvidas no processo de mudança de Juiz de Fora para o Rio de Janeiro para que esse período de residência fosse realizado, cada contribuição foi fundamental para tornar isso possível.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Ministério da Saúde, pela bolsa concedida e que foi essencial para me manter no Rio de Janeiro.

Aos membros da banca pelo interesse e disponibilidade em participar da minha defesa.

E, principalmente, agradeço à minha turma de residência, em especial à Aline, Caroline, Isadora, Lara, Larissa e Mariana, pela amizade que construímos ao longo desse período. Com certeza, vocês tornaram essa caminhada muito mais leve e divertida! Obrigado por serem pessoas ímpares, incríveis profissionais e excelentes amigas. Espero, de coração, que os próximos caminhos sejam de repleto sucesso, realizações e que cada desafio seja uma nova oportunidade para aprender e crescer. Somos merecedores!

A ciência não conhece país, porque o conhecimento pertence à humanidade, e ela é a tocha que ilumina o mundo.

Louis Pasteur



## RESUMO

As coleções biológicas são centros de conservação *ex-situ* de organismos ou parte deles. Atualmente, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) possui 35 coleções reconhecidas institucionalmente, dentre as quais se encontra a Coleção de Bactérias Patogênicas (CBP). O extenso acervo da CBP compreende mais de 2000 linhagens e disponibiliza uma variedade de serviços, incluindo, caracterização fenotípica e molecular, fornecimento, depósito, preservação de linhagens bacterianas, seja por liofilização ou ultracongelamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a conformidade de parte do acervo de pesquisa da CBP do INCQS por meio de ensaios microbiológicos como uma forma de controle interno da qualidade e realizar a reposição dos lotes analisados. Foram selecionadas as linhagens mais solicitadas para o fornecimento externo e, dentre essas, aquelas com estoques críticos (abaixo de 10 ampolas), para serem submetidas aos ensaios de pureza, viabilidade, autenticação e antibiograma. O estudo foi dividido em etapas de pré-produção, com ensaio de pureza, análise microscópica e autenticação por sistema semi-automatizado VITEK<sup>®</sup> 2; produção a partir do crescimento bacteriano com solução “Skim milk” a 10%; e pós-produção, incluindo, além dos ensaios realizados na pré-produção, a viabilidade por meio de diluições seriadas e o antibiograma pelo método VITEK<sup>®</sup> 2. A identificação molecular por sequenciamento parcial do gene 16S RNAr e pelo MALDI-TOF MS foram utilizados quando a identificação em nível de espécie não foi possível com os testes fenotípicos utilizados. Foram selecionadas 100 cepas da CBP para os ensaios microbiológicos, 84 cresceram de forma pura e compatível com a identificação na CBP. Quatro apresentaram crescimento de mais de um microrganismo (contaminação) e apenas duas apresentaram características incompatíveis com a identificação na CBP. Em 10 cepas não houve crescimento na primeira tentativa. No entanto, nove dessas cepas foram recuperadas com sucesso em uma nova ampola e cresceram de forma satisfatória. No ensaio de viabilidade todas as cepas avaliadas apresentaram resultado satisfatório, a maioria (54%) com 10<sup>8</sup> UFC/mL de células viáveis. Foram realizadas 97 identificações pelo VITEK<sup>®</sup>2 com os seguintes resultados: 54 (56%) cepas da família *Enterobacteriaceae*, 15 (15%) cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, três (3%) pertencentes ao gênero *Yersinia*, nove (9%) ao gênero *Staphylococcus* e nove (9%) ao gênero *Bacillus*. Sete (8%) cepas apresentaram resultado da identificação pelo VITEK<sup>®</sup>2 diferente de sua identificação na coleção, sendo assim, excluídas do acervo. De acordo com os critérios determinados pelo Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos - BrCAST foram avaliados os perfis de suscetibilidade de 78 cepas, onde 31% delas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. A análise das nove cepas de *Bacillus* pelos

diferentes métodos de identificação utilizados revelou uma maior precisão na identificação a nível de espécie desse grupo pelo MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight), desempenho que possivelmente pode ser justificado pela composição mais abrangente de seu banco de dados. O presente estudo contribuiu significativamente com a reestruturação da CBP, por meio de diferentes ensaios microbiológicos, fortalecendo, assim, a qualidade na preservação biológica.

Palavras-chave: Coleção Biológica. Microbiologia. Ensaio Microbiológico. Vigilância Sanitária.

## ABSTRACT

Biological collections are *ex-situ* conservation centers for organisms or parts thereof. Currently, the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) has 35 institutionally recognized collections, among which is the Collection of Pathogenic Bacteria (CBP). The extensive collection of the CBP comprises over 2000 strains and provides a variety of services, including phenotypic and molecular characterization, supply, deposit, and preservation of bacterial strains, either by lyophilization or ultrafreezing. The aim of this study was to assess the compliance of a portion of the research collection of the CBP of INCQS through microbiological assays as a form of internal quality control and to replenish the analyzed batches. The most requested strains for external supply were selected, and among these, those with critical stocks (below 10 vials) were subjected to purity, viability, authentication, and antibiogram assays. The study was divided into pre-production stages, including purity assay, microscopic analysis, and authentication by the semi-automated VITEK<sup>®</sup> 2 system; production involving bacterial growth with 10% Skim milk solution; and post-production, which included viability assessment through serial dilutions in addition to the assays conducted during pre-production, and antibiogram using the VITEK<sup>®</sup> 2 method. Molecular identification by partial sequencing of the 16S rRNA gene and MALDI-TOF MS were used when species-level identification was not possible with the phenotypic tests employed. One hundred strains from the CBP were selected for microbiological assays, out of which 84 grew in a pure and compatible manner with the identification in the CBP. Four showed growth of more than one microorganism (contamination), and only two presented characteristics incompatible with the identification in the CBP. In 10 strains, there was no growth in the first attempt. However, nine of these strains were successfully recovered from a new vial and grew satisfactorily. In the viability assay, all evaluated strains showed satisfactory results, with the majority (54%) having  $10^8$  CFU/mL of viable cells. Ninety-seven identifications were made by VITEK<sup>®</sup>2 with the following results: 54 (56%) strains from the *Enterobacteriaceae* family, 15 (15%) strains of *Pseudomonas aeruginosa*, three (3%) belonging to the genus *Yersinia*, nine (9%) to the genus *Staphylococcus*, and nine (9%) to the genus *Bacillus*. Seven (8%) strains showed identification results by VITEK<sup>®</sup>2 different from their identification in the collection, thus, they were excluded from the collection. According to the criteria determined by the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST, susceptibility profiles of 78 strains were evaluated, where 31% of them were sensitive to all tested antimicrobials. The analysis of the nine *Bacillus* strains by the different identification methods used revealed greater species-level identification accuracy for this group

by MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight), a performance that may be possibly justified by the more comprehensive composition of its database. The present study significantly contributed to the restructuring of the CBP through various microbiological assays, thus strengthening the quality in biological preservation.

Keywords: Biological Collection. Microbiology. Microbiological Assays. Sanitary Surveillance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do método de viabilidade. ....	42
---	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Listagem dos antimicrobianos testados de acordo com as características morfológicas da cepa. ....	43
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intervalo aceitável da suspensão bacteriana a ser identificada pelo VITEK <sup>®</sup> 2. ....	39
Tabela 2 - Aliquota para segunda suspensão bacteriana para determinação do perfil de resistência. ....	43
Tabela 3 - Primers utilizados na amplificação pela PCR.....	44
Tabela 4 - Resultados insatisfatórios encontrado pela análise com sistema VITEK <sup>®</sup> 2.....	49
Tabela 5 - Porcentagens de similaridade obtidas do sequenciamento no banco de dados BLAST. ....	51
Tabela 6 - Resultados da análise do MALDI-TOF MS. ....	52
Tabela 7 - Comparação entre os resultados obtidos pelo VITEK <sup>®</sup> 2, sequenciamento parcial do gene 16S RNAr e MALDI-TOF MS para cepas de <i>Bacillus</i> da CBP. ....	62

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Cepas do acervo de pesquisa da CBP submetidas aos ensaios microbiológicos. .47	
Gráfico 2 - Resultados do ensaio de viabilidade (UFC/mL). .... 50	
Gráfico 3 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>Enterobacter cloacae</i> da CBP. ..... 53	
Gráfico 4 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>E. coli</i> da CBP..... 53	
Gráfico 5 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>Klebsiella</i> spp. da CBP.....54	
Gráfico 6 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>Salmonella</i> spp. da CBP...55	
Gráfico 7 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>P. aeruginosa</i> da CBP. ....55	
Gráfico 8 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. da CBP. ..... 56	



## LISTA DE SIGLAS

AMC	Amoxicilina com ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APS	Ampicilina/Subactam
AST	Antimicrobial Susceptibility Testing
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
BCCM	<i>Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BrCAST	Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
CARVS	Coleção de Arqueas de Referência em Vigilância Sanitária
CAZ	Ceftazidima
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CBP	Coleção de Bactérias Patogênicas
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
CCVSU	Coleção de Culturas de Vigilância em Saúde Única
CFAS	Coleção de Fungos do Ambiente e Saúde
CFO	Cefoxitina
CFRVS	Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária
CIP	Ciprofloxacina
CLI	Clindamicina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
COL	Colistina
CPM	Cefepima
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima

CXA	Cefuroxima axetil
CXM	Cefuroxima
CZA	Ceftazidima/Avibactam
C/T	Ceftolozane/Tazobactam
DAP	Daptomicina
ddNTPs	Didesoxinucleotídeos
DFT	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
DI	Departamento de Imunologia
DM	Departamento de Microbiologia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQ	Departamento de Química
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERI	Eritromicina
ERT	Ertapenem
ESBL	Enzima $\beta$ -lactamase de Espectro Estendido
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GEN	Gentamicina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPM	Imipenem
JCM	<i>Japan Collection of Microorganisms</i>
KDA	kilodalton
Lacens	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LCCDMA	Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos
LEV	Levofloxacina
LMR	Laboratório de Microrganismos de Referência
LNZ	Linezolida
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
MDR	Multidrug-resistant
MPM	Meropenem

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIT	Nitrofurantoína
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina
OXA	Oxacilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEN	Penicilina/Benzilpenicilina
pH	Potencial hidrogeniônico
PIT	Piperacilina/Tazobactam
POP	Procedimento Operacional Padrão
PU	Procedimento de Uso
PDR	Pandrug-resistant
RIF	Rifampicina
RNAr	RNA ribossomal
rpm	Rotações por Minuto
SBA	Setor de Bactérias e Arqueas
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
spp.	Espécies
SUL	Sulfonamida
SUT	Trimetoprim/Sulfametoxazol
TEC	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
TIG	Tigeciclina
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
UFC	Unidade formadora de colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VAN	Vancomicina
Visa	Vigilância Sanitária
XDR	Extensively drug-resistant

## LISTA DE SÍMBOLOS

-	Negativo
°C	Graus celsius
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μg	Microgramas
+	Positivo
≥	Maior ou igual
%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
±	Mais ou menos

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1	<b>Vigilância sanitária</b> .....	22
1.2	<b>Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde</b> .....	23
1.3	<b>Coleções biológicas</b> .....	24
1.4	<b>Coleção de bactérias patogênicas</b> .....	26
1.4.1	Enterobacter spp.....	27
1.4.2	Escherichia coli.....	27
1.4.3	Klebsiella spp.....	28
1.4.4	Salmonella spp.....	28
1.4.5	Yersinia spp.....	29
1.4.6	Pseudomonas aeruginosa.....	29
1.4.7	Staphylococcus spp.....	29
1.4.8	Bacillus spp.....	30
1.5	<b>Identificação bacteriana</b> .....	30
1.5.1	Caracterização fenotípica.....	31
1.5.1.1	<i>Cultivo bacteriano</i> .....	31
1.5.1.2	<i>Microscopia</i> .....	31
1.5.1.3	<i>Métodos bioquímicos</i> .....	32
1.5.1.4	VITEK® 2.....	32
1.5.1.5	<i>Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos</i> .....	33
1.5.1.6	<i>Maldi-Tof MS</i> .....	34
1.5.2	Caracterização genotípica.....	35
1.5.2.1	<i>Sequenciamento parcial do gene 16S RNAR</i> .....	35
1.6	<b>Justificativa</b> .....	35
2	<b>Objetivo</b> .....	37
2.1	Objetivo geral.....	37
2.2	Objetivos específicos.....	37
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	38
3.1	<b>Amostra</b> .....	38
3.2	<b>Controle pré-produção</b> .....	38
3.2.1	Reidratação do líofilo.....	38

3.2.2	Pureza.....	39
3.2.3	Análise microscópica.....	39
3.2.4	Identificação pelo VITEK® 2.....	39
3.3	<b>Produção</b> .....	40
3.3.1	Produção de lotes de ampolas.....	40
3.3.2	Preservação por liofilização.....	40
3.3.3	Teste de vácuo.....	40
3.4	<b>Controle pós-produção</b> .....	41
3.4.1	Viabilidade.....	41
3.4.2	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	42
3.4.3	Identificação molecular.....	43
3.4.3.1	<i>Extração do DNA</i> .....	43
3.4.3.2	<i>Reação em cadeia da polimerase</i> .....	44
3.4.3.3	<i>Sequenciamento parcial do gene 16S RNAR</i> .....	44
3.4.4	Maldi-Tof MS.....	45
4	<b>RESULTADOS</b> .....	47
4.1	<b>Seleção das cepas</b> .....	47
4.2	<b>Pureza</b> .....	47
4.3	<b>Autenticação pelo VITEK® 2</b> .....	48
4.4	<b>Produção de lotes</b> .....	49
4.5	<b>Viabilidade</b> .....	50
4.6	<b>Identificação pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAR</b> .....	50
4.7	<b>Maldi-Tof MS</b> .....	52
4.8	<b>Teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo VITEK® 2</b> .....	52
4.8.1	<i>Enterobacter cloacae</i> .....	52
4.8.2	<i>Escherichia coli</i> .....	53
4.8.3	<i>Klebsiella spp</i> .....	54
4.8.4	<i>Salmonella spp</i> .....	54
4.8.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	55
4.8.6	<i>Staphylococcus spp</i> .....	56
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69

<b>APÊNDICE A - LISTAGEM COMPLETA DAS CEPAS DA CBP SELECIONADAS PARA OS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE B - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE VIABILIDADE.....</b>	<b>80</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Vigilância sanitária

Vigilância sanitária (Visa) é um termo utilizado no Brasil que compreende ações voltadas para a redução, eliminação e/ou prevenção de riscos relacionados a produtos, substâncias, tecnologias, processos e serviços que direta ou indiretamente estejam relacionados a saúde humana (Costa *et al.*, 2022b; Silva; Costa; Lucchese, 2018).

Medicamentos, alimentos, produtos biológicos (como vacinas, hemoderivados, órgãos e tecidos para transplantes), itens de higiene, perfumes, cosméticos, produtos médico-hospitalares, órteses, próteses, odontológicos, produtos laboratoriais, saneantes, e outros similares estão sujeitos à intervenção da Visa (Silva; Costa; Lucchese, 2018).

As ações da Visa compreendem um campo dentro da saúde coletiva e sua atuação se dá por meio da elaboração de ações estratégicas relacionadas à saúde e principalmente pela regulação sanitária de qualquer bem e serviço de interesse da saúde, incluindo as condições dos ambientes. Para isso lhe é atribuído poder de polícia, de natureza administrativa, ou seja, em prol do interesse coletivo fica permitido limitar direitos individuais (Costa *et al.*, 2022b; Silva; Costa; Lucchese, 2018).

Embora seja uma prática antiga e de suma importância, as ações da Visa se consolidaram de fato a partir do século XX, quando foram implementadas normas e regulamentações que marcaram e mudaram o rumo da saúde pública no Brasil. Sendo alguns exemplos disso, a criação do Ministério da Saúde por meio da lei 1.920 em 1953; criação da Lei de Vigilância Sanitária (6.360/76); criação da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, por meio do Decreto 79.056; criação da Lei Orgânica da Saúde (8.080/90); e da Lei 9.782/99, responsável pela definição do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) e criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (Brasil, 1953, 1976a, 1976b, 1990, 1999; Costa; Rozenfeldr, 2000).

Outro marco na história da saúde pública foi a inauguração do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), responsável por atuar junto a Anvisa, no plano federal, no desenvolvimento técnico-científico e na realização de análises dos produtos sujeitos ao controle sanitário. Este instituto teve sua origem no Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM), criado em 1954. Posteriormente, em 1961, foi alterado para Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA) após ampliação da sua área de atuação para abranger também alimentos (Piovesan, 2002).



## 1.2 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Após a transferência do LCCDMA para a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), o laboratório central ganhou um novo formato, com uma estrutura mais moderna e neste local foi inaugurado em setembro de 1981 como o atual INCQS (Costa; Rozenfeldr, 2000; Gemal *et al.*, 2016).

Trata-se de uma unidade técnico-científica, que compõe o SNVS, subordinado tecnicamente à ANVISA e administrativamente à Fiocruz (Brasil, 1999). Atua como instituição pública de referência para as questões envolvendo o controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços ligados à vigilância sanitária. O Instituto tem como propósito atuar positivamente para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023a). Além disso, presta assistência aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens) sobre metodologias analíticas, questões tecnológicas e analíticas (Santos, 2011).

O INCQS possui quatro departamentos, de acordo com sua área de conhecimento, sendo eles, Farmacologia e Toxicologia (DFT), Imunologia (DI), Microbiologia (DM) e Química (DQ), além da Central de Recebimento de Amostras e das áreas administrativas, gerenciais e educacionais (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023b). Em vista disso, sua estrutura possibilita a realização de atividades analíticas, de desenvolvimento tecnológico, cooperação técnica e ensino em saúde (Santos, 2011).

De acordo com o organograma do Instituto, o DM atua em demanda de oito Núcleos Técnicos, a saber: Saneantes, Medicamentos, Artigos de Diálise, Produtos Biológicos, Cosméticos, Alimentos, Saúde Ambiental e Artigos de Saúde (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023c). E para atender a essa demanda o DM possui um Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR), responsável pela manutenção, caracterização, identificação taxonômica, produção e fornecimento de microrganismos utilizados em pesquisas variadas e em ensaios de controle de qualidade preconizados pelas Farmacopeias, Compêndios Oficiais e pela literatura internacional, além de disponibilizar DNA (ácido desoxirribonucleico) genômico, depósito de linhagens e preservação de microrganismos (Fundação Oswaldo Cruz, 2020; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023d).

Uma das estratégias utilizadas pelo LMR para facilitar os trâmites envolvendo o fornecimento de cepas foi a criação de uma coleção de microrganismos nomeada Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS). Inicialmente a CMRVS era

composta por bactérias, arqueas e fungos. Posteriormente, ela foi dividida dando origem a três coleções, a saber: Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) e Coleção de Arqueas de Referência em Vigilância Sanitária (CARVS), sob responsabilidade do Setor de Bactérias e Arqueas (SBA); e a Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS), sob responsabilidade do Setor de Fungos (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023d). Atualmente, após nova reestruturação, a CBRVS foi alterada para Coleção de Bactérias Patogênicas (CBP), a CARVS alterada para Coleção de Culturas de Vigilância em Saúde Única (CCVSU) e a CFRVS para Coleção de Fungos do Ambiente e Saúde (CFAS).

### 1.3 Coleções biológicas

As coleções biológicas são centros de conservação *ex-situ* de organismos ou parte deles, ou seja, locais onde ocorre a preservação fora do seu ambiente natural. São responsáveis pela aquisição, preservação, identificação, catalogação e distribuição de organismos, contribuindo assim com a indústria biotecnológica e com o desenvolvimento científico, por subsidiar atividades de ensino, serviço, pesquisa, inovação e divulgação científica, servindo também como repositórios da biodiversidade, uma vez que guardam importantes informações sobre a fauna, flora e microbiota de uma determinada região. Dessa forma, possuem grande importância científica, econômica e educacional, sendo essencial mantê-las organizadas, identificadas, classificadas, documentadas e disponibilizadas para acesso, sempre que houver demanda (Fundação Oswaldo Cruz, 2020; Martins, 2018).

A preservação das coleções biológicas consiste na redução ao máximo da decomposição natural da matéria orgânica, de acordo com suas especificidades, ou seja, para cada tipo de material serão necessários procedimentos técnicos, conservantes e métodos de preservação próprios (Aranda, 2014; Sola *et al*, 2012). Tal processo visa garantir a sobrevivência do material biológico e manter suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas por períodos variáveis, com o menor grau de mutações e variabilidade, de forma a permitir identificar a procedência e a identificação taxonômica de cada uma das linhagens (Aranda, 2014; Sola *et al*, 2012; Sousa *et al.*, 2017).

A escolha do método de preservação e manutenção deve levar em consideração o tipo de agente, a realidade e importância da coleção a ser aplicado, como por exemplo, a estrutura física, recursos humanos disponíveis, recursos financeiros e principalmente devem ser analisadas as vantagens e desvantagens de cada técnica. Dessa forma, seja uma metodologia de

curto, médio ou longo prazo, ela deve ser simples e eficiente (Sola *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2017)

Dentre os métodos de preservação, as coleções biológicas frequentemente recorrem a técnica de liofilização. Essa técnica, também conhecida como “secagem por congelamento”, esse processo envolve três etapas: congelamento, desidratação primária e desidratação secundária. Durante esse procedimento, a água é removida de um material congelado sob vácuo, preservando integralmente sua estrutura celular e propriedades biológicas (Sola *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2017).

A etapa de congelamento rápido do material impede a formação de cristais de gelo, que, por sua vez, podem causar danos às estruturas celulares. Já a remoção da água por sublimação, um processo no qual a água passa diretamente do estado sólido para gasoso, reduz significativamente a taxa de deterioração. Este processo ocorre sob condições de vácuo, o que contribui para a preservação de estruturas celulares e, por conseguinte, aumenta a vida útil dos organismos, garantindo sua estabilidade a longo prazo (Sola *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2017).

Ao empregar a liofilização, as coleções biológicas conseguem preservar uma variedade de materiais biológicos, como microrganismos e tecidos biológicos, com exceção de algas e protozoários. Este método permite que esses organismos permaneçam viáveis e geneticamente estáveis por longos períodos, aproximadamente 17 a 20 anos (Sola *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2017).

Além da liofilização, outra técnica de conservação a longo prazo é a criopreservação. Esta técnica envolve o congelamento de amostras biológicas a temperaturas baixas (-20 a -80 °C em freezers) ou ultrabaixas (-150 a -196 °C em containers de nitrogênio líquido), junto da adição de crioprotetores responsáveis por proteger a estrutura celular, minimizando danos decorrentes da formação de cristais de gelo. Com a redução da temperatura a níveis tão baixos os processos metabólicos são retardados, garantindo a preservação das características genéticas e biológicas do material por períodos prolongados (Sola *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2017).

As coleções surgiram da necessidade por parte dos próprios pesquisadores de manter as amostras coletadas durante os estudos realizados. Ao longo do tempo, com a incorporação de diferentes linhagens por diferentes pesquisadores, os acervos biológicos aumentaram significativamente. Com isso, importantes centros de preservação atuam como referência na oferta de serviços envolvendo o fornecimento de cepas utilizadas no desenvolvimento científico e tecnológico, como por exemplo, ATCC (*American Type Culture Collection*), DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*), JCM (*Japan Collection of*

*Microorganisms*), BCCM (*Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms*), entre outras (Martins, 2018).

No Brasil, a Fiocruz, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), o Centro Brasileiro de Estocagem de Genes, a Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e o Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo são exemplos de instituições que possuem acervos biológicos (Martins, 2018)

Na Fiocruz as coleções começaram a ser formadas no início do século XX, resultado de depósitos realizados por pesquisadores da Instituição após jornadas científicas e ações de combate a surtos e doenças emergenciais. Desde então, foram desenvolvidas políticas institucionais como forma de melhorar a qualidade desses acervos e garantir sua segurança, acessibilidade, longevidade e integridade. Tendo como exemplos, o Manual de Organização das Coleções Biológicas da Fiocruz aprovado pela Portaria 327/2010-PR e a implantação de um sistema de gestão da qualidade, de acordo com a norma NBR ISO/IEC 17025 (Fundação Oswaldo Cruz, 2020; Silva; Chame; Moratelli, 2020).

A Fiocruz possui 35 coleções reconhecidas institucionalmente, separadas em cinco categorias diferentes: coleções microbiológicas, zoológicas, botânicas, histopatológicas e arque paleontológicas (Fundação Oswaldo Cruz, 2020; Silva; Chame; Moratelli, 2020). Elas estão organizadas em estruturas funcionais chamadas Curadorias, isto é, são mantidas sob responsabilidade de um curador, seja ele pesquisador ou tecnologista, devidamente habilitado para tal atividade, junto a um curador adjunto, com uma das funções supracitadas e vinculado a Instituição (Fundação Oswaldo Cruz, 2018).

#### **1.4 Coleção de Bactérias Patogênicas**

A CBP é uma das coleções da Fiocruz reconhecidas institucionalmente, isso significa que ela cumpre as quatro exigências presentes no Manual de Organização das Coleções Biológicas da Fiocruz, sendo elas: realizar atividades como preservação, depósitos, distribuição e identificação taxonômica de microrganismos, além de consultoria científica e treinamento; ter um curador; realizar registro de procedimentos e manutenção de documentação; e possuir pelo menos o mínimo de recursos humanos e infraestrutura (Fundação Oswaldo Cruz, 2018; Silva; Chame; Moratelli, 2020).

Como forma de manter e monitorar a qualidade deste acervo, são realizados ensaios microbiológicos de avaliação da pureza e viabilidade, caracterização morfológica e fenotípica, identificação por métodos convencionais, automatizados e moleculares, teste de sensibilidade

aos antimicrobianos (TSA) ou antibiograma, preservação por liofilização e criopreservação à -80 °C, entre outras (Fundação Oswaldo Cruz, 2023).

O extenso acervo da CBP compreende mais de 2000 linhagens, com diferentes gêneros e espécies de classe de risco 1, 2 e 3, apresentando uma ampla diversidade de características tanto fenotípicas quanto genotípicas. Tendo como alguns exemplos de microrganismos da coleção: *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp. como representantes da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* da família *Pseudomonadaceae*, *Yersinia* spp. da família *Yersiniaceae*, *Staphylococcus* spp. da família *Micrococcaceae* e *Bacillus* spp. da família *Bacillaceae*, entre outros (Fundação Oswaldo Cruz, 2023).

#### 1.4.1 *Enterobacter* spp.

O gênero *Enterobacter* corresponde a um grupo de bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, com presença de flagelos (Florio *et al.*, 2018; Ganbold *et al.*, 2023; Nurfajriah *et al.*, 2021). Também descritos como microrganismos não formadores de esporos, positivos para urease e fermentadores de lactose (Ramirez; Giron, 2023). Atualmente são conhecidas pelo menos 23 espécies desse gênero, entretanto nem todas com capacidade de causar danos à saúde humana (Parte *et al.*, 2020). Além disso, possuem resistência intrínseca a ampicilina e cefalosporina de primeira e segunda geração, sendo que, em alguns casos também são resistentes a terceira e quarta geração, aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos (Florio *et al.*, 2018).

#### 1.4.2 *Escherichia coli*

*E. coli* é uma espécie do gênero *Escherichia* comumente encontrada no trato intestinal dos seres humanos, assim como de alguns animais de forma inofensiva, onde possui importante papel fisiológico para o funcionamento do organismo. Entretanto, existem cepas desse grupo responsáveis por doenças intestinais e extraintestinais em humanos (Gomes *et al.*, 2016; Santoyo; Reyes; Rodríguez, 2020; Souza *et al.*, 2016).

Esta espécie é constituída por bactérias em forma de bastão, Gram-negativas, e são anaeróbias facultativas. Podem ser divididas em subgrupos, levando em consideração os diferentes tipos de toxinas ou características patogênicas. Esses subgrupos incluem *E. coli* comensal, *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* enterohemorrágica também conhecida como *E. coli*

produtora da toxina Shiga, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteropatogênica e *E. coli* enteroagregativa (Gomes *et al.*, 2016; Santoyo; Reyes; Rodríguez, 2020; Souza *et al.*, 2016).

#### 1.4.3 *Klebsiella* spp.

*Klebsiella* compreende um grupo de microrganismo encapsulados, anaeróbios facultativos, caracterizadas como Gram-negativas, oxidase-negativa e se apresentam morfológicamente como bastonetes (Dong *et al.*, 2022; Gomes; Casalini, 2018).

As espécies do gênero *Klebsiella* são consideradas patógenos oportunistas, normalmente colonizadores da microbiota nasal e faríngea, pele e trato intestinal de indivíduos saudáveis, também podem ser encontradas no solo, água e vegetação. Entretanto, embora algumas espécies deste gênero sejam parte normal da microbiota humana, algumas cepas podem causar infecções em seres humanos, especialmente em ambientes hospitalares, tais como pneumonia, infecções do trato urinário, infecções sanguíneas e infecções em feridas cirúrgicas. Além disso, sua virulência está frequentemente associada a fatores como produção de cápsula, fímbrias e de enzimas que podem contribuir para a resistência a antibióticos (Dong *et al.*, 2022; Gomes; Casalini, 2018).

#### 1.4.4 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* integra a família *Enterobacteriaceae*. São microrganismos anaeróbios facultativos, com estrutura morfológica de bacilos, classificados como Gram-negativos, não formadores de esporos, geralmente apresentam flagelos (Akter; Shamimuzzaman, 2023; Lustosa *et al.*, 2021). Além disso, são fermentadores de glicose e outros açúcares, capazes de descarboxilar aminoácidos, como a lisina. São causadores de importantes doenças, como a febre tifóide pela *Salmonella typhi*, febres entéricas pela *Salmonella paratyphi* e as enterocolites pelas demais espécies do gênero em questão (Lustosa *et al.*, 2021).

*Salmonella* spp. compreende pelo menos 2579 sorogrupos diferentes. Entretanto, ainda tem sido difícil chegar a um acordo na quantidade de espécies e subespécies pertencentes a este gênero. Este grupo foi dividido em três espécies: *S. bongori*, *S. subterranea* e *S. enterica*. Posteriormente, seis novas subespécies surgiram da *S. enterica*, representadas por algarismos romanos, sendo elas: enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) e indica (VI) (Lamas *et al.*, 2018, Parte *et al.*, 2020).

#### 1.4.5 *Yersinia* spp.

*Yersinia* spp. refere-se a um grupo de bactérias Gram-negativas que pertencem à família *Yersiniaceae*. Este grupo de bactérias abrange pelo menos 26 espécies e duas subespécies (GUERN *et al.*, 2020; PARTE *et al.*, 2020). Suas características morfológicas podem variar de acordo com a temperatura e tempo do cultivo, isto é, em culturas recentes (24 horas) a 25 °C prevalecem a forma cocóide com presença de flagelos peritríquios, enquanto em culturas envelhecidas a 37 °C os bacilos possuem uma tendência a apresentar pleomorfismo e são imóveis (Falcão; Falcão, 2006; Martin *et al.*, 2009; Silva; Silveira; Timm, 2020).

Embora a temperatura ótima de crescimento ocorra entre 25 a 28 °C, estes microrganismos podem se multiplicar em temperaturas variando entre 0 e 44 °C. Além disso, são classificados como anaeróbios facultativos e possuem vias de metabolismo intermediário (Falcão; Falcão, 2006; Martin *et al.*, 2009).

#### 1.4.6 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* é uma espécie de bactéria patogênica oportunista que compõe a família *Pseudomonadaceae*. É classificada como Gram-negativa, com morfologia bacilar, aeróbia, móvel, não fermentadora de glicose e não formadora de esporos, sendo responsável por uma variedade de doenças e manifestações clínicas (Azam; Khan, 2019; Figueredo *et al.*, 2021). Este gênero se difere da *Enterobacteriaceae* pela presença do citocromo C oxidase, sendo possível confirmar por meio do teste de oxidase. Além disso, algumas possuem a capacidade de produzirem pigmentos difusíveis da cor azul, azul-esverdeado, vermelho-marrom ou amarelo (Lazaretti *et al.*, 2022).

Uma outra característica importante desse grupo é a sua capacidade em desenvolver biofilmes e resistência à maioria dos antimicrobianos de uso clínico (Azam; Khan, 2019; Figueredo *et al.*, 2021).

#### 1.4.7 *Staphylococcus* spp.

*Staphylococcus* spp. compreende um grupo de bactérias Gram-positivas pertencentes à família *Micrococcaceae*. Estes microrganismos são anaeróbios facultativos, catalase positivos, imóveis, com estrutura morfológica denominada cocos. Além disso, crescem em temperaturas

entre 7 e 47,8 °C e podem produzir enterotoxinas termo resistentes (10 a 46 °C) (Aguiar *et al.*, 2021; Cotaquispe *et al.*, 2021).

Este gênero possui ao menos 66 espécies e pode ser dividido em dois grupos: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa, tendo como exemplos, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus hominis*, entre outros, além de mais 10 subespécies (Aguiar *et al.*, 2021; Parte *et al.*, 2020).

#### 1.4.8 *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* se refere a um grupo de bactérias da família *Bacillaceae*, Gram-positivas, em forma de bastonetes, aeróbias facultativas, móveis e com a capacidade de formarem esporos esféricos na presença de oxigênio. Estes esporos são estruturas que conferem a esse microrganismo resistência ao calor, a radiação ultravioleta, a dessecação, a valores de pH altos ou baixos, a produtos químicos tóxicos e outras tensões ambientais desafiadoras. Dentre as espécies desse gênero destacam-se o *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis* por estarem relacionados com surtos de enfermidades transmissíveis por alimentos (Silva *et al.*, 2018).

### 1.5 Identificação bacteriana

A identificação de bactérias consiste na caracterização do microrganismo por meio de técnicas, sejam elas convencionais, automatizadas ou moleculares, que utilizam uma série de testes, possibilitando realizar sua classificação taxonômica, bem como identificar suas características genéticas e habilidades bioquímicas (Franco-Duarte *et al.*, 2019). Essa identificação, assim como a determinação de sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos é crucial para a tomada de decisões, principalmente em casos clínicos, pois a partir de um diagnóstico rápido e preciso, é possível direcionar adequadamente a antibioticoterapia para o controle da infecção (Perantoni; Queiroz-Fernandes, 2019).

Diferentes metodologias podem ser empregadas na identificação de microrganismos, podendo ser classificadas em métodos convencionais, o que permite uma caracterização fenotípica, baseada nas suas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas; e métodos moleculares, incluindo métodos de amplificação (PCR, qPCR e rt-PCR), sequenciamento do genoma parcial ou completo, entre outros, permitindo a caracterização genotípica. Ambas as abordagens possuem vantagens e limitações que devem ser consideradas com base nas



circunstâncias locais, nas características dos microrganismos em questão e nos requisitos específicos do estudo ou diagnóstico em questão (Ferone *et al.*, 2020; Franco-Duarte *et al.*, 2019).

### 1.5.1 Caracterização fenotípica

#### 1.5.1.1 *Cultivo bacteriano*

O cultivo do microrganismo em um meio de cultura adequado é um método básico na microbiologia, utilizado no início de uma identificação e tem o objetivo obter colônias puras e isoladas para posteriormente identificá-lo. A partir dessa técnica é possível realizar uma análise macroscópica das colônias, assim como observar seu comportamento no meio de cultura e posteriormente analisar suas características microscópicas (Perantoni; Queiroz-Fernandes, 2019).

#### 1.5.1.2 *Microscopia*

O microscópio é um dos principais equipamentos largamente utilizados para análise e diferenciação da estrutura morfológica, tamanho e arranjo dos microrganismos (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

A microscopia ótica embora fundamental, possui como limitação a incapacidade de identificar o microrganismo, sendo assim, quando utilizada separadamente de outras técnicas funciona como uma ferramenta complementar (Franco-Duarte *et al.*, 2019). Além disso, este tipo de técnica requer uma preparação prévia da amostra, de forma a possibilitar sua visualização e uma das formas pelas quais isso pode ser feita é através da coloração (Tortora; Funke; Case, 2012; Oplustil *et al.*, 2020).

Na microbiologia, dentre as técnicas de coloração existentes, a coloração de Gram é a que permite classificar as bactérias em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. Esta coloração foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram e se baseia nas características estruturais da parede celular (Oplustil *et al.*, 2020; Tortora; Funke; Case, 2012).

Bactérias com a presença de uma camada espessa de peptidoglicano passaram a ser classificadas como Gram-positiva, pela capacidade de reterem o corante violeta, enquanto as bactérias com uma camada fina desses dissacarídeos e aminoácidos passaram a ser classificadas

como Gram-negativas pela capacidade de reterem o corante safranina ou fucsina. Além disso, as bactérias Gram-negativas possuem em sua parede celular uma camada de lipopolissacarídeos (combinação de lipídios e polissacarídeos), fundamental para sua estrutura, patogenicidade e interações com o sistema imunológico hospedeiro (Oplustil *et al.*, 2020; Tortora; Funke; Case, 2012).

Existem outras técnicas de microscopia, como a microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal e microscopia de força atômica, que proporcionam a observação das estruturas celulares com maior riqueza de detalhes. Entretanto, nenhuma delas revela a diversidade filogenética dos microrganismos (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

#### 1.5.1.3 Métodos bioquímicos

A utilização de provas bioquímicas para identificação de microrganismos em diferentes amostras se baseia em suas características metabólicas e/ou enzimáticas. Elas permitem identificar a bactéria, entretanto, algumas vezes se faz necessário a utilização de testes complementares para confirmação (Perantoni; Queiroz-Fernandes, 2019).

Nos métodos bioquímicos ou convencionais são utilizadas soluções, reagentes e vários meios de cultura com substratos capazes de interagir com determinados fenótipos e produzir respostas que podem ser identificadas por meio da alteração da cor, aglutinação, turvação e presença de gás. Alguns exemplos são, catalase e oxidase, metabolismo de carboidratos, proteínas e aminoácidos, como a produção de indol e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), digestão de gelatina e caseína, descarboxilação de lisina, ornitina, arginina dihidrolase, fenilalanina desaminase e urease, entre outras (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

Com o progresso do conhecimento em bioquímica e o advento de novas tecnologias, houve o desenvolvimento de métodos bioquímicos mais modernos, semi-automatizados, como o VITEK<sup>®</sup> (bioMérieux, Saint Louis, EUA) e MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight / Mass Spectrometry), entre outros. Esses métodos apresentam certas vantagens em comparação com os métodos convencionais, como tempo de análise reduzido e a capacidade de identificar simultaneamente múltiplos microrganismos (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

#### 1.5.1.4 VITEK<sup>®</sup> 2

O VITEK® 2 é um equipamento semi-automatizado utilizado em laboratórios de microbiologia na identificação de microrganismos e na determinação de sensibilidade aos antimicrobianos em poucas horas. É capaz de realizar até 60 análises ao mesmo tempo, de acordo com o modelo utilizado (Biomérieux, 2023a, Franco-Duarte *et al.*, 2019; Hata *et al.*, 2007; Pincus, 2013). Além desse modelo, ainda existem outros formatos que divergem entre si pela capacidade de análises simultâneas, como por exemplo o VITEK® 2 compact (15, 30 ou 60 cartões) e o VITEK® 2 XL (120 cartões) (Biomérieux, 2023a; Biomérieux, 2023b; Pincus, 2013).

O equipamento conta com uma câmara de enchimento de cartões por vácuo, uma zona de selagem dos cartões, uma zona de incubação e leitura automática (Delgado, 2020). A identificação do microrganismo ocorre por meio de um sistema óptico de transmitância capaz de ler, interpretar e comparar com um banco de dados as reações bioquímicas miniaturizadas contidas em cartões descartáveis de reagentes colorimétricos específicos, utilizando diferentes comprimentos de onda no espectro visível (Franco-Duarte *et al.*, 2019; Hata *et al.*, 2007; Pincus, 2013).

Após a inoculação com uma suspensão padronizada do microrganismo desconhecido, os dados gerados na análise adquirem um valor (bionúmero) que é utilizado em um cálculo de probabilidade numérica. Este cálculo é capaz de aproximar ou distanciar a identificação dos táxons do banco de dados, permitindo determinar se são suficientemente únicos ou próximos de múltiplos, sendo necessário neste último caso supracitado, a realização de testes complementares recomendados pelo sistema (Franco-Duarte *et al.*, 2019; Pincus, 2013).

#### *1.5.1.5 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos*

O sistema óptico do VITEK® 2 é capaz de detectar alterações no crescimento bacteriano e produzir resultados do perfil de resistência aos antimicrobianos, do microrganismo testado, em períodos mais curtos do que as leituras manuais (Maurer *et al.*, 2017). Para isso, são utilizados cartões AST (Antimicrobial Susceptibility Testing) com diferentes concentrações do antimicrobiano em minipoços, além do controle positivo sem o antibiótico, apenas com um caldo de crescimento (Biomérieux, 2023c).

A detecção de turvação pelo equipamento no poço do controle positivo em um nível mínimo predeterminado indica o crescimento satisfatório do microrganismo para iniciar a análise nos demais poços do cartão. A partir disso, são realizadas leituras a cada 15 minutos, que medem e comparam os crescimentos de todos os reservatórios, inclusive do controle

positivo, até o final da análise para detecção da concentração mínima inibitória (CMI) (Biomérieux, 2023c).

A interpretação dos resultados para determinação da CMI ocorre por meio do software Advanced Expert System™, que tem como base os parâmetros estabelecidos pelo Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST), versão brasileira do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e por dados internos e fenótipos das linhagens (Delgado, 2020; Monteiro *et al.*, 2021).

Uma das abordagens utilizadas para a classificação da multirresistência de bactérias como *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae* (exceto *Salmonella* e *Shigella*) aos antimicrobianos se dá por meio da quantidade de agentes não suscetíveis e de categorias (classes e subclasses). Com isso, um microrganismo pode ser classificado como MDR (*multidrug-resistant*) quando apresenta resistência de três a cinco agentes antimicrobianos, XDR (*extensively drug-resistant*) quando a resistência inclui mais de cinco agentes antimicrobiano e PDR (*pandrug-resistant*) com resistência a todos agentes antimicrobianos de todas as categorias (Magiorakos *et al.*, 2012).

#### 1.5.1.6 Maldi-Tof MS

Outro método de identificação de microrganismos, análise e detecção de pequenas e grandes moléculas (por exemplo, polímeros, proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos, lipídios etc.) e diagnóstico de diversas doenças, utilizado em laboratórios de pesquisa, hospitais e indústrias farmacêuticas, é o MALDI-TOF MS (Elbehiry *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; Oviaño; Rodríguez-Sánchez, 2021).

A técnica MALDI-TOF MS se baseia no padrão proteico único apresentado por cada espécie microbiana, por meio da ionização e dessorção de moléculas de interesse através da interação de um laser com uma matriz orgânica, geralmente ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. Essa matriz, por sua vez, é um composto químico capaz de absorver a energia do laser e transferi-la para a amostra, promovendo a vaporização e ionização das moléculas sem causar sua fragmentação. Posteriormente, os íons formados são direcionados por um campo elétrico em direção a um detector de ionização, onde sua massa é determinada com base no tempo de percurso até serem detectados (Elbehiry *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; Oviaño; Rodríguez-Sánchez, 2021).

## 1.5.2 Caracterização genotípica

### 1.5.2.1 Sequenciamento parcial do gene 16S RNAr

Com o desenvolvimento da biologia molecular, em especial da reação em cadeia da polimerase (PCR), uma alternativa para a classificação taxonômica e filogenética das bactérias ocorre por meio da sua identificação pelo sequenciamento de alvos específicos, como por exemplo, do gene 16S RNA ribossomal (RNAr) (Alves, 2020; Fida *et al.*, 2021).

O gene 16S se refere a uma macromolécula encontrada na subunidade 30S dos ribossomos, comum a todas as bactérias. Este gene possui nove regiões conservadas, utilizadas para o desenho dos primers e nove regiões variáveis (V1 a V9), utilizadas na associação entre os parentescos filogenéticos entre as populações bacterianas, possibilitando a identificação à nível de gêneros e espécies (Alves, 2020; Fida *et al.*, 2021). Isto inclui aqueles microrganismos que são difíceis de cultivar, como anaeróbios, micobactérias e microrganismos não cultiváveis, ou seja, bactérias que não puderam ser cultivadas usando os métodos convencionais de cultura em laboratório (Fida *et al.*, 2021; Woo *et al.*, 2008).

A metodologia por trás do sequenciamento inclui etapas de extração de DNA, amplificação por PCR, purificação dos produtos da PCR, análise dos produtos por eletroforese em gel, quantificação, o sequenciamento de DNA propriamente dito e edição de sequência (Woo *et al.*, 2008).

## 1.6 Justificativa

A relevância do presente estudo reside na importância das coleções biológicas. Os benefícios desses acervos extrapolam a mera disponibilização de recursos biológicos para a comunidade científica, contribuindo significativamente em diferentes áreas, incluindo pesquisa científica, desenvolvimento e inovação tecnológica. Além disso, essas coleções desempenham um importante papel ao proporcionar amplo acesso a dados e informações sobre a biodiversidade do país (Santos *et al.*, 2018).

Após a reestruturação da coleção de bactérias do INCQS, que substituiu a CBRVS pela CBP, o foco principal desse acervo foi direcionado para as cepas de pesquisa provenientes de depósitos, em detrimento das cepas de referência. Assim, tornou-se necessário submeter este acervo a testes microbiológicos pré e pós-produção, visando garantir o fornecimento de linhagens puras, viáveis e autenticadas, com o máximo de informações possíveis. Ademais,

buscou-se a reposição por meio da produção de todos os lotes de cepas testadas no decorrer deste estudo.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar a conformidade de uma parte do acervo de pesquisa da CBP do INCQS através de ensaios microbiológicos como uma forma de controle interno da qualidade e realizar a reposição dos lotes analisados.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1) Identificar as cepas da CBP mais solicitadas para fornecimento e com menos de 10 ampolas de estoque;
- 2) Verificar a pureza das cepas selecionadas;
- 3) Produzir novos lotes a partir de lotes pré-existentes;
- 4) Verificar a viabilidade dos lotes produzidos;
- 5) Realizar a autenticação das cepas pelo VITEK<sup>®</sup> 2;
- 6) Realizar o sequenciamento do gene 16S RNAr e MALDI-TOF MS das cepas não identificadas pelo VITEK<sup>®</sup> ao nível de espécie;
- 7) Comparar os resultados dos métodos de identificação utilizados;
- 8) Definir o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas.

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Amostra**

Foram selecionadas 100 cepas pertencentes ao acervo de pesquisa da CBP depositadas entre o período de 1989 e 2016, correspondendo a aproximadamente 5% de toda a coleção de pesquisa. O critério de escolha foi realizado de acordo com as solicitações de outras instituições, via protocolos e, dentre essas, foram escolhidas aquelas com estoques mais críticos. Sendo assim, as cepas mais solicitadas e com estoque inferior a 10 ampolas foram selecionadas para serem submetidas aos ensaios de pureza, viabilidade, autenticação e TSA. A listagem das cepas analisadas está descrita no Apêndice A.

O estudo foi dividido em três etapas principais: (1) controle pré-produção com ensaios de pureza, análise microscópica e identificação utilizando o sistema VITEK<sup>®</sup> 2; (2) produção de novos lotes e preservação por liofilização; (3) e controle pós-produção, com ensaios de pureza, análise microscópica, autenticação, acrescido da viabilidade e antibiograma. Incluindo, quando necessário, a identificação por MALDI-TOF, por método molecular e por métodos convencionais, para posterior catalogação das cepas para fornecimento.

### **3.2 Controle Pré-produção**

#### **3.2.1 Reidratação do Liófilo**

Para abertura da ampola e reconstituição do liófilo, foi utilizado gaze embebida em álcool 70% para desinfecção da ampola. Após secagem do álcool, a ampola foi aquecida na parte superior com chama do bico de Bunsen e, seguindo as orientações contidas no Procedimento Operacional Padrão (POP) do SBA, número 65.3230.045, revisão 05, e na seção 4.3 do manual 3 (Teste de viabilidade e pureza da produção de bactérias de referência), foi aplicada solução salina estéril na região aquecida, facilitando seu rompimento (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023e).

A hidratação e cultivo foram realizados em meios de cultura adequados para cada microrganismo, tendo como referência os meios de culturas e condições de incubação recomendados no site da ATCC.



### 3.2.2 Pureza

Após a reidratação do líofilo com 0,5 mL de meio líquido, foi realizada a avaliação da pureza. Para isso, foi realizado cultivo preferencialmente em ágar sangue ou em ágar TSA, pela técnica de esgotamento para obtenção de colônias isoladas. Após o período de incubação, a  $36,5 \pm 1,5$  °C por até 72 horas, foram analisadas as características macroscópicas das colônias para confirmação do crescimento de colônia pura com características inerentes ao gênero ou espécie, de acordo com as instruções presentes no POP 65.3230.045.

### 3.2.3 Análise microscópica

Após o período de incubação de cada cepa analisada foi realizada coloração de Gram e microscopia para confirmação das características morfológicas dos microrganismos, seguindo as instruções do POP 65.3230.047, revisão 04 e seção do manual 4.3 (Bactérias - Caracterização) (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023f).

### 3.2.4 Identificação pelo VITEK<sup>®</sup> 2

Partindo de um cultivo recente (em torno de 24 horas ou de acordo com o período de crescimento da bactéria), após visualização microscópica da colônia foi possível selecionar os cartões de identificação de acordo com as características morfológicas observadas.

Posteriormente, foi necessária a preparação de uma suspensão bacteriana com turvação específica (tabela 1), realizada diretamente da colônia, seguindo as orientações do fabricante do equipamento e que também estão presentes no POP do SBA, número 65.3230.047 (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023f).

Tabela 1 – Intervalo aceitável da suspensão bacteriana a ser identificada pelo VITEK<sup>®</sup> 2

Cartão	Limite Mínimo	Limite Máximo
BCL	1,80 McFarland	2,20 McFarland
GP	0,50 McFarland	0,63 McFarland
GN	0,50 McFarland	0,63 McFarland

BCL – Cartão de identificação de bacilos Gram-positivos; GP – Cartão de identificação de cocos Gram-positivos; GN – Cartão de identificação de bacilos Gram-negativos.  
Fonte: Manual VITEK<sup>®</sup> 2.

### 3.3 Produção

#### 3.3.1 Produção de lotes de ampolas

A etapa seguinte aos ensaios pré-produção foi a reposição de estoque por meio da produção de novos lotes. Com isso, para cada cepa analisada e com resultados satisfatórios foi realizado o plaqueamento em meios de cultura adequados com o auxílio de uma alça de Drigalski, e após o período de incubação foi preparada uma suspensão bacteriana a partir do crescimento bacteriano com solução “Skim milk” a 10%. Aproximadamente 0,5 mL dessa suspensão foi distribuída em ampolas e submetida ao congelamento rápido até o momento da liofilização, de acordo com o POP do SBA número 65.3230.001, revisão 08 e seção do manual 4.3 (Produção e preservação de bactérias da coleção de bactérias patogênicas pelo método de liofilização) (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2022).

#### 3.3.2 Preservação por liofilização

No mínimo 24 horas após a produção, armazenadas no ultrafreezer a  $-75 \pm 10$  °C, as ampolas com a suspensão bacteriana foram submetidas ao processo de preservação a longo prazo por liofilização, com auxílio do liofilizador Edwards, de acordo com o manual do equipamento e em conformidade com as instruções do Procedimento de Uso (PU) do SBA, número 3230.007, revisão 06 e seção do manual 4.3 (Utilização de liofilizador edwards lk4r na produção de lotes de microrganismos) (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2020).

#### 3.3.3 Teste de vácuo

Após o fechamento de todas as ampolas com maçarico de chama dupla, a verificação da presença de vácuo foi realizada individualmente com o auxílio de uma pistola elétrica conforme PU do SBA, número 3230.014, revisão 04 e seção do manual 4.3 (Pistola para teste de vácuo em ampolas pós-produção de lote de microrganismo). A confirmação da presença de vácuo ocorre com a visualização de luz violeta dentro da ampola durante a descarga elétrica, enquanto a ausência de vácuo é indicada pela ausência de cor (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2021).

Todas as ampolas que não apresentaram vácuo foram separadas das demais e descartadas.

### 3.4 Controle pós-produção

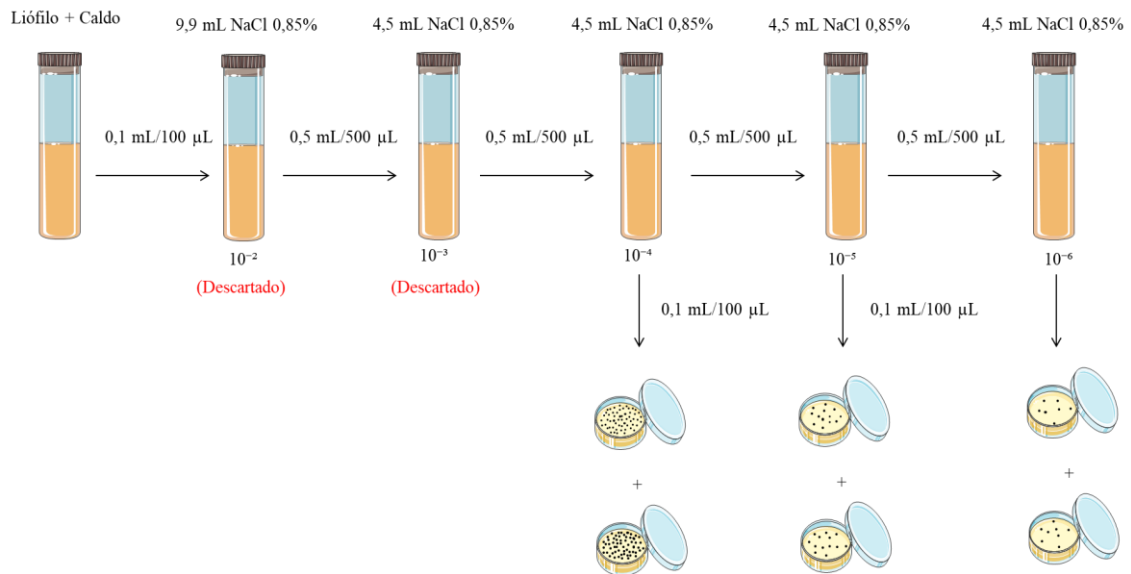
Uma vez concluída a liofilização e o selamento, após a confirmação do vácuo nas ampolas, cada novo lote foi submetido aos ensaios pós-produção, incluindo os ensaios de pureza, análise microscópica e autenticação, conforme já descrito no item 3.1 (Controle pré-produção).

#### 3.4.1 Viabilidade

O ensaio de viabilidade consiste na realização de diluições seriadas de base 10 até a diluição  $10^{-6}$ , partindo do líofilo hidratado, de acordo com as instruções do POP 65.3230.045. Foram transferidas, em duplicatas, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  dos tubos de diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para placas contendo meios de cultura apropriados para o crescimento bacteriano (figura 1). As placas foram semeadas utilizando o método *Spread Plate* e incubadas nas condições de tempo e temperatura de acordo com a bactéria em questão (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023e).

Após o período de incubação, para verificação da viabilidade foram selecionadas as placas contendo, preferencialmente, entre 30 e 300 UFC para posterior realização do cálculo (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023e).

Figura 1 - Esquema do método de viabilidade



Fonte: O autor (2023).

Para determinação do número de UFC por mL, a média do número de colônias presentes nas duas placas selecionadas é multiplicada pelo fator de diluição ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ou  $10^{-6}$ ), e o valor obtido é então dividido pela quantidade de líquido transferido da amostra para a placa de Petri (100 µL).

### 3.4.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Para definição do perfil de resistência aos antimicrobianos foram selecionadas 78 cepas de pesquisa da CBP cujo parâmetros e critérios encontram-se padronizados pelo pelo Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST/2022). Dessa forma, apenas cepas do gênero *Bacillus* e *Yersinia* não foram submetidas a este ensaio.

Assim como na identificação pelo método VITEK<sup>®</sup> 2, após visualização microscópica das características morfológicas da cepa foi possível escolher o cartão de suscetibilidade aos antimicrobianos. Posteriormente, foi necessária a preparação de duas suspensões bacterianas, realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A primeira preparada diretamente da colônia, com turvação específica (tabela 1) e a segunda preparada a partir de uma alíquota com volume pré-definido (tabela 2), retirada da primeira suspensão, utilizada para definição do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Tabela 2 - Aliquota para segunda suspensão bacteriana para determinação do perfil de resistência

Cartão	Aliquota
AST-P	145 mL
AST-N	280 mL

AST-P – Cartão de sensibilidade de Gram-positivos; AST-N – Cartão de sensibilidade de Gram-negativos.

Fonte: Manual VITEK® 2.

Quadro 1 - Listagem dos antimicrobianos testados de acordo com as características morfotintoriais da cepa

Gram-negativo	Concentração (µg/mL)	Gram-positivo	Concentração (µg/mL)
Ampicilina (AMP)	8 a 64	Benzilpenicilina (PEN)	0,125 a 1
Amicacina (AMI)	2 a 48	Clindamicina (CLI)	0,06 a 1
Ampicilina/Subactam (APS)	4/2 a 32/16	Daptomicina (DAP)	0,5 a 16
Aztreonan (ATM)	2 a 32	Eritromicina (ERI)	0,25 a 2
Cefepima (CPM)	0,25 a 32	Gentamicina (GEN)	8 a 64
Cefoxitina (CFO)	8 a 32	Levofloxacina (LEV)	1 a 16
Ceftazidima (CAZ)	0,25 a 32	Linezolida (LNZ)	0,5 a 2
Ceftazidima/Avibactam (CZA)	0,06/4 a 8/4	Nitrofurantoína (NIT)	16 a 64
Ceftolozane/Tazobactam (C/T)	0,5/4 a 32/4	Oxacilina (OXA)	0,5 a 2
Ceftriaxona (CRO)	0,12 a 16	Rifampicina (RIF)	0,015 a 0,5
Cefuroxima (CXM)	2 a 32	Teicoplanina (TEC)	0,5 a 32
Cefuroxima Axetil (CXA)	2 a 32	Tigeciclina (TIG)	0,25 a 1
Ciprofloxacina (CIP)	0,06 a 1	Trimetoprim/Sulfametoxazol (SUT)	8/152 a 32/608
Colistina (COL)	4 a 32	Vancomicina (VAN)	1 a 16
Ertapenem (ERT)	0,03 a 2		
Gentamicina (GEN)	4 a 32		
Imipenem (IPM)	1 a 12		
Meropenem (MPM)	0,5 a 12		
Piperacilina/Tazobactam (PIT)	2/4 a 48/8		
Tigeciclina (TIG)	1,5 a 8		

Fonte: Adaptado da bula dos cartões do Vitek® 2 (2020).

### 3.4.3 Identificação molecular

Foram selecionadas 24 cepas da coleção cujo resultado pelo método VITEK® 2 apresentou mais de uma espécie, para serem submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S RNAr.

#### 3.4.3.1 Extração do DN

A extração do DNA das cepas analisadas foi realizada após o cultivo em meio de cultura adequado, de acordo com as instruções do fabricante presentes no kit *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook* (Qiagen, Califônia, EUA).

### 3.4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase

A amplificação do DNA extraído foi realizada por meio da PCR. Os primers utilizados na reação foram desenhados com base nas regiões V1 e V2 do gene 16S RNAr, demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 - Primers utilizados na amplificação pela PCR

Orientação	Sequência	Bases	Referência
Forward	5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGA-3'	~350	(WANG <i>et al.</i> , 2007)
Reverse	5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'	pares	

Fonte: Adaptado de WANG *et al.* (2007).

Utilizando um termociclador PTC 200 (MJ Research, Watertown, EUA), o ciclo de amplificação inicial submeteu a amostra por 3 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 35 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 1 minuto a 72 °C e extensão final de 10 minutos a 72 °C.

A visualização dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%. Após a corrida eletroforética foi possível visualizar o fragmento de DNA com o auxílio do sistema de documentação do L-PIX – Loccus Biotecnologia (Loccus, Cotia, SP), sob luz ultravioleta.

Os produtos obtidos foram purificados com um kit de purificação *PureLink™* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), de acordo com as especificações do fabricante. Após a purificação, a avaliação da quantidade de DNA na amostra foi realizada utilizando-se o equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

### 3.4.3.3 Sequenciamento parcial do gene 16S RNAr

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye® Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher), seguindo suas instruções, também contidas no POP do SBA número 65.3230.073, revisão 00 e seção do manual 4.3 (Caracterização molecular na coleção de bactérias patogênicas) (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023g).

O primeiro ciclo da reação de sequenciamento iniciou com um ciclo de 1 minuto a 96°C, seguido de outros 40 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60°C, permanecendo ao final a 4 °C até sua finalização manual (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023g).

Após a etapa supracitada foi realizada uma precipitação da amostra com isopropanol 75% e etanol 75% com o objetivo de impedir que ddNTPs (didesoxinucleotídeos) livres no meio interferissem na leitura da sequência de DNA no SeqStudio (Thermo Fisher) (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023g).

A última etapa antes das amostras serem encaminhadas para o SeqStudio (Thermo Fisher), foi a desnaturação da reação de sequenciamento por meio da adição de *Hi-Ti™ Formamide* (Thermo Fisher), seguido de um ciclo no termociclador de 3 minutos a 95°C, sob o abrigo da luz e uma imersão no gelo por 5 minutos (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023g).

Posteriormente, a placa foi submetida a uma rotação de 600 rpm (rotações por minuto) por 10 segundos e encaminhada para eletroforese capilar no SeqStudio (Thermo Fisher) (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2023g).

Os cromatogramas gerados das fitas *Forward* e *Reverse* pelo sequenciador capilar foram analisados e alinhados com o auxílio dos programas *Chromas Lite* e *Sequencher*, gerando uma sequência consenso (contig) para cada cepa analisada. Após a construção desta região, as sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos contra os bancos de dados de nucleotídeos do *GenBank* (National Center for Biotechnology Information – NCBI), utilizando a ferramenta online BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e EzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>) (Yoon, *et al.*, 2017).

Somente resultados recuperados com sequenciamento parcial do gene 16S RNAr, cuja porcentagem de identificação foi igual ou superior a 96%, foram considerados válidos e somente aquelas espécies cujo percentual de identificação foi igual ou superior a 98,7% foram consideradas identificadas. Em casos nos quais diferentes espécies pertencentes ao mesmo gênero foram identificadas com a mesma porcentagem, a identificação foi considerada a nível de gênero e as cepas encaminhadas para análise pelo MALDI-TOF. Já quando diferentes espécies de gêneros distintos foram detectadas, a identificação foi considerada inconclusiva (Costa *et al.*, 2022a).

#### 3.4.4 Maldi-Tof MS

Para identificação pelo MALDI-TOF MS foram selecionadas nove cepas do gênero *Bacillus* que foram plaqueadas e cultivadas em meios de cultura específicos e encaminhadas

para o Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Goés, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), para verificação do espectro de massa e identificação bacteriana.

As amostras foram identificadas por MALDI-TOF – microflex LT. O processamento dos espectros das proteínas entre 2 e 20 kDa foi obtido através de software flexControl versão 3.4 (Bruker Daltonics, EUA) e comparado com os espectros presentes nas bibliotecas MBT BDAL 12.0, MBT Mycobacteria Library 7.0 e MBT Filamentous Fungi Library 5.0 do software MBT Compass versão 4.1 (Bruker Daltonics).

De acordo com as instruções do fabricante (Bruker Daltonics, EUA), os resultados podem variar de acordo com a confiabilidade, determinada pela faixa de identificação, com valores de 2.00 a 3.00 indicando uma identificação altamente confiável (cor verde ou +++), 1.70 a 1.99 para uma confiabilidade mais baixa (cor amarela ou +), e de 0.00 a 1.69 indicando organismos impossíveis (cor vermelha ou -).

Além disso, os resultados também puderam variar em relação à consistência. Este parâmetro é determinado pela concordância entre os resultados obtidos de cada amostra, realizados em duplicata, tanto para primeira melhor coincidência quanto para a segunda. Quando tanto a primeira quanto a segunda melhor consistência indicam a mesma espécie, o resultado é classificado como "A". Se o gênero permanece o mesmo, mas a espécie difere entre os resultados, a consistência é classificada como nível "B". Entretanto, quando ocorre uma mudança no gênero entre as duplicatas da primeira ou segunda melhor consistência, o resultado é classificado como nível "C".

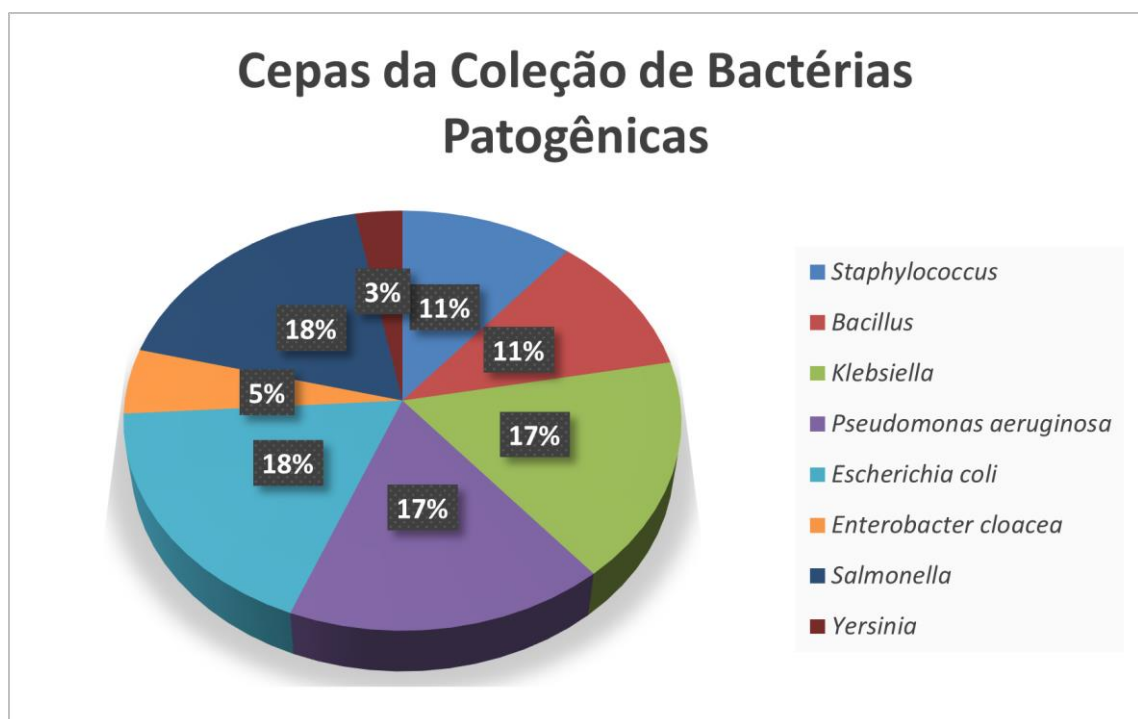


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Seleção das cepas

Após relatório fornecido pela curadoria da CBP, dentre todas as cepas da coleção, foram selecionadas 100 cepas que variaram entre os gêneros: *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* e *Yersinia*, conforme Gráfico 1.

Gráfico 1 - Cepas do acervo de pesquisa da CBP submetidas aos ensaios microbiológicos



Fonte: O autor (2023).

### 4.2 Pureza

Foram reidratadas 116 ampolas de bactérias liofilizadas, em meios de cultivo apropriados, totalizando 100 cepas do acervo da CBP. Dessas, 84 cepas apresentaram crescimento puro e compatível com a identificação na listagem da CBP, quatro apresentaram crescimento de mais de um microrganismo (contaminação), duas cepas apresentaram crescimento puro, no entanto, com características não compatíveis com a identificação listagem da CBP e 10 cepas não cresceram no primeiro cultivo, após a reidratação da ampola.

As duas cepas com características morfológicas e tintoriais não compatíveis com a identificação registrada na coleção foram testadas pelo menos mais uma vez. Em ambos os

casos, os resultados confirmaram a incompatibilidade e as cepas foram consideradas insatisfatórias, sendo descartadas da coleção.

As ampolas cujo crescimento bacteriano em placa apresentaram indícios de contaminação, foram confirmadas após análise microscópica e testes bioquímicos adicionais, como por exemplo, catalase, coagulase, citrato, fermentação de carboidratos (glicose, sacarose e lactose), produção de gás, indol, motilidade e produção de H<sub>2</sub>S. Pois, em todos estes casos foi possível isolar e identificar a colônia referente a identificação na coleção.

Por fim, dentre as cepas que inicialmente não apresentaram crescimento, nove delas foram recuperadas e cresceram de forma satisfatória na segunda tentativa, com exceção de apenas uma, excluída da coleção.

Assim, dentre as 100 cepas analisadas, 97 apresentaram resultados satisfatórios no ensaio de pureza.

#### 4.3 Autenticação pelo VITEK<sup>®</sup> 2

Foram realizadas 97 autenticações com resultados que variaram entre “Excelente Identificação” (76%), “Muito Boa Identificação” (20%) e “Boa Identificação” (4%). Em uma das cepas com excelente identificação, foi indicada pelo sistema como “*Slashline*”, ou seja, ocasião em que o equipamento não chega a um resultado exato e indica tanto as possíveis espécies e subespécies, quanto os testes bioquímicos convencionais que devem ser realizados para sua diferenciação.

O caso anteriormente mencionado refere-se a uma cepa identificada na coleção como “*Escherichia coli*” com resultado apontando entre as espécies *E. coli* e *Shigella sonnei*. Foram realizados os testes bioquímicos sugeridos pelo sistema de indol e motilidade, permitindo confirmar sua identificação de maneira satisfatória como *E. coli* (indol e motilidade positivos).

Além do “*Slashline*” supracitado, outros casos foram encontrados ao final das análises. Estes casos se trataram de espécies dentro de um gênero que possuem alta similaridade bioquímica entre si, impedindo o sistema VITEK<sup>®</sup> 2 de chegar, em algumas situações, a níveis de espécie ou subespécie, como no gênero *Salmonella* (16 cepas), com resultados à nível de grupo e a espécie *Enterobacter cloacae* (5 cepas) com resultado à nível de complexo, que inclui outras subespécies. Sendo assim, fez-se necessária a utilização de outros meios de identificação, como a sorotipagem, no caso da *Salmonella* e provas bioquímicas adicionais como a urease, lactose, mobilidade e dsorbitol no caso da *E. cloacae*.

Fora os casos mencionados, duas cepas de *Bacillus* identificadas na coleção como “*Bacillus subtilis*” e uma identificada apenas como “*Bacillus sp.*” chegaram as possíveis espécies “*subtilis / amyloliquefaciens / atrophaeus*”; uma cepa identificada como “*Bacillus cereus*” e uma apenas como “*Bacillus*” chegaram as espécies “*cereus / thuringiensis / mycoides*”, todas encaminhadas para o sequenciamento parcial do gene 16S RNAr e MALDI-TOF MS devido limitações das provas bioquímicas sugeridas pelo VITEK® 2.

Dentre os resultados obtidos, sete cepas nomeadas na coleção como “*Escherichia coli*” (1), “*Klebsiella pneumoniae*” (1), “*Pseudomonas aeruginosa*” (2), “*Salmonella*” (2) e “*Staphylococcus epidermidis*” (1) foram identificadas com grau de “Excelente Identificação” como microrganismos diferentes de sua identificação na CBP, conforme tabela 4. Diante disso, esses resultados foram considerados insatisfatórios e as cepas correspondentes foram excluídas da coleção.

Tabela 4 - Resultados insatisfatórios encontrados pela análise com sistema VITEK® 2

Identificação na CBP*	ID	Resultado VITEK® 2
<i>Escherichia coli</i>	P2447	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2378	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2742	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2888	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Salmonella sp.</i>	P2747	<i>Escherichia coli</i>
<i>Salmonella sp.</i>	P2761	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P1604	<i>Micrococcus luteus</i>

\*Coleção de Bactérias Patogênicas.  
Fonte: O autor (2023).

Com isso, após a realização das 97 autenticações, 90 cepas da CBP tiveram resultado satisfatório, com sua identificação de acordo com o microrganismo catalogado na coleção.

#### 4.4 Produção de lotes

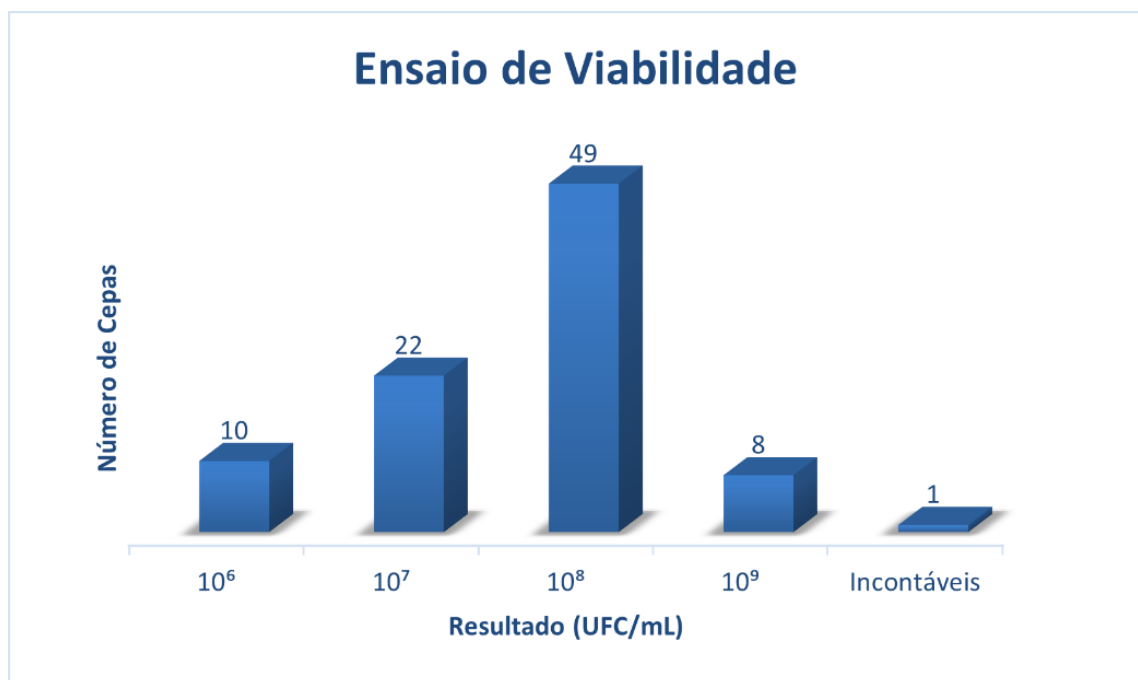
Posteriormente aos ensaios pré-produção, as cepas analisadas e com resultado satisfatório foram produzidas e preservadas pelo método de liofilização, totalizando 90 lotes com 25 ampolas cada.

#### 4.5 Viabilidade

De acordo com o POP do setor (65.3230.045) são considerados resultados insatisfatórios aqueles em que a contagem de UFC das placas de diluição  $10^{-4}$  for menor do que 30 UFC. E nos casos em que há um grande crescimento bacteriano, dificultado a contagem de UFC até mesmo nas placas da última diluição ( $10^{-6}$ ), o resultado é considerado satisfatório, com crescimento acima de  $10^7$  UFC/mL.

Dentre as 90 cepas avaliadas, todas obtiveram resultados satisfatórios, com a maioria (54%) apresentando crescimento de  $10^8$  UFC/mL de células viáveis e apenas uma com contagem “ $>10^7$  UFC/mL” considerada incontável, assim como demonstrado no Gráfico 2 e detalhado no Apêndice B.

Gráfico 2 - Resultados do ensaio de viabilidade (UFC/mL)



UFC – Unidade formadora de colônia.

Fonte: O autor (2023).

#### 4.6 Identificação pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr

O arquivo com as sequências foram inseridas nos bancos de dados online BLAST e EzTaxon para comparação de similaridade de nucleotídeos, de acordo com a tabela 5.

Tabela 5 - Porcentagens de similaridade obtidas do sequenciamento no banco de dados BLAST

Identificação na CBP*	ID	BLAST	EzTaxon
<i>Bacillus</i> sp.	P0039	<i>B. subtilis</i> 97,31%; <i>B. amyloliquefaciens</i> 97,05%; <i>B. rugosus</i> 95,34%	<i>B. subtilis</i> 98,62%
<i>Salmonella</i> sp.	P2563	<i>E. coli</i> 100%; <i>S. enterica</i> 100%;	<i>S. flexneri</i> 98,31%
<i>Salmonella</i> sp.	P2565	<i>E. coli</i> 98,82%; <i>S. enterica</i> 98,82%	<i>S. flexneri</i> 100%
<i>Salmonella</i> sp.	P2567	<i>E. coli</i> 99,09%; <i>S. enterica</i> 99,09%	<i>S. flexneri</i> 98,63%
<i>Salmonella</i> sp.	P2571	<i>E. coli</i> 98,21%; <i>S. enterica</i> 97,94%	<i>S. flexneri</i> 98,98%
<i>Salmonella</i> sp.	P2572	<i>E. coli</i> 99,12%; <i>S. enterica</i> 99,12%	<i>S. flexneri</i> 99,32%
<i>Salmonella</i> sp.	P2573	<i>E. coli</i> 99,40%; <i>S. enterica</i> 99,40%	<i>S. flexneri</i> 99,32%
<i>B. megaterium</i>	P2637	<i>B. megaterium</i> 99,37%; <i>P. megaterium</i> 99,36%	<i>P. megaterium</i> 99,32%
<i>Salmonella</i> sp.	P2746	<i>E. coli</i> 98,26%; <i>S. enterica</i> 98,26%	<i>S. flexneri</i> 99,32%
<i>Salmonella</i> sp.	P2748	<i>E. coli</i> 97,92%; <i>S. enterica</i> 97,64%	<i>S. flexneri</i> 98,95%
<i>Salmonella</i> sp.	P2749	<i>E. coli</i> 99,40%; <i>S. enterica</i> 99,40%	<i>S. flexneri</i> 98,98%
<i>Salmonella</i> sp.	P2752	<i>E. coli</i> 98,26%; <i>S. enterica</i> 98,26%	<i>S. flexneri</i> 98,98%
<i>Salmonella</i> sp.	P2753	<i>E. coli</i> 98,26%; <i>S. enterica</i> 98,26%	<i>S. flexneri</i> 99,32%
<i>Salmonella</i> sp.	P2754	<i>E. coli</i> 98,21%; <i>Salmonella</i> sp. 98,21%; <i>S. enterica</i> 98,21%	<i>S. flexneri</i> 98,97%
<i>Salmonella</i> sp.	P2756	<i>E. coli</i> 99,12%; <i>S. enterica</i> 99,12%	<i>S. flexneri</i> 99,32%
<i>Salmonella</i> sp.	P2759	<i>E. coli</i> 99,09%; <i>S. enterica</i> 99,09%	<i>S. flexneri</i> 99,32%
<i>Bacillus cereus</i>	P2806	<i>B. thuringiensis</i> 92,57%; <i>B. cereus</i> 92,57%; <i>B. pseudomycooides</i> 92,57%	<i>B. mycooides</i> 99,63%
<i>B. subtilis</i>	P2808	<i>B. subtilis</i> 99,7%; <i>B. velezensis</i> 99,7%; <i>B. rugosus</i> 96,7%	<i>B. subtilis</i> 98,64%
<i>B. subtilis</i>	P2809	<i>B. subtilis</i> 97,54%	<i>B. subtilis</i> 99,30%
<i>B. subtilis</i>	P2810	<i>Bacillus</i> sp. 98,72%; <i>Paenibacillus</i> 98,40%; <i>B. subtilis</i> 98,08%	<i>B. subtilis</i> 98,63%
<i>B. licheniformis</i>	P2814	<i>B. licheniformis</i> 99,04%; <i>Bacillus</i> sp. 99,04%	<i>B. licheniformis</i> 99,32%
<i>Salmonella</i> sp.	P3116	<i>E. coli</i> 99,09%; <i>S. enterica</i> 99,09%	<i>S. flexneri</i> 99,32%
<i>B. cereus</i>	P3441	<i>B. cereus</i> 98,40%; <i>Bacillus</i> sp. 98,40%	<i>B. manliponensis</i> 97,65%
<i>Bacillus</i>	P4901	<i>B. thuringiensis</i> 99,09%; <i>B. cereus</i> 98,79%	<i>B. thuringiensis</i> 100%

\*Coleção de Bactérias Patogênicas.  
Fonte: O autor (2023).

#### 4.7 Maldi-Tof MS

Os resultados obtidos da análise das cepas de *Bacillus* pelo laboratório da UFRJ foram encaminhadas para o SBA, de acordo com a tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da análise do Maldi-Tof MS

Identificação na CBP*	ID	Resultado	Confiabilidade	Consistência
<i>Bacillus</i> sp.	P0039	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. velezensis</i>	+++	C
<i>B. megaterium</i>	P2637	<i>P. megaterium</i>	+++	A
<i>Bacillus</i> sp.	P2806	<i>B. cereus</i>	+++	A
<i>B. subtilis</i>	P2808	<i>B. subtilis</i>	+++	A
<i>Bacillus</i> sp.	P2809	<i>B. subtilis</i>	+++	A
<i>B. subtilis</i>	P2810	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. velezensis</i>	+	B
<i>B. licheniformis</i>	P2814	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
<i>B. cereus</i>	P3441	<i>B. cereus</i>	+++	A
<i>Bacillus</i> sp.	P4901	<i>B. cereus</i>	+++	A

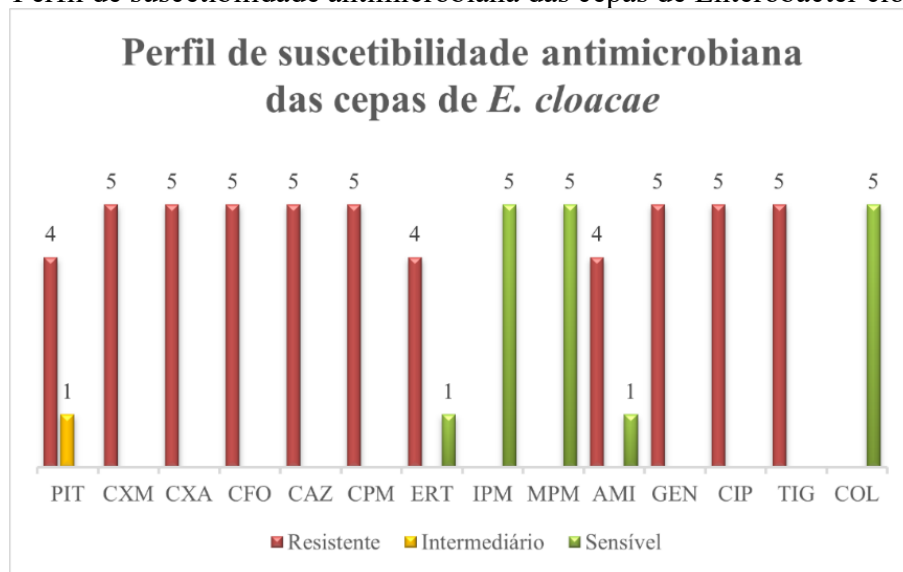
CBP – Coleção de Bactérias Patogênicas

Fonte: O autor (2023).

#### 4.8 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos pelo VITEK® 2

##### 4.8.1 Enterobacter cloacae

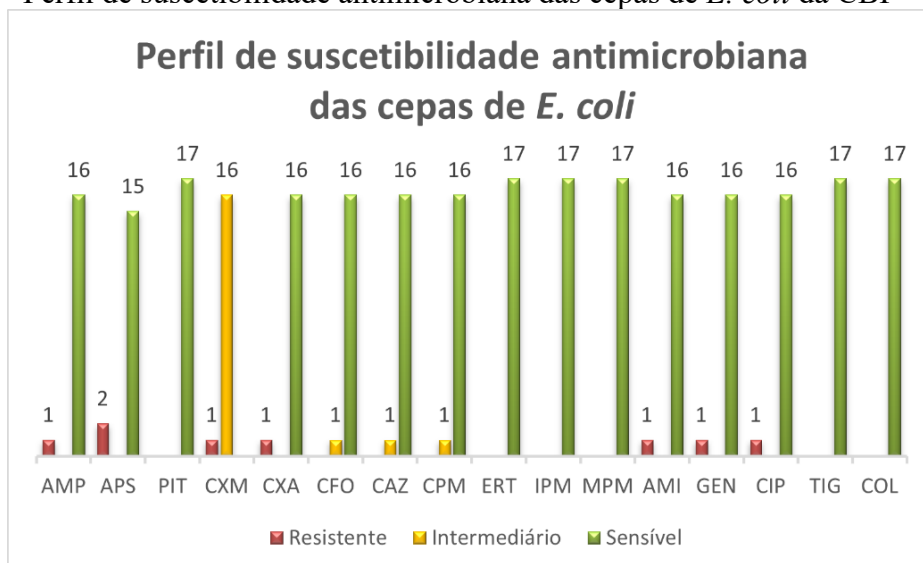
Das 78 cepas de pesquisa da CBP submetidas ao TSA, cinco foram da espécie *E. cloacae*, conforme o Gráfico 3.

Gráfico 3 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Enterobacter cloacae* da CBP

PIT – Piperacilina/Tazobactam; CXM – Cefuroxima; CXA – Cefuroxima Axetil; CFO – Cefoxitina; CAZ – Ceftazidima; CPM – Cefepima; ERT – Ertapenem; IPM – Imipenem; MPM – Meropenem; AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; TIG – Tigeciclina; COL – Colistina.  
 Fonte: O autor (2023).

#### 4.8.2 *Escherichia coli*

Das 78 cepas de pesquisa da CBP submetidas ao TSA, 17 foram da espécie *E. coli*, conforme o Gráfico 4. Além disso, duas cepas foram positivas para enzima  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL).

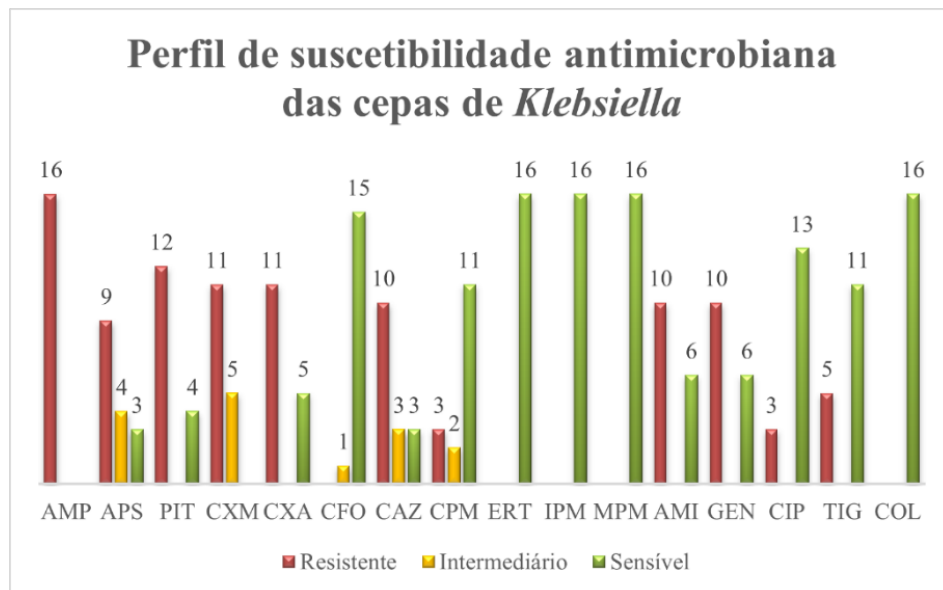
Gráfico 4 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *E. coli* da CBP

AMP – Ampicilina; APS – Ampicilina/Sulbactam; PIT – Piperacilina/Tazobactam; CXM – Cefuroxima; CXA – Cefuroxima Axetil; CFO – Cefoxitina; CAZ – Ceftazidima; CPM – Cefepima; ERT – Ertapenem; IPM – Imipenem; MPM – Meropenem; AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; TIG – Tigeciclina; COL – Colistina.  
 Fonte: O autor (2023).

#### 4.8.3 *Klebsiella* spp.

Das 78 cepas de pesquisa da CBP submetidas ao TSA, 16 foram do gênero *Klebsiella*, conforme o Gráfico 5. Além disso, 13 cepas foram positivas para ESBL.

Gráfico 5 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Klebsiella* spp. da CBP



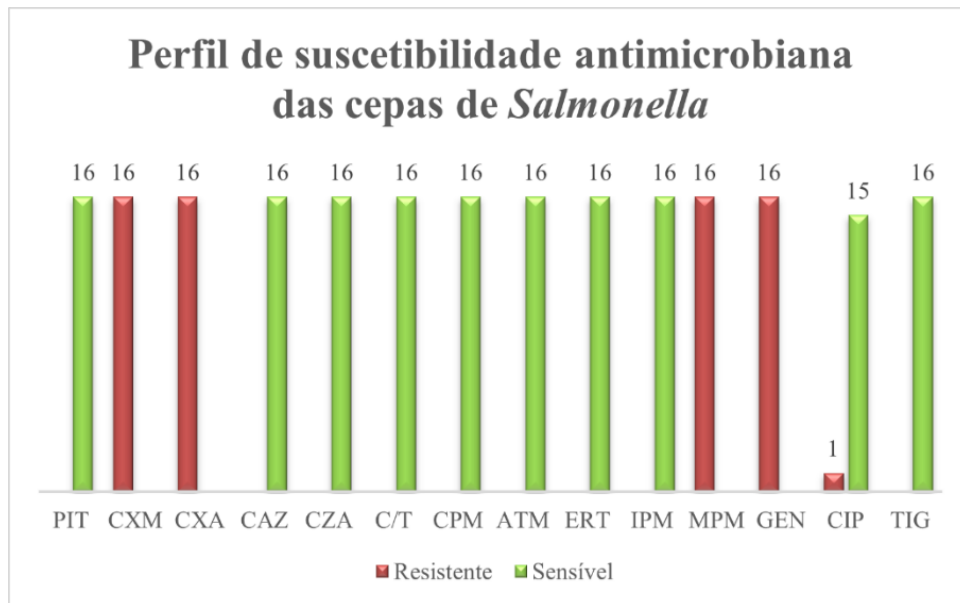
AMP – Ampicilina; APS – Ampicilina/Sulbactam; PIT – Piperacilina/Tazobactam; CXM – Cefuroxima; CXA – Cefuroxima Axetil; CFO – Cefoxitina; CAZ – Ceftazidima; CPM – Cefepima; ERT – Ertapenem; IPM – Imipenem; MPM – Meropenem; AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; TIG – Tigeciclina; COL – Colistina.

Fonte: O autor (2023).

#### 4.8.4 *Salmonella* spp.

Das 78 cepas de pesquisa da CBP submetidas ao TSA, 16 foram do gênero *Salmonella*, conforme o Gráfico 6.



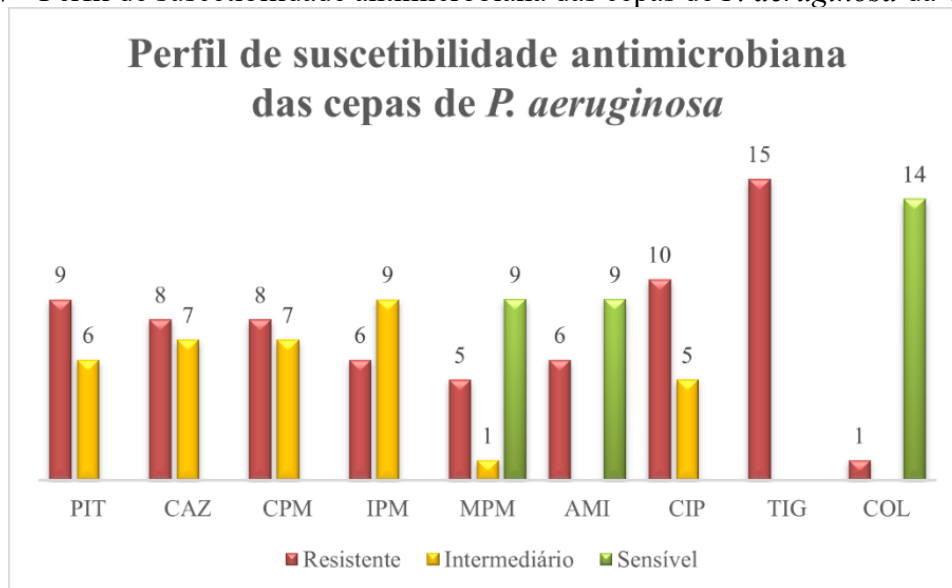
Gráfico 6 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. da CBP

PIT – Piperacilina/Tazobactam; CXM – Cefuroxima; CXA – Cefuroxima Axetil; CAZ – Ceftazidima; CZA – Ceftazidima/Avibactam; C/T – Ceftolozane/Tazobactam; CPM – Cefepima; ATM – Aztreonam; ERT – Ertapenem; IPM – Imipenem; MPM – Meropenem; GEN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; TIG – Tigeciclina.

Fonte: O autor (2023).

#### 4.8.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Das 78 cepas de pesquisa da CBP submetidas ao TSA, 15 foram do gênero *P. aeruginosa*, conforme o Gráfico 7.

Gráfico 7 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *P. aeruginosa* da CBP

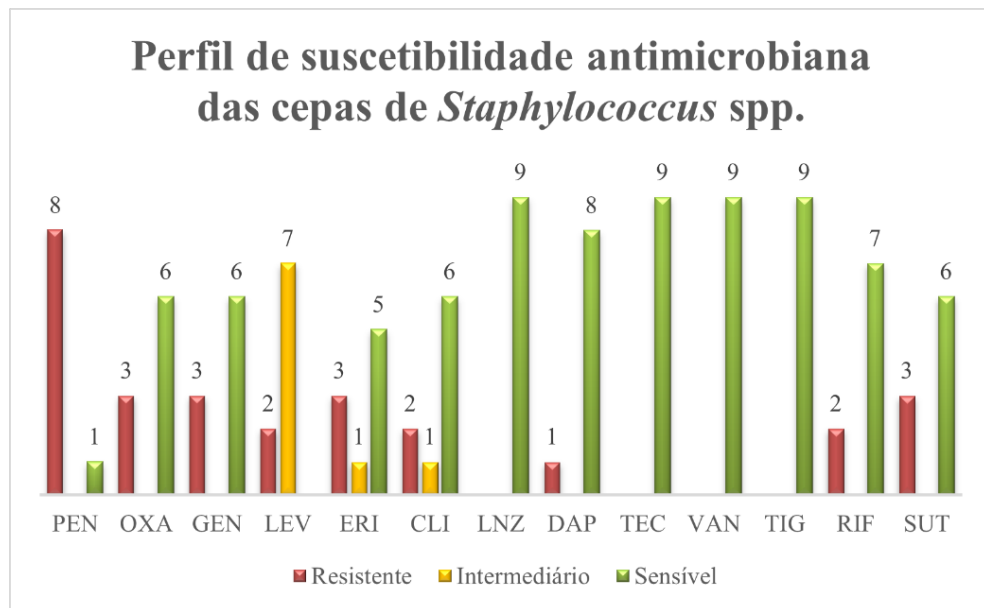
Legenda: PIT – Piperacilina/Tazobactam; CAZ – Ceftazidima; CPM – Cefepima; IPM – Imipenem; MPM – Meropenem; AMI – Amicacina; CIP – Ciprofloxacina; TIG – Tigeciclina; COL – Colistina.

Fonte: O autor (2023).

#### 4.8.6 *Staphylococcus spp.*

Das 78 cepas de pesquisa da CBP submetidas ao TSA, nove foram do gênero *Staphylococcus*, conforme o Gráfico 8.

Gráfico 8 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Staphylococcus spp.* da CBP



PEN – Penicilina; OXA – Oxacilina; GEN – Gentamicina; LEV – Levofloxacina; ERI – Eritromicina; CLI – Clindamicina; LNZ – Linezolida; DAP – Daptomicina; TEC – Teicoplanina; VAN – Vancomicina; TIG – Tigeciclina; RIF – Rifampicina; SUT – Trimetropin/Sulfametoxazol.

Fonte: O autor (2023).

## 5 DISCUSSÃO

O relatório fornecido com as cepas mais solicitadas, sendo em sua maioria bactérias Gram-negativas (58% pertencentes à família *Enterobacterales*), possivelmente podem estar associadas à sua importância clínica. Esse grupo, comumente associado a casos de multirresistência, representa um desafio significativo na saúde pública no tratamento de infecções (OMS, 2022).

A capacidade desses patógenos de desenvolver resistência a múltiplos antibióticos e, subsequentemente, transmitir essa resistência, compromete a eficácia dos tratamentos convencionais, resultando em maior complexidade clínica e prolongamento das infecções. Em 2022, a OMS emitiu um novo relatório, por meio do Sistema Global de Vigilância da Resistência e Utilização de Antimicrobianos, uma ferramenta lançada em 2015 com o objetivo de promover a vigilância da resistência aos antimicrobianos e informar estratégias para combatê-la. Este relatório, produzido em colaboração com outros países, resumiu os dados de 2020 sobre as taxas de resistência aos antimicrobianos em bactérias comuns globalmente, incluindo espécies como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp (OMS, 2022). Isso destaca a necessidade pesquisas nesta área, possivelmente refletindo nos resultados do relatório da CBP por terem sido as cepas mais solicitadas.

A verificação da pureza é a primeira e uma das etapas essenciais, tanto nos ensaios pré-produção quanto nos pós-produção, que visa garantir a existência de apenas uma cepa na ampola. Principalmente quando relacionado a uma coleção biológica, manter o microrganismo isolado e livre de contaminantes é crucial para preservar a autenticidade e integridade da coleção ao longo do tempo, assegurando que as informações taxonômicas e genéticas associadas a cada linhagem sejam preservadas de maneira satisfatória. Isso contribui para a conservação efetiva da biodiversidade, possibilitando a utilização desses microrganismos em atividades de ensino, pesquisa, inovação e serviços biotecnológicos. Dessa forma, a verificação da pureza desempenha um papel crucial na manutenção da qualidade e utilidade das coleções biológicas.

Em relação ao ensaio de viabilidade, os resultados encontrados revelaram uma significativa eficácia na preservação das cepas, com a maioria delas (54%) apresentando um crescimento de  $10^8$  UFC/mL. Importante ressaltar que essas cepas foram depositadas ao longo de um extenso período, desde 1989 até 2016. Esses dados corroboram com a literatura científica, conforme destacado por Sousa e colaboradores (2017) e Sola e colaboradores (2012),

que evidenciam a eficiência da liofilização, método adotado pela CBP, na manutenção da viabilidade ao longo do tempo.

A abordagem de preservação por liofilização, conforme proposta pela CBP e embasada por Sola e colaboradores (2012), mostra-se adequada para a maioria dos microrganismos, com a exceção apenas de algas e protozoários. A garantia de uma viabilidade prolongada, estimada entre 17 e 20 anos, ressalta a confiabilidade desse método. Assim, os resultados do ensaio de viabilidade demonstram a eficiência do processo de liofilização na manutenção da viabilidade das cepas depositadas ao longo de décadas, evidenciando a robustez desse método de preservação.

Singh, Rai e Nair (2022) discutem fatores críticos que podem exercer influência na viabilidade das cepas liofilizadas. Entre esses fatores, a distribuição irregular de calor durante o processo de liofilização é apontada como uma possível causa de formação de cristais de gelo, capazes de prejudicar a estrutura celular bacteriana. Adicionalmente, Sola e colaboradores (2012) enfatizam a importância do cuidado durante a estocagem e acondicionamento do material liofilizado, apontando que tais práticas podem afetar o seu tempo de vida. Recomenda-se, nesse contexto, o armazenamento sob refrigeração, em ambientes com baixa umidade, protegido da luz e de contaminantes.

É pertinente observar que a CBP adota rigorosamente essas práticas, o que pode estar diretamente associado à ausência de resultados insatisfatórios no presente ensaio, reforçando a confiança na estabilidade e viabilidade desses microrganismos ao longo do tempo.

O sistema VITEK<sup>®</sup> 2 teve um excelente desempenho geral na autenticação das cepas da CBP. No presente estudo 91 % das autenticações realizadas identificaram corretamente a cepa de acordo com sua identificação na coleção, sendo que dentro desse conjunto de autenticações corretas, 74% identificaram o microrganismo a nível de espécie. Esses resultados destacam a eficácia do VITEK<sup>®</sup> 2 em fornecer identificações precisas, evidenciando sua robustez na caracterização de cepas, inclusive até o nível taxonômico de espécie.

Comparativamente, Madhavan e colaboradores (2021) encontraram uma taxa de identificação pelo VITEK<sup>®</sup> 2 de 97% e 90,9% nos níveis de gênero e espécie, respectivamente, em seu estudo que focou principalmente em microrganismos de rotina em laboratórios clínicos. Os resultados obtidos neste estudo se assemelham aos encontrados nas análises das cepas da CBP, especialmente no que diz respeito ao nível de gênero. É importante destacar que o sistema VITEK<sup>®</sup> 2 demonstra um melhor desempenho no ambiente laboratorial clínico. Portanto, a diferença nos resultados obtidos por Madhavan e colaboradores (2021), com uma maior porcentagem de identificações ao nível de espécie em comparação com as cepas da CBP, pode

ser atribuída tanto ao contexto clínico em que o equipamento foi utilizado, como também as escolhas distintas de cepas nos dois estudos. Além disso, Madhavan e colaboradores (2021) também destacaram a incapacidade do sistema diferenciar entre as espécies *S. sonnei* e *E. coli* devido às suas similaridades genéticas e bioquímicas, uma limitação que foi encontrada em uma das cepas da CBP analisadas, mas que foi possível identificá-la por meio dos testes bioquímicos recomendados (indol e motilidade).

No que diz respeito às cepas pertencentes ao gênero *Bacillus*, foi observado um padrão consistente com resultados obtidos por outros autores. Para esse grupo a identificação pelo VITEK<sup>®</sup> 2 predominantemente alcançou o nível de gênero, semelhante ao que foi observado nas cepas de *Salmonella*. Com isso, todas as cepas com identificação taxonômica multiopcional, ou seja, ocasião em que o perfil biológico é o mesmo para os grupos taxonômicos descritos no resultado, foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S RNAr e, adicionalmente, as cepas do gênero *Bacillus* também foram encaminhadas para identificação pela técnica de MALDI-TOF MS para avaliar uma possível diferenciação entre as espécies. Essa abordagem complementar revelou-se essencial diante das limitações identificadas pelo VITEK<sup>®</sup> 2 em discernir certas espécies de *Bacillus* e de *Salmonella*, conforme evidenciado pelos resultados do presente estudo. Vale ressaltar que, de acordo com o manual do VITEK<sup>®</sup> 2, essa limitação também está associada a outras espécies.

Na análise pelo VITEK<sup>®</sup> 2, das nove cepas do gênero *Bacillus*, cinco (56%) ao nível de gênero e quatro (44%) foram identificadas ao nível de espécie. Esses achados se aproximam dos resultados obtidos no estudo conduzido por Costa e colaboradores (2022), que dentre as 34 estirpes de *Bacillus* avaliadas pelo VITEK<sup>®</sup> 2, 14 (41%) delas alcançaram o gênero e 12 (35 %) a espécie, com quatro cepas não identificadas, uma com resultado inconclusivo e três identificadas incorretamente. Já os resultados obtidos indicados por grupos de espécies como "*B. subtilis* / *B. amyloliquefaciens* / *B. atrophaeus*" e "*B. cereus* / *B. thuringiensis* / *B. mycoides*" revelam uma limitação do sistema em diferenciá-las, como destacado por Halket, Dinsdale e Logan (2009) e corroborado por Mursyidah e colaboradores (2021). Estes autores, ao conduzirem pesquisas independentes, identificaram a mesma complexidade na determinação específica de algumas cepas de *Bacillus* pelo VITEK<sup>®</sup> 2. A dificuldade em alcançar uma diferenciação mais precisa pode ser atribuída à similaridade entre algumas espécies dentro deste gênero, destacando a necessidade de abordagens complementares ou técnicas moleculares mais avançadas para elucidar de maneira mais específica as identidades bacterianas.

Os resultados obtidos por Akter e Shamimuzzaman (2023) usando a mesma metodologia de identificação pelo sistema VITEK<sup>®</sup> 2 diferem dos achados desta pesquisa com

relação ao gênero *Salmonella*. Das 16 cepas autenticadas no presente estudo da CBP, apenas uma (6%) foi identificada a nível de espécie (*Salmonella ser. Typhimurium*). Em contraste, no estudo conduzido pelos autores supracitados, que envolveu 136 isolados, 103 (76%) foram identificados a nível de espécie, abrangendo pelo menos sete sorovares diferentes, tais como *S. Typhimurium*, *S. Paratifo*, *S. Enteritidis*, *S. Enterica*, *S. Typhi*, *S. Gallinarum*, e *S. Arizonae*.

Quando analisadas pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr, a similaridade desta região entre as espécies do gênero *Bacillus* também tornou sua diferenciação desafiadora. No presente estudo, quando submetidas a análise de similaridade contra o banco de dados BLAST, considerando a maior porcentagem de identificação, apenas três (33%) das nove cepas de *Bacillus* foram identificadas ao nível de espécie (P0039, P2637 e P4901). Destas três cepas, duas foram consideradas identificadas, uma vez que o percentual de identificação superou 98,7%, enquanto a outra alcançou uma identificação apenas válida com o percentual de identificação  $\geq 96\%$ . As seis (67%) cepas restantes foram identificadas apenas ao nível de gênero. Ao utilizar o banco de dados EzTaxon, 56% foram identificadas com percentual de identificação acima de 98,7%, e 44% foram identificadas com o percentual de identificação  $\geq 96\%$ , sendo consideradas identificações válidas. Além disso, uma das cepas foi identificada como uma espécie de *Bacillus* diferente da sua identificação na CBP (P3441).

Já os resultados observados por Costa e colaboradores (2022) ao analisarem cepas deste grupo isoladas de uma instalação farmacêutica, identificaram a maioria (56,70%) apenas a nível de gênero, enquanto 34,02% foram identificadas a nível de espécie.

Neste contexto, a análise pelo banco de dados EzTaxon se mostrou superior, entretanto, ainda assim, estes achados ressaltam a necessidade de incorporar outras técnicas moleculares ou diferentes abordagens, como análise do gene *rpoB* ou *gyrB*, a fim de melhorar a discriminação entre as espécies deste grupo, como pontuado por Costa e colaboradores (2022). É relevante mencionar que as cepas alvo do estudo conduzido pelos autores supracitados possuem uma diversidade maior quando comparadas às cepas analisadas da CBP, o que pode justificar as diferenças entre os percentuais de identificação de espécie e gênero entre os grupos estudados.

Já a análise pela técnica MALDI-TOF MS identificou sete (78%) cepas do gênero *Bacillus* ao nível de espécie e uma (11%) identificada de gênero, com isso demonstrando ser uma técnica com maior precisão para esse grupo específico de microrganismos. Apenas uma cepa (11%) não teve consistência de identificação, tanto para espécie quanto para gênero. Este resultado corrobora com o estudo conduzido por Costa e colaboradores (2022), que também realizaram essa comparação entre as três técnicas de identificação utilizadas no presente estudo.

No gênero *Salmonella*, todas as cepas submetidas ao sequenciamento apresentaram porcentagens iguais ou próximas entre as espécies *E. coli* e *S. enterica*, pelo BLAST. Quando analisadas pelo EzTaxon, todas as cepas foram identificadas como *Shigella flexneri* (*S. flexneri*), possivelmente por se tratarem de microrganismos pertencentes à mesma família (*Enterobacteriales*). Entretanto, devido características fenotípicas distintas já conhecidas na literatura, como a produção de H<sub>2</sub>S pelas cepas de *Salmonella* e ausência nas espécies *E. coli* e *S. flexneri*, tal resultado reflete a importância da utilização de métodos de identificação complementares, uma vez que, facilmente essas espécies poderiam ser separadas por métodos bioquímicos convencionais. As cepas previamente identificadas pelo sistema VITEK<sup>®</sup> 2, com resultado “Grupo *Salmonella*”, foram encaminhadas para diferenciação por sorologia em um laboratório referência no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

É importante ressaltar que ambos os bancos de dados são usados na microbiologia e biologia molecular para a identificação e caracterização de microrganismos. O BLAST sendo utilizado para a comparação de sequências, identificação de homologias e busca de similaridades entre sequências de DNA, RNA ou proteínas, com a desvantagem de ser um banco de dados não curado, ou seja, em que as sequências depositadas não são rigorosamente avaliadas. Enquanto o EzTaxon é focado especificamente em informações taxonômicas e identificação de microrganismos, desenvolvido para incluir as sequências de referência (Amaral; Reis; Silva, 2007; Yoon, *et al.*, 2017).

Em geral, comparando as três técnicas de análise utilizadas para a diferenciação das espécies do gênero *Bacillus* (ver tabela 7), é possível observar que, apesar da limitação intrínseca do VITEK<sup>®</sup> 2 em discriminar entre as espécies "*cereus/thuringiensis/mycoides*" e "*subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus*", conforme explicitado no manual do fabricante, o sistema conseguiu identificar com precisão duas cepas em nível de espécie. Este resultado sugere que certas características distintivas presentes em determinadas cepas podem permitir sua diferenciação pelo software, destacando a capacidade do VITEK<sup>®</sup> 2 de superar algumas limitações e proporcionar uma identificação mais específica em alguns casos particulares.

No que se refere ao sequenciamento, em especial do gene 16S RNAr, foi possível observar que o alvo testado, embora amplamente utilizado na identificação, apresentou um variado percentual de identificação entre os bancos de dados utilizados, que possivelmente pode ser justificado por se tratar de um banco curado (EzTaxon) de ou não curado (BLAST). Além disso, essa difícil diferenciação possivelmente está relacionada à elevada similaridade desse gene, de aproximadamente 99%, dificultando a distinção precisa entre as espécies apenas por meio dessa técnica.

E por fim, à análise pelo MALDI-TOF se destacou como a mais precisa entre as três técnicas utilizadas neste contexto. Esse desempenho é possivelmente justificado pela composição mais abrangente de seu banco de dados, principalmente quando comparado ao VITEK® 2, que possui um número mais limitado de microrganismos ambientais, por ser um equipamento utilizado na rotina clínica.

Tabela 7 - Comparação entre os resultados obtidos pelo VITEK® 2, sequenciamento parcial do gene 16S RNAr e MALDI-TOF MS para cepas de *Bacillus* da CBP

Microrganismo	ID	VITEK® 2	Sequenciamento do gene 16S RNAr (BLAST)	MALDI-TOF MS
<i>Bacillus</i> sp.	9	P003 <i>B. subtilis/ amyloliquefaciens/ atrophaeus</i>	<i>B. subtilis</i> 97,31%; <i>B. amyloliquefaciens</i> 97,05%; <i>B. rugosus</i> 95,34%	<i>B. amyloliquefaciens/ B. velezensis</i>
<i>B. megaterium</i>	7	P263 <i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i> 99,37%; <i>P. megaterium</i> 99,36%	<i>P. megaterium</i>
<i>Bacillus</i> sp.	6	P280 <i>B. cereus/ thuringiensis/ mycoides</i>	<i>B. thuringiensis</i> 92,57%; <i>B. cereus</i> 92,57%; <i>B. pseudomycooides</i> 92,57%	<i>B. cereus</i>
<i>B. subtilis</i>	8	P280 <i>B. subtilis/ amyloliquefaciens/ atrophaeus</i>	<i>B. subtilis</i> 99,7%; <i>B. velezensis</i> 99,7%; <i>B. rugosus</i> 96,7%	<i>B. subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp.	9	P280 <i>B. subtilis/ amyloliquefaciens/ atrophaeus</i>	<i>B. subtilis</i> 97,54%	<i>B. subtilis</i>
<i>B. subtilis</i>	0	P281 <i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus</i> sp. 98,72%; <i>Paenibacillus</i> 98,40%; <i>B. subtilis</i> 98,08%	<i>B. amyloliquefaciens/ B. velezensis</i>
<i>B. licheniformis</i>	4	P281 <i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i> 99,04%; <i>Bacillus</i> sp. 99,04%	<i>B. licheniformis</i>
<i>B. cereus</i>	1	P344 <i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i> 98,40%	<i>B. cereus</i>
<i>Bacillus</i> sp.	1	P490 <i>B. cereus/ thuringiensis/ mycoides</i>	<i>B. thuringiensis</i> 99,09%; <i>B. cereus</i> 98,79%	<i>B. cereus</i>

Fonte: O autor (2023).



No que diz respeito ao perfil de suscetibilidade das cepas da CBP analisadas, os resultados obtidos na avaliação da resistência de *E. cloacae* revelaram que 80% das cepas apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano entre as seis categorias testadas, de um total de sete categorias, sendo classificadas como XRD. Além disso, apresentou a resistência intrínseca a penicilina e às cefalosporinas de primeira geração devido à produção de  $\beta$ -lactamase AmpC. A sensibilidade foi observada apenas em relação ao IPM, MPM e COL.

Esses resultados indicam uma resistência mais pronunciada quando comparada com estudos anteriores recentemente realizados, como observado por Nurfajriah e colaboradores (2021) e Rajarajan e colaboradores (2022). Esses autores, ao analisarem o perfil de resistência dessa espécie identificaram um número maior de cepas sensíveis as quinolonas, aminoglicosídeos, gliciliclinas e alguns representantes das cefalosporinas. Levando em consideração que um dos estudos foi conduzido na Indonésia, essa diferença nos resultados observada possivelmente pode ser atribuída à localização da disseminação da cepa, além de outros fatores regionais que devem ser considerados e que podem influenciar a expressão de resistência, como variações na prática clínica, padrões de prescrição de antimicrobianos e até mesmo fatores socioeconômicos.

Os resultados da análise do perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas de *E. coli* da CBP revelaram uma incidência relativamente baixa de resistência, com apenas duas (12%) cepas identificadas como produtoras da enzima ESBL e, dentre essas, uma classificada como MDR pela resistência a AMP, APS, CXM, CXA, AMI, GEN e CIP. Em contraste, Crettels e colaboradores (2023), ao examinarem cepas desta mesma espécie em amostras de água na Bélgica, observaram uma resistência abrangente contra todos os antimicrobianos testados, exceto para a MEM, com 23,8% das cepas demonstrando resistência a pelo menos uma droga e 6,1% sendo multirresistentes, além de 28 cepas (3%) produtoras de ESBL. Levando em consideração o período em que as cepas da CBP foram depositadas (entre 1989 e 2016), o resultado encontrado pelos autores neste recente estudo ressalta a capacidade potencial dessa espécie de se tornar multirresistente, destacando a importância da vigilância contínua e medidas preventivas para reduzir o desenvolvimento e disseminação de resistência antimicrobiana. Além disso, Crettels e colaboradores (2023) atribuíram esse cenário à liberação de águas residuais hospitalares ou comunitárias e à produção pecuária intensiva, identificando esses como principais fatores contribuintes para o desenvolvimento de cepas multirresistentes.

No estudo conduzido no Brasil por Menezes e colaboradores (2023), ao analisarem queijo fresco comercializado no Espírito Santo identificaram três isolados de *E. coli* (6%) como

MDR, com resistência a três, quatro e seis medicamentos testados. Campos e colaboradores (2006), também analisando amostras de queijo e leite, isolaram 25 cepas identificando resistência à AMP (4%) e tetraciclina (TET) (4%). Já Neres e colaboradores (2019) isolaram 78 cepas de *E. coli* de queijos artesanais, destacando uma maior prevalência de resistência à AMP (7,69%). Além disso, também foi observada resistência significativa a TET, cloranfenicol (CLO) e SUT (5,12%), bem como a cefotaxima (CTX) (2,56%). Segundo Neres e colaboradores (2019), esse perfil de resistência provavelmente está relacionado ao uso desses antimicrobianos na pecuária, assim como apontado por Crettels e colaboradores (2023).

Por outro lado, as cepas analisadas do gênero *Klebsiella* demonstraram altos índices de resistência frente aos antimicrobianos testados, com todas as cepas resistentes a pelo menos um representante das penicilinas. Além disso, 75% das cepas analisadas foram classificadas como MDR, sendo que, entre essas, uma apresentou resistência a quatro classes de antimicrobianos, enquanto três outras apresentaram resistência a cinco classes. As demais cepas MDR apresentaram resistência a três classes. Adicionalmente, 81% das cepas também apresentaram resultado positivo para ESBL e todas apresentando suscetibilidade aos carbapenêmicos e COL.

Estes resultados corroboram com os dados encontrados no estudo conduzido por Santos e colaboradores (2020), realizado em um hospital público do estado do Pará, Brasil. A análise dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de diversas amostras clínicas e submetidos ao teste de suscetibilidade antimicrobiana, também revelou uma elevada prevalência de cepas MDR (77%). Além disso, foi observado que todas as cepas testadas apresentaram resistência à AMP (95,3%), sendo uma característica intrínseca a essa espécie, seguida pela CXM (67,2%) e CXA (67,2%). No caso das cepas da CBP, a resistência foi de 100%, 68% e 68%, respectivamente.

Os resultados obtidos por Rio e colaboradores (2023) revelam um cenário mais crítico com relação aos isolados de *K. pneumoniae*. No estudo conduzido em um hospital universitário na Itália, foram analisadas 109 cepas dessa espécie, detectadas em amostras clínicas. Foi observado que, além dos antimicrobianos convencionais presentes no cartão do VITEK<sup>®</sup> 2 AST-N397, aproximadamente 50% das cepas analisadas foram identificadas como PDR. Além disso, algumas demonstraram resistência à nova combinação de  $\beta$ -lactâmicos/inibidores de  $\beta$ -lactamases, como ceftazidima/avibactam, imipenem/relebactam e meropenem/vaborbactam, os quais não estavam incluídos nos cartões disponíveis. Com base nas comparações realizadas, um dos fatores que possivelmente pode estar associado à acentuada resistência observada, inclusive contra drogas mais recentes, é o ambiente de isolamento das cepas, predominantemente de amostras clínicas. Essa condição pode refletir um ambiente de maior pressão seletiva de antimicrobianos, resultando em cepas mais resistentes.

Além disso, é importante ressaltar que, os estudos utilizados são relativamente recentes, enquanto as cepas da CBP foram depositadas anos antes, podendo, de fato, demonstrar uma maior sensibilidade em comparação com cepas isoladas mais recentemente

Os resultados obtidos na análise da resistência aos antimicrobianos das cepas de *Salmonella* da CBP apresentaram divergências em relação a alguns estudos recentemente conduzidos no Brasil. Essa diferença, em grande parte, pode ser atribuída aos métodos utilizados, como disco de difusão. Esse método em específico permite a utilização de antimicrobianos além dos encontrados no cartão AST do VITEK® 2, que por sua vez, foi o método utilizado pela CBP. Exemplos desses antimicrobianos adicionais incluem amoxicilina e ácido clavulânico (AMC), TET e sulfonamida (SUL), dentre outros.

Com relação as cepas de *Salmonella* da CBP, todas demonstraram resistência a CXM e CXA e apenas uma cepa com resistência a CIP. Em contraste, Pavelquesi e colaboradores (2023) ao investigarem a prevalência e resistência antimicrobiana de 78 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carne de frango refrigerada comercializada no varejo no Distrito Federal, Brasil, observaram taxas de resistência para amoxicilina com AMC (83,3%), SUL (64,1%), TET (46,2%), e a CIP, com 65,4% de resultados intermediários e resistentes.

Corroborando com Pavelquesi e colaboradores (2023), Perin e colaboradores (2020) relataram resultados semelhantes de cepas de *Salmonella* isoladas de amostras de carne de frango congelada coletadas em lojas de varejo no estado do Paraná, Brasil. No referido estudo, os autores observaram uma alta resistência à TET (94,0%), AMC (84,0%) e CIP (76,0%). As diferenças observadas ressaltam a importância de considerar os métodos empregados nas análises ao interpretar e comparar os resultados de estudos distintos sobre resistência antimicrobiana.

As cepas de *P. aeruginosa* da CBP apresentaram variados níveis de resistência aos antimicrobianos testados. Das 15 cepas analisadas, três (20%) foram classificadas como MDR, apresentando resistência a quatro e cinco classes, enquanto outras três (20%) cepas foram classificadas como XDR com resistência a seis classes. Apenas uma cepa apresentou resistência a COL, entretanto, esse resultado requer a realização de testes adicionais, como a microdiluição em caldo, conforme recomendação fornecida pelo fabricante. Em contraste, o estudo conduzido por Alkhulaifi e Mohammed (2023), foi identificada alta prevalência de cepas MDR e XDR (66,31%), o que é superior ao relatado no presente estudo. Isso indica um importante potencial desse grupo de microrganismos em expressar resistência aos antimicrobianos, com seu aumento ao longo do tempo. Além disso, considerando que as cepas da CBP foram depositadas ao longo do tempo, é válido ponderar que cepas mais recentemente, principalmente levando em

consideração o local onde foram isoladas, podem apresentar uma tendência a serem mais resistentes, assim como observado em outros gêneros mencionados anteriormente.

Entretanto, quando comparado com um estudo conduzido no Brasil, por Camargo e colaboradores (2023), com isolados clínicos de *P. aeruginosa*, além de cepas MDR (55,5%) e XDR (18,5%), os autores também identificaram um isolado (0,8%) PDR. Isso pode ser uma preocupação em termos de opções terapêuticas, uma vez que a resistência a várias classes de antibióticos dificulta o tratamento eficaz das infecções.

Por fim, das cepas de *Staphylococcus* spp. analisadas, somente uma (11%) identificada como coagulase negativa, apresentou resistência a apenas dois antimicrobianos: OXA e ERI. As outras oito cepas (89%) foram identificadas como pertencentes à espécie *S. aureus* (coagulase positiva) e demonstraram resistência a pelo menos uma droga. Das cepas coagulase positiva, três (38%) foram classificadas como MDR e ORSA (*Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina), exibindo resistência a três (2) e quatro (1) classes de antimicrobianos.

Estes resultados foram parcialmente consistentes com os achados de Ibrahim e colaboradores (2023), principalmente com relação à alta taxa de resistência à PEN e à ampla sensibilidade a LNZ, VAN, TIG e TEC. No entanto, os isolados estudados por esses pesquisadores apresentaram uma alta resistência a alguns agentes, como SUT, TET e CLI, situação não encontrada nas cepas da CBP.

Em síntese, a avaliação abrangente da resistência antimicrobiana em diferentes cepas bacterianas revela um panorama complexo e dinâmico, com variações marcantes entre as espécies e mesmo dentro de uma mesma espécie. A diversidade nos perfis de resistência observados destaca a influência de fatores locais, como região, práticas de prescrição de antibióticos e condições ambientais, na evolução da resistência bacteriana. As comparações com estudos anteriores, tanto nacionais quanto internacionais, destacam a necessidade de vigilância contínua e estratégias preventivas a fim de monitorar, reduzir e controlar o desenvolvimento e a disseminação da resistência antimicrobiana. A identificação de cepas MDR, XDR e até PDR em algumas análises ressalta a importância crítica de abordagens integradas na gestão da resistência bacteriana, visando garantir a eficácia contínua dos tratamentos antimicrobianos e a preservação da saúde pública.

## 6 CONCLUSÃO

As coleções microbiológicas desempenham importante papel na conservação da biodiversidade, sendo multifuncionais e essenciais para diversas aplicações. Manter a organização e a manutenção eficientes desses centros é crucial para garantir a preservação dos microrganismos ao longo do tempo. O presente estudo contribuiu significativamente com a reestruturação da CBP, por meio de ensaios microbiológicos abrangentes, incluindo análises de pureza, viabilidade, antibiograma e identificação utilizando técnicas automatizadas, como VITEK<sup>®</sup> 2 e MALDI-TOF, além de técnicas moleculares, como o sequenciamento.

Os resultados obtidos revelaram um alto índice de sucesso na reidratação das ampolas de bactérias liofilizadas, resultando em 84 cepas com crescimento puro compatível com a identificação na CBP. Da mesma forma, os ensaios de viabilidade corroboraram a eficácia do método de preservação por liofilização adotado pela CBP, destacando sua eficiência como método de preservação a longo prazo, com impacto mínimo nos microrganismos.

A utilização do sistema VITEK<sup>®</sup> 2 para a identificação de microrganismos se mostrou em geral eficaz, especialmente ao possibilitar a realização do antibiograma. Contudo, esse sistema apresentou algumas limitações, especialmente na diferenciação de microrganismos do gênero *Bacillus*, considerados ambientais, ressaltando a necessidade de técnicas complementares para uma identificação mais precisa.

O sequenciamento parcial do gene 16S RNAr, embora considerado padrão ouro na identificação, também enfrentou desafios devido à alta similaridade genética entre algumas espécies. Nesses casos, a utilização de outros alvos se faz necessário para sua diferenciação.

A utilização da técnica MALDI-TOF MS demonstrou elevada eficácia na diferenciação das espécies do gênero *Bacillus*, alcançando a identificação a nível de espécie em oito das nove cepas analisadas. Principalmente quando comparada às outras técnicas utilizadas, o uso do MALDI-TOF MS para esse grupo de microrganismos em específico foi notavelmente superior.

Com relação ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo VITEK<sup>®</sup> 2, foram revelados diferentes padrões de resistência e sensibilidade entre as cepas de diferentes gêneros. Principalmente quando comparado a outros estudos realizados, foi possível observar significativas variações nos perfis de resistência, que variam de acordo com fatores locais, como geografia, práticas de prescrição de antibióticos e condições ambientais, refletindo na evolução da resistência bacteriana.

É importante destacar que as associações estabelecidas em relação ao perfil de resistência se referem a um grupo limitado de microrganismos depositados ao longo do tempo,

provenientes de diversas pesquisas, e não necessariamente refletem a situação atual. Cada conjunto de resultados obtidos representa uma síntese de informações coletadas em diferentes contextos e períodos, o que ressalta a importância de interpretar esses resultados com cautela diante das possíveis mudanças e evoluções na resistência bacteriana ao longo do tempo.

Em síntese, este estudo não apenas contribuiu para aprimorar os processos da CBP, mas também ressaltou a importância de uma abordagem integrada, combinando diversas técnicas para uma caracterização mais completa e precisa das cepas microbiológicas. Esses avanços não apenas beneficiam a CBP, mas têm implicações mais amplas na promoção da excelência nas práticas de conservação microbiológica.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. L. R. *et al.* Perfil epidemiológico de *Staphylococcus spp.* isolados de hemoculturas de pacientes internados em um hospital de atenção terciária da rede pública do Ceará. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 80, p. 1-8, 2021.
- AKTER, F.; SHAMIMUZZAMAN, M. Detection of *invA* Gene by PCR and Identification with Susceptibility Pattern Evaluation by VITEK 2 of *Salmonella* Isolates. **Research Square**, v. 1, p. 1-14, 2023.
- ALKHULAIFI, Z. M. M.; MOHAMMED, K. A. S. Prevalence and molecular analysis of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental specimens in Basra, Iraq. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 45–54, 2023.
- ALVES, H. O. **Caracterização integral do gene 16S rRNA de bactérias não esporulantes e sua ação contra *Anticarsia gemmatilis* HÜBNER 1818 (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**. 2020. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2020.
- AMARAL, A. M.; REIS, M. S.; SILVA, F. R. (ed.). **O programa BLAST: guia prático de utilização** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2007.
- ARANDA, A.T. Coleções Biológicas: Conceitos básicos, curadoria e gestão, interface com a biodiversidade e saúde pública. In: TERCEIRO SIMPÓSIO SOBRE A BIODIVERSIDADE DA MATA ATLÂNTICA (SIMBIOMA), 3., 2014, São Paulo. **Anais eletrônicos...** São Paulo: 2014. Disponível em: <http://sambio.com.br/simbioma/simbioma%20iii/03.pdf>. Acesso em: 03 maio 2023.
- AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 350–359, 2019.
- BIOMÉRIEUX. **VITEK® 2**. Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/produto/VITEK®r-2>. Acesso em: 03 jun. 2023a.
- BIOMÉRIEUX. **VITEK® 2 Compact**. Disponível em: [https://www.biomerieux.com.br/produto/VITEK®r-2-compact\\_](https://www.biomerieux.com.br/produto/VITEK®r-2-compact_). Acesso em: 03 jun. 2023b.
- BIOMÉRIEUX. **Como é que o VITEK® 2 cria valores de CMI?** Disponível em: <https://www.biomerieux-microbio.com/pt-pt/como-e-que-o-VITEK-2-cria-valores-de-cmi/>. Acesso em: 03 jun. 2023c.
- BRASIL. Lei nº 1.920, de 25 de julho de 1953. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 13193, 29 jul. 1953.
- BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 12647, 24 set. 1976a.
- BRASIL. Decreto nº 79.056, de 30 de dezembro de 1976. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 17163, 31 dez. 1976b.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 18055, 20 set. 1990.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 1, 27 jan. 1999.

CAMARGO, C. H. *et al.* Genomics and Antimicrobial Susceptibility of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Hospitals in Brazil. **Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 1–11, 2023.

CAMPOS, M. R. H. *et al.* Assessment of VITEK® 2, MALDI-TOF MS and full gene 16S rRNA sequencing for aerobic endospore-forming bacteria isolated from a pharmaceutical facility. **Journal of Microbiological Methods**, v. 194, p. 14–17, 2022a.

COSTA, E. A. *et al.* Desafios à atuação dos trabalhadores de Vigilância Sanitária nos serviços de saúde. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 10, n. 1, p. 14–24, 2022b.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Constituição da vigilância sanitária no Brasil. *In*: ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 2000. p. 15-40.

COTAQUISPE, R. *et al.* Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus spp* con resistencia a meticilina en pollos comerciales. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v. 32, n. 3, p. 1–12, 2021.

CRETTELS, L. *et al.* Antimicrobial resistant *Escherichia coli* prevalence in freshwaters in Belgium and human exposure risk assessment. **Heliyon**, v. 9, 2023.

DELGADO, V. S. R. **Evolução do perfil de suscetibilidade aos antibióticos de isolados bacterianos em uroculturas do laboratório da Cintramédica em dois períodos distintos (2014 e 2018)**. 2020. 73 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2020.

DONG, N. *et al.* *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. **eBioMedicine**, v. 79, 2022.

ELBEHIRY, A. *et al.* How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. **Vaccines**, v. 10, n. 11, p. 1–16, 2022.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 9–19, 2006.

FERONE, M. *et al.* Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3106–3129, 2020.



- FIDA, M. *et al.* Diagnostic Value of 16S Ribosomal RNA Gene Polymerase Chain Reaction/Sanger Sequencing in Clinical Practice. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 6, p. 961–968, 2021.
- FIGUEREDO, A. C. F. *et al.* *Pseudomonas Aeruginosa*: panorama do perfil de resistência aos carbapenêmicos no Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9661–9672, 2021.
- FLORIO, L. *et al.* MALDI-TOF MS identification and clustering applied to *Enterobacter* species in nosocomial setting. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–8, 2018.
- FRANCO-DUARTE, R. *et al.* Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 1–32, 2019.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Casa de Oswaldo Cruz. **Manual de Organização de Coleções da Fiocruz**: atualização: 14/11/2018. rev. 8. Rio de Janeiro, 2018. 17 p. Disponível em:  
[https://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/Manual\\_Trabalhos\\_Acad%C3%AAmicos\\_2021\\_-\\_13-02-2021.pdf](https://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/Manual_Trabalhos_Acad%C3%AAmicos_2021_-_13-02-2021.pdf). Acesso em: 06 maio 2023.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Casa de Oswaldo Cruz. **Política de preservação dos acervos científicos e culturais da Fiocruz**: atualização: 18.09.2020. 2. ed. Rio de Janeiro, 2020. 72 p. Disponível em:  
[https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/44749/politica\\_acervos\\_Fiocruz\\_2020.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/44749/politica_acervos_Fiocruz_2020.pdf?sequence=2&isAllowed=y). Acesso em: 04 maio 2023.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Coleção de Bactérias Patogênicas**. Disponível em:  
[http://cbp.fiocruz.br/index\\_](http://cbp.fiocruz.br/index_). Acesso em: 05 maio 2023.
- GANBOLD, M. *et al.* Species identification, antibiotic resistance, and virulence in *Enterobacter cloacae* complex clinical isolates from South Korea. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.
- GEMAL, A. L. *et al.* (In)Definições sobre o componente laboratorial de vigilância sanitária no Brasil. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 4, n. 4, p. 5–12, 2016.
- GOMES, D. R. M.; CASALINI, C. C. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial. **Revista Saúde Integrada**, v. 11, n. 22, p. 71–84, 2018.
- GOMES, T. A. T. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3–30, 2016.
- GUERN, A. L. *et al.* *Yersinia artesianana* sp. nov., *Yersinia proxima* sp. nov., *Yersinia alsatica* sp. nov., *Yersinia vastinensis* sp. nov., *Yersinia thracica* sp. nov. and *Yersinia occitanica* sp. nov., isolated from humans and animals. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, p. 5363–5372, 2020.

HALKET, G.; DINSDALE, A. E.; LOGAN, N. A. Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endosporeformers. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 120–126, 2009.

HATA, D. J. *et al.* Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1087–1092, 2007.

IBRAHIM, R. A. *et al.* Antimicrobial Resistance and Virulence Gene Profile of Clinical *Staphylococcus aureus*: A Multi-Center Study from Ethiopia. **Infection and Drug Resistance**, v. 16, p. 4835–4844, 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil).

**Apresentação.** Disponível em:

[https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=61&Itemid=57](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=57). Acesso em: 26 abr. 2023a.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil).

**Estrutura.** Disponível em:

[https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=74&Itemid=70](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=74&Itemid=70). Acesso em: 26 abr. 2023b.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil).

**Organograma.** Disponível em:

<https://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/instituto/2021/novembro/organograma-site-INCQS.png>. Acesso em: 27 abr. 2023c.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil).

**Coleções Microbiológicas do INCQS.** Disponível em:

[https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=120&Itemid=100](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=120&Itemid=100). Acesso em: 27 abr. 2023d.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.045**: teste de viabilidade e pureza da produção de bactérias de referência. Rev. 5. Rio de Janeiro: INCQS, 2023e. 14 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.047**: bactérias - caracterização. Rev. 4. Rio de Janeiro: INCQS, 2023f. 32 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.001**: produção e preservação de bactérias da coleção de bactérias patogênicas pelo método de liofilização. Rev. 8. Rio de Janeiro: INCQS, 2022. 17 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.073**: caracterização molecular na coleção de bactérias patogênicas. Rev. 0. Rio de Janeiro: INCQS, 2023g. 12 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **PU 3230.007**: utilização de liofilizador EDWARDS LK4R na produção de lotes de

microrganismos. Rev. 6. Rio de Janeiro: INCQS, 2020. 7 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **PU 3230.014**: pistola para teste de vácuo em ampolas pós-produção de lote de micro-organismo. Rev. 4. Rio de Janeiro: INCQS, 2021. 2 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

LAMAS, A. *et al.* A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. **Microbiological Research**, v. 206, p. 60–73, 2018.

LAZARETTI, A. *et al.* Resistência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* aos antibióticos carbapenêmicos. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3, n. 3, p. 10–19, 2022.

LI, D. *et al.* MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. **ACS Measurement Science Au**, v. 2, n. 5, p. 385–404, 2022.

LUSTOSA, A. G. *et al.* Aspectos gerais de infecções por bactérias do gênero *Salmonella*, um problema de saúde pública e animal. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, 2021.

MADHAVAN, A. *et al.* Evaluation of Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight Mass spectrometry (MALDI TOF MS) and VITEK 2 in routine microbial identification. **Ghana Medical Journal**, v. 55, n. 4, p. 308–310, 2021.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MARTIN, L. *et al.* Characterization of atypical isolates of *Yersinia intermedia* and definition of two new biotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2377–2380, 2009.

MARTINS, P. H. R. **Ampliação, caracterização fenotípica e estruturação da Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos nativas do solo do Distrito Federal**. 2018. 110 f. Tese (Doutorado em Biologia Microbiana) - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

MAURER, F. P. *et al.* Advances in rapid identification and susceptibility testing of bacteria in the clinical microbiology laboratory: Implications for patient care and antimicrobial stewardship programs. **Infectious Disease Reports**, v. 9, n. 1, p. 18–27, 2017.

MENEZES, K. V. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from commercialized fresh cheese in the south of Espírito Santo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 2063–2071, 2023.

MONTEIRO, L. P. *et al.* Performance of the VITEK®2 advanced expert system™ for the validation of antimicrobial susceptibility testing results. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 40, n. 6, p. 1333–1335, 2021.

MURSYIDAH, R. M. *et al.* Isolation and Identification *Bacillus* Bacteria in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using the VITEK-2 Compact. **Earth and Environmental Science**, v. 718, n. 1, 2021.

- NERES, L. L. F. G. *et al.* Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de queijo artesanal. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 3, p. 20–29, 2019.
- NURFAJRIAH, S. *et al.* Antimicrobial Resistance and Molecular Identification of Clinical Multi-Drug Resistant *Enterobacter cloacae*. **Jurnal Biota: Biologi dan Pendidikan Biologi**, v. 14, n. 1, p. 11–20, 2021.
- OMS. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022**. Geneva: World Health Organization; 2022.
- OPLUSTIL, C. P. *et al.* **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 4. ed. [São Paulo]: Savier, 2020.
- OVIÑO, M.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. Maldi-Tof mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 39, n. 4, p. 192–200, 2021.
- PARTE, A. C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, 2020.
- PAVELQUESI, S. L. S. *et al.* Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella spp.* Isolated From Chilled Chicken Meat Commercialized at Retail in Federal District, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 86, n. 9, 2023.
- PERANTONI, L. M.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M. Evolução das Técnicas Diagnósticas em Microbiologia Clínica. **SALUSVITA**, v. 38, n. 2, p. 529–542, 2019.
- PERIN, A. P. *et al.* Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella sp.* isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 335–345, 2019.
- PINCUS, D. H. Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. **Encyclopedia of rapid microbiological Methods**, v. 1, p. 1-32, 2013.
- PIOVESAN, M. F. **A construção política da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2002. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.
- RAJARAJAN, M. *et al.* *Enterobacter cloacae* Keratitis: Clinicomicrobiological Profiles, Risk Factors, and Outcomes. **Cornea**, v. 41, n. 9, p. 1110–1115, 2022.
- RAMIREZ, D; GIRON, M. Enterobacter Infections. **StatPearls**, Flórida, 26 jun. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559296/>. Acesso em: 07 dez. 2023.
- RIO, A. D. *et al.* Comparison of genotypic and phenotypic antimicrobial profile in carbapenemases producing *Klebsiella pneumoniae*. **Acta Biomedica**, v. 94, n. 5, 2023.

- SANTOS, A. L. S. *et al.* First insights into clinical and resistance features of infections by *Klebsiella pneumoniae* among oncological patients from a referral center in amazon region, Brazil. **Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 3, p. 110–120, 2020.
- SANTOS, H. R. S. *et al.* Os impactos da legislação ambiental brasileira sobre as coleções biológicas. **Diversidade e Gestão**, v. 2, n. 2, p. 52–61, 2018.
- SANTOS, P. P.; SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 4, p. 1221–1227, 2006.
- SANTOS, R. (coord.). **Vigilância em Saúde (Parte 2)**: coleção para entender a gestão do SUS. 1. ed. v. 6. 2011.
- SANTOYO, R. M. R.; REYES, C. F.; RODRÍGUEZ, L. E. V. Características de patogenicidad en *Escherichia coli* aislada de tracto intestinal. **Investigación Científica**, v. 14, n. 2, p. 62–66, 2020.
- SILVA, J. A. A. DA; COSTA, E. A.; LUCCHESI, G. SUS 30 anos: Vigilância Sanitária. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 23, n. 6, p. 1953–1962, 2018.
- SILVA, J. R. DA; SILVEIRA, D. R.; TIMM, C. D. Fatores de patogenicidade de *Yersinia enterocolitica*. **Science and Animal Health**, v. 8, n. 3, p. 220–235, 2020.
- SILVA, M.; CHAME, M.; MORATELLI, R. Fiocruz biological collections: Strengthening Brazil’s biodiversity knowledge and scientific applications opportunities. **Biodiversity Data Journal**, v. 8, 2020.
- SILVA, J. F. M. *et al.* Contaminação por *Bacillus cereus* e os riscos de intoxicação alimentar. **Revista Desafios**, v. 5, n. 2, p. 30–40, 2018.
- SINGH, K. A.; RAI, R.; NAIR, S. S. Review on development of assigned value microbiological reference materials used in food testing. **Food Microbiology**, v. 102, 2022.
- SOLA, M. C. *et al.* Manutenção de Microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1398–1418, 2012.
- SOUSA, B. R. *et al.* Técnicas de Obtenção, Manutenção e Reativação de Culturas Microbianas. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 2, n. 3, p. 827–842, 2017.
- SOUZA, C. O. *et al.* *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 7, p. 79–91, 2016.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Observando micro-organismos através do microscópio. In: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2012. p. 54–75.
- WANG, X. *et al.* Development and application of an oligonucleotide microarray for the detection of food-borne bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 225–233, 2007.

WOO, P. C. Y. *et al.* 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, p. 908–934, 2008.

YOON, S.H. *et al.* Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613–1617, 2017.

**APÊNDICE A – LISTAGEM COMPLETA DAS CEPAS DA CBP SELECIONADAS  
PARA OS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS**

Microrganismo	ID
<i>Bacillus</i>	P4901
<i>Bacillus cereus</i>	P2806
<i>Bacillus cereus</i>	P3441
<i>Bacillus G+</i>	P2778
<i>Bacillus licheniformis</i>	P2814
<i>Bacillus megaterium</i>	P2637
<i>Bacillus sp.</i>	P0025
<i>Bacillus sp.</i>	P0039
<i>Bacillus subtilis</i>	P2808
<i>Bacillus subtilis</i>	P2809
<i>Bacillus subtilis</i>	P2810
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2369
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2375
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2370
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2376
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2382
<i>Escherichia coli</i>	P2672
<i>Escherichia coli</i>	P2673
<i>Escherichia coli</i>	P4396
<i>Escherichia coli</i>	P2447
<i>Escherichia coli</i>	P2391
<i>Escherichia coli</i>	P2425
<i>Escherichia coli</i>	P2442
<i>Escherichia coli</i>	P2436
<i>Escherichia coli</i>	P2410
<i>Escherichia coli</i>	P2368
<i>Escherichia coli</i>	P2411
<i>Escherichia coli</i>	P2429
<i>Escherichia coli</i>	P2428
<i>Escherichia coli</i>	P2435
<i>Escherichia coli</i>	P2750
<i>Escherichia coli</i>	P2437
<i>Escherichia coli</i>	P2441
<i>Escherichia coli</i>	P2421
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2206
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2378
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2204
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P5331
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2208
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2219

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2216
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2205
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2215
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2784
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2371
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2217
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2220
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2791
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2207
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2218
<i>Klebsiella sp.</i>	P1298
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2742
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2869
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2796
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2866
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2874
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2868
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2872
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2864
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2899
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2381
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2793
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2789
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2878
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2883
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2888
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2896
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2900
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	P2572
<i>Salmonella enterica subsp. enterica (O:6,7)</i>	P2571
<i>Salmonella enterica subsp. enterica (rugosa)</i>	P2756
<i>Salmonella ser. Brandenburg</i>	P2563
<i>Salmonella ser. Brandenburg</i>	P2565
<i>Salmonella ser. Brandenburg</i>	P2567
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2748
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	P2752
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2754
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2573
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2746
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2753
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2749
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2759
<i>Salmonella sp.</i>	P2747
<i>Salmonella sp.</i>	P3116



<i>Salmonella</i> sp.	P2761
<i>Salmonella</i> Typhimurium	P5432
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2340
<i>Staphylococcus aureus</i>	P1534
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2306
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2296
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2386
<i>Staphylococcus aureus</i>	P1423
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2387
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P1604
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P2317
<i>Staphylococcus</i> sp.	P0046
<i>Staphylococcus</i> sp.	P0028
<i>Yersinia frederiksenii</i>	P2036
<i>Yersinia intermedia</i>	P2037
<i>Yersinia kristensenii</i>	P2034

---

**APÊNDICE B – RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE VIABILIDADE**

Microorganismo	ID	Viabilidade
<i>Bacillus</i>	P4901	1,18 x 10 <sup>9</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	P2806	1,48 x 10 <sup>8</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	P3441	4,3 x 10 <sup>8</sup>
<i>Bacillus licheniformis</i>	P2814	4,4 x 10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus megaterium</i>	P2637	7,85 x 10 <sup>7</sup>
<i>Bacillus sp.</i>	P0039	8,9 x 10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	P2808	3,8 x 10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	P2809	1,48 x 10 <sup>8</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	P2810	3,5 x 10 <sup>8</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2370	1,07 x 10 <sup>9</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2382	6,75 x 10 <sup>8</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2369	4,3 x 10 <sup>8</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2375	2,26 x 10 <sup>8</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	P2376	3,25 x 10 <sup>8</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2672	8,9 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2673	1,32 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P4396	1,44 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2391	9,7 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2425	7,3 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2442	7,4 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2436	1,43 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2410	2,32 x 10 <sup>8</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2368	7,85 x 10 <sup>8</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2411	8 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2429	2,92 x 10 <sup>8</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2428	1,53 x 10 <sup>8</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2435	3,35 x 10 <sup>8</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2750	7,5 x 10 <sup>8</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2437	1,72 x 10 <sup>8</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2441	1,48 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	P2421	1,49 x 10 <sup>9</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2206	1,96 x 10 <sup>8</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2204	1,8 x 10 <sup>8</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P5331	1,65 x 10 <sup>8</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2208	1,15 x 10 <sup>8</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2219	3,05 x 10 <sup>7</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2216	> 10 <sup>7</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2205	1,36 x 10 <sup>8</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2215	1,06 x 10 <sup>9</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2784	1,98 x 10 <sup>9</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2371	1,58 x 10 <sup>9</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2217	1,59 x 10 <sup>9</sup>

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2220	3,2 x 10 <sup>6</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2791	2,25 x 10 <sup>8</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2207	3,75 x 10 <sup>8</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P2218	3,22 x 10 <sup>8</sup>
<i>Klebsiella sp.</i>	P1298	2,4 x 10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2869	4,8 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2796	2,88 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2866	5,65 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2874	2,68 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2868	1,75 x 10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2872	2,45 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2864	8,75 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2899	1,03 x 10 <sup>9</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2381	7,3 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2793	1,57 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2789	1,42 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2878	3,5 x 10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2883	2,51 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2896	9,90 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P2900	6,35 x 10 <sup>7</sup>
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	P2572	1,08 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	P2752	1,32 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> (O:6,7)	P2571	6,2 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> (rugosa)	P2756	7,1 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella ser. Brandenburg</i>	P2563	1,6 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella ser. Brandenburg</i>	P2565	5,05 x 10 <sup>7</sup>
<i>Salmonella ser. Brandenburg</i>	P2567	6 x 10 <sup>7</sup>
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2748	1,39 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2754	1,78 x 10 <sup>7</sup>
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2573	6,7 x 10 <sup>6</sup>
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2746	6,8 x 10 <sup>7</sup>
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2753	4,35 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2749	1,09 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella ser. Oranienbrug</i>	P2759	3,75 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella sp.</i>	P3116	3,8 x 10 <sup>8</sup>
<i>Salmonella Typhimurium</i>	P5432	2,97 x 10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2340	3,45 x 10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	P1534	2,83 x 10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2306	4,95 x 10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2296	5,5 x 10 <sup>7</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2386	1,42 x 10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	P1423	7,95 x 10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	P2387	4,15 x 10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P2317	7,15 x 10 <sup>7</sup>

<i>Staphylococcus sp.</i>	P0046	$2,37 \times 10^8$
<i>Yersinia frederiksenii</i>	P2036	$4,9 \times 10^6$
<i>Yersinia intermedia</i>	P2037	$3,3 \times 10^7$
<i>Yersinia kristensenii</i>	P2034	$3,7 \times 10^6$

---