

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

Livia Maria Rubem Vidal

**CARACTERIZAÇÃO DE COCOS GRAM POSITIVOS PROVENIENTES
DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS
ESTÉREIS REALIZADAS NO INCQS/FIOCRUZ**

Rio de Janeiro
2013

Livia Maria Rubem Vidal

**CARACTERIZAÇÃO DE COCOS GRAM POSITIVOS PROVENIENTES
DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS
ESTÉREIS REALIZADAS NO INCQS/FIOCRUZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Vidal, Livia Maria Rubem

Caracterização de cocos Gram positivos provenientes de análises Microbiológicas de produtos farmacêuticos estéreis realizadas no INCQS/FIOCRUZ / Livia Maria Rubem Vidal. – Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2013.

138 f., il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadora: Verônica Viana Vieira

1. Identificação. 2. *Micrococcus sp.* 3. Caracterização fenotípica. 4. Genes conservados. 5. Taxonomia Bacteriana.

Characterization of Gram Positive Cocci from Microbiological Analysis of sterile pharmaceutical products performed in INCQS/FIOCRUZ.

Livia Maria Rubem Vidal

**CARACTERIZAÇÃO DE COCOS GRAM POSITIVOS PROVENIENTES DE
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS ESTÉREIS
REALIZADAS NO INCQS/FIOCRUZ**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fabiano Lopes Thompson (Doutor)
Universidade do Federal do Rio de Janeiro

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Verônica Viana Vieira (Doutor) – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a minha família e em memória de uma pessoa muito especial, mais do que um grande amigo, Filipe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a minha orientadora Dra. Verônica Viana Vieira pela confiança depositada, paciência, disponibilidade e pelas centenas de conversas durante o trajeto Rio-Niterói. Obrigada por fazer parte da minha formação acadêmica.

Aos amigos do Setor de Identificação Bacteriana Elisa, João, Juliana, Paulo e Mariana pelo auxílio durante esses juntos e principalmente pela amizade. Vocês são muito especiais.

Aos professores que ministraram as aulas na pós-graduação.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismo pelo aprendizado adquirido durante a iniciação científica, em especial a amiga Rosa pelo apoio e carinho.

À CAPES pela bolsa durante os dois anos de estudo.

À minha família, em especial a minha mãe e ao meu irmão Pedro pelo apoio e incentivo durante todos esses anos.

Obrigada a todos que torceram por mim!

RESUMO

Os produtos farmacêuticos que requerem a característica de esterilidade devem ser submetidos ao Ensaio de Esterilidade que deve ser realizado em áreas limpas, a fim de evitar resultados falso-positivos. A legislação brasileira recomenda a identificação de microrganismos provenientes dos Ensaio e do ambiente onde estes foram realizados. A dificuldade da identificação de vários gêneros bacterianos por metodologias fenotípicas têm sido relatada em vários estudos e mostram a necessidade da utilização de metodologias moleculares para esta finalidade. Neste estudo foi realizada a caracterização fenotípica (API e VITEK BioMerieux) e genotípica (análise da sequência do gene 16S rRNA) de 58 estirpes de cocos Gram positivos não fermentadores da glicose, provenientes de produtos farmacêuticos estéreis e ambiente controlado. O resultado da caracterização fenotípica realizada utilizando o sistema VITEK demonstrou que 100% das identificações foram equivocadas quanto ao gênero e espécie bacteriana. O sistema API identificou corretamente 69% das estirpes quanto ao gênero bacteriano quando comparado com a análise da sequência do gene 16S rRNA. Vinte e cinco estirpes foram submetidas ao sistema VITEK 2 e 68% dessas foram identificados corretamente quanto ao gênero bacteriano. A análise da sequência do gene 16S rRNA mostrou-se eficiente na determinação do gênero e mostrou a diversidade bacteriana deste grupo de organismos. Entre os cocos Gram positivos não fermentadores da glicose analisados foram identificados os gêneros *Micrococcus*, *Kocuria*, *Demetria*, *Macrococcus*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Janibacter* e *Brachybacterium*. Essa análise também mostrou que 8,6% das estirpes avaliadas podem representar espécies ainda não descritas. Esta metodologia possibilita a diferenciação de quase todas as espécies do gênero encontrado com mais frequência, o *Micrococcus*, exceto o *Micrococcus yunnanensis* e *Micrococcus luteus*. Essas espécies também não puderam ser diferenciadas pela análise da sequência de segmentos de genes conservados (*rpoB*, *gyrB*, *groEL* and *recA*). Os equívocos das identificações fenotípicas alertam para a necessidade da implementação de metodologias moleculares para concluir a identificação correta de estirpes bacterianas provenientes de testes de esterilidade e ambientes controlados.

Palavras-chave: Identificação. Cocos Gram positivos. Genes conservados.

ABSTRACT

Sterile pharmaceutical products must be submitted to sterility testing to be carried out in clean rooms, in order to avoid false positive results. Brazilian law recommends the identification of microorganisms from sterility tests and the environment where these tests were performed. It has been reported in several studies difficulty in identifying various genera using phenotypic methods. This suggests the need of molecular methods which are more suitable for this purpose. In this study we performed phenotypic (API and VITEK systems (BioMerieux)) and genotypic (sequence analysis of 16S rRNA) characterization of 58 strains of Gram positive cocci non-fermenting glucose, from pharmaceuticals sterile and controlled environment. The results of phenotypic characterization performed using the VITEK system showed that 100% of the identifications of bacterial genus and species were misleading. The API system correctly identified the bacterial genus of 69% of the strains compared with the sequence analysis of 16S rRNA. Twenty-five strains were identified with the Vitek 2 system and 68% of the strains were identified with the correct bacterial genus. Sequence analysis of 16S rRNA gene was effective in determining the bacterial genus and also showed bacterial diversity of this group of organisms. Among the glucose non-fermenting Gram-positive cocci analyzed, the identified genera were: *Micrococcus*, *Kocuria*, *Demetria*, *Macrococcus*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Janibacter* and *Brachybacterium*. This analysis also showed that 8.6% of the strains tested may represent species not yet described. This methodology allowed the differentiation of almost all species of the genus *Micrococcus*, except *Micrococcus yunnanensis* and *Micrococcus luteus*. These species were also not differentiated by sequence analysis of fragments of housekeeping genes (*rpoB*, *gyrB*, *groEL* and *recA*). The mistake phenotypic identifications highlight the need of the implementation of molecular methods to achieve the correct identification of bacterial strains from sterility testing and controlled environments.

Keywords: Identification. Housekeeping gene. Gram positive Cocci.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Reassociação DNA-DNA.....	30
Figura 2 –	Curva de desnaturação do DNA homólogo e DNAs híbridos.....	31
Figura 3–	Dados gerais do Sistema Automatizado Vitek.....	63
Figura 4–	Dados gerais do Sistema Semi-Automatizado API STAPH.....	76
Figura 5–	Dados gerais do Sistema Automatizado VITEK 2.....	80
Figura 6 –	PFGE. Perfil de restrição obtido com a enzima <i>XbaI</i>	89
Figura 7 –	Diversidade microbiana encontrada no ambiente controlado. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA utilizando o método de Neighbor-Joining (p-distance).....	93
Figura 8 –	Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA do gênero <i>Arthrobacter</i> utilizando o método de Neighbor-Joining (p-distance).....	94
Figura 9 –	Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA do gênero <i>Micrococcus</i> utilizando o método de Neighbor-Joining (p-distance).....	95
Figura 10 –	Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA do gênero <i>Micrococcus</i> utilizando o método de Neighbor-Joining (p-distance).....	97
Figura 11 –	Árvore filogenética baseada nas sequências do gene <i>rpoB</i> do gênero <i>Micrococcus</i> utilizando o método de Neighbor-Joining (p-distance).....	98
Figura 12 –	Árvore filogenética baseada nas sequências do gene <i>gyrB</i> do gênero <i>Micrococcus</i> utilizando o método de Neighbor-Joining (p-distance).....	107
Figura 13 –	Árvore filogenética baseada nas sequências do gene <i>groEL</i> do gênero <i>Micrococcus</i> utilizando o método de Neighbor-Joining (p-distance).....	109
Figura 14 –	Árvore filogenética baseada nas sequências do gene <i>recA</i> do gênero <i>Micrococcus</i> utilizando o método de Neighbor-Joining (p-distance).....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem e data do isolamento das estirpes bacterianas.....	51
Tabela 2 – Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes conservados.....	57
Tabela 3 – Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API STAPH e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.....	64
Tabela 4 – Perfil bioquímico das estirpes de <i>Micrococcus</i> e <i>Kocuria</i> pelo sistema semi-automatizado API STAPH.....	78
Tabela 5 – Identificação fenotípica pelo sistema VITEK 2 e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.....	81
Tabela 6 – Perfil bioquímico das estirpes de <i>Micrococcus</i> e <i>Kocuria</i> pelo sistema automatizado VITEK 2.....	85
Tabela 7 – Identificação genotípica pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> e <i>groEL</i>	99
Tabela 8 – Caracterização fenotípica pelo API 50CH.....	114

LISTA DE SIGLAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*
ANDRA: Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis
ANI: Average Nucleotide Identity
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
BPF: Manual de Boas Práticas de Fabricação
BSA: Soro albumina bovina
DDH: Hibridization DNA-DNA
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: deoxirribonucleotídeo
ERIC: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
G-C: guanina e citosina
groEL: chaperonina
gyrB: DNA girasse subunidade beta
HCV: Hepatitis C Virus
HEPA: High-Efficiency Particulate Air
HGT: Horizontal Gene Transfer
HSP: Heat Shock Protein
INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISO: International Organization for Standardization
ISR: Intergenic Spacer Region
ITS: Internal Transcribed Spacer
JCM: Japan Collection of Microorganisms
LACEN: Laboratório Central
m³: metro cúbico
MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight
MLSA: Multilocus Sequence Analysis
MLST: Multilocus Sequence Typing
mm: milímetros
mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro
NBR: Norma Brasileira
NBR: Relative Binding Ratio
NCBI: *Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (EUA)*
ng: nanograma
p/v: peso por volume
pb: pares de bases
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PFGE: Pulsed-Field Gel electrophoresis
pH: potencial hidrogeniônico
PTFE: Polytetrafluoroethylene
PVDF: Polyvinylidene fluoride
RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
RDP: Ribosomal Database Project
REP: Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
recA: recombinase A
RNA: ácido ribonucléico
RNA: ácido ribonucléico
rpoB: RNA polimerase subunidade beta
rRNA: RNA ribossomal
16S rRNA: ácido ribonucléico ribossomal 16 svedberg
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SNVS: Sistema Nacional de Vigilância sanitária
SUS: Sistema Único de Saúde
Taq: DNA polimerase isolada de *Thermus aquaticus*
T_m: Temperatura de melting
tRNA: RNA transportador
TSA: Agar Triptona de Soja
TSB: Caldo Triptona de Soja
U: unidade
UFC: unidade formadora de colônia
ULPA: Ultra-Low Penetration Air

USP: United State Pharmacopeia

v/v: volume por volume

WHO: World Health Organization

ΔT_m : Diferença entre as temperaturas de melting

μL : microlitro

μM : micrometro

$^{\circ}\text{C}$: graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	15
1.2	FARMACOPEIA BRASILEIRA.....	16
1.2.1	Teste de esterilidade.....	17
1.2.2	Métodos analíticos: filtração por membrana e inoculação direta em meio de cultura.....	20
1.2.3	Ambiente controlado e sala limpa.....	21
1.2.4	Tecnologia alternativa ao processo asséptico.....	22
1.2.5	Interpretação dos resultados obtidos no teste de esterilidade.....	23
1.3	TAXONOMIA BACTERIANA	25
1.3.1	Definição e histórico.....	25
1.3.2	Definição de espécie bacteriana.....	26
1.4	CARACTERIZAÇÃO DE PROCARIOTOS	27
1.4.1	Caracterização fenotípica.....	28
1.4.2	Caracterização genotípica.....	29
1.5	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	38
1.5.1	Identificação molecular.....	39
1.6	COCOS GRAM POSITIVOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA	40
1.6.1	Outros cocos gram positivos.....	41
1.7	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS COMO CONTAMINANTES DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E EM AMBIENTES CONTROLADOS	42
1.7.1	Cocos gram positivos ambientais.....	44
1.7.2	O gênero <i>Micrococcus</i>	45
1.7.2.1	<i>Importância biotecnológica</i>	46
1.7.2.2	<i>Importância médica</i>	48
1.8	JUSTIFICATIVA	49
2	OBJETIVOS	50
3	METODOLOGIA	51
3.1	ESTIRPES BACTERIANAS.....	51
3.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	53
3.2.1	Api staph.....	53

3.2.2	Api 50CH.....	54
3.2.3	Vitek.....	55
3.2.4	Vitek 2.....	55
3.2.5	Crescimento bacteriano a 45°C.....	56
3.3	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....	56
3.3.1	Extração de DNA total.....	56
3.3.2	Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	56
3.3.3	Eletroforese em gel de agarose.....	58
3.3.4	Purificação dos produtos de PCR.....	58
3.3.5	Sequenciamento e análise das sequências nucleotídicas.....	59
3.3.6	Análise filogenética.....	59
3.3.7	Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5	CONCLUSÃO.....	116
	REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A Constituição Federal de 1988 afirma que a saúde é um direito social e que o Sistema Único de Saúde (SUS) é o meio de concretização desse direito. O conjunto de ações e serviços de saúde, prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais, da administração direta e indireta e das fundações mantidas pelo Poder Público, constitui o SUS (BRASIL, 1990). A Lei Orgânica da Saúde (Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990) regula, em todo território nacional, as ações e serviços de saúde, esta afirma que a vigilância sanitária é uma das competências do SUS. Desta forma, compete ao SUS executar as ações de vigilância sanitária e controlar, fiscalizar procedimentos, produtos e substâncias de interesse para a saúde. A definição de vigilância sanitária, apregoada pela Lei nº 8.080 passa a ser, nesse contexto, conforme o artigo 6º, parágrafo 1º, a seguinte:

Entende-se por vigilância sanitária um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo:
I - o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo;
II - o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde. (BRASIL, 1990, p.3)

Essa definição amplia o seu campo de atuação, pois, ao ganhar a condição de prática capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, torna-se uma prática com poder de interferir em toda a reprodução das condições econômico-sociais e de vida, isto é, em todos os fatores determinantes do processo saúde–doença (EDUARDO, M.; MIRANDA, I., 1998).

O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), definido pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, é um instrumento de que o SUS dispõe para realizar seu objetivo de prevenção e promoção da saúde (BRASIL, 1999). O Sistema engloba unidades nos três níveis de governo federal, estadual e municipal. No nível federal,

estão a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz). No nível estadual, estão o órgão de vigilância sanitária e o Laboratório Central de Saúde (Lacen) de cada uma das 27 Unidades da Federação. No nível municipal, estão os serviços de Vigilância Sanitária dos 5561 municípios brasileiros, muitos dos quais ainda em fase de organização (ANVISA, 2013).

A Lei nº 6.360 dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, definidos na Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973 (BRASIL, 1976; BRASIL, 1973). Nesta consta um conjunto de normas estabelecidas a respeito do registro, autorização de empresas dentre outras providências a fim de garantir a qualidade dos produtos. A RDC nº 17 estabelece os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Medicamentos de uso humano durante as inspeções sanitárias (BRASIL, 2010). Desta forma, as ações de vigilância sanitária têm como objetivo eliminar, diminuir e/ou prevenir riscos e agravos à saúde do indivíduo e da coletividade.

1.2 FARMACOPEIA BRASILEIRA

A Farmacopeia Brasileira que é o Código Oficial Farmacêutico do País estabelece os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde. Tendo a finalidade de promover a saúde da população, estabelecendo requisitos de qualidade e segurança dos insumos para a saúde, especialmente dos medicamentos, apoiando as ações de regulação sanitária e induzindo ao desenvolvimento científico e tecnológico nacional (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Atualmente, todas as edições anteriores da Farmacopeia Brasileira foram revogadas pela RDC nº 49/2010 e desde dezembro de 2010 a 5ª edição passou a vigorar. A partir desta data os insumos farmacêuticos, os medicamentos e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária devem atender às normas e especificações estabelecidas na 5ª Edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos

gerais inscritos na Farmacopeia Brasileira, pode-se adotar a última edição de um dos seguintes compêndios internacionais segundo a RDC nº 37/2009: Farmacopeia Alemã, Farmacopeia Americana, Farmacopeia Argentina, Farmacopeia Britânica, Farmacopeia Europeia, Farmacopeia Francesa, Farmacopeia Internacional (OMS), Farmacopeia Japonesa, Farmacopeia Mexicana e Farmacopeia Portuguesa (BRASIL, 2009).

Neste documento também está estabelecido que seja realizado o ensaio de esterilidade para produtos farmacêuticos e artigos de saúde considerados estéreis, sendo que esses não devem apresentar células viáveis ou endosporos de microrganismos em sua composição. A Farmacopeia Brasileira em vigor segue as mesmas normas descritas nas Farmacopeias Americana, Japonesa e Europeia (U.S. PHARMACOPEIA, 2011, JAPANESE PHARMACOPEIA, 2006, EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007) com relação ao ensaio de esterilidade. Desta forma, a observação e interpretação dos resultados são realizadas da mesma maneira segundo as Farmacopeias Americana, Japonesa e Europeia.

1.2.1 Teste de esterilidade

O teste de esterilidade aplica-se a insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos para saúde que, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), devem ser estéreis, devido ao risco de infecção associado à administração desses produtos principalmente como parenterais e oftalmológicos. Este teste é adequado para revelar a presença de bactérias e fungos. Entretanto, o resultado satisfatório indica que não foi encontrado microrganismo contaminante na amostra examinada. A garantia sobre a esterilidade de um produto exigiria que todas as unidades de um lote fossem submetidas ao teste de esterilidade, como este procedimento não é

viável, a extensão do resultado da análise ao restante do lote requer a segurança de que todas as unidades do mesmo tenham sido preparadas de modo a garantir que todo lote possa ser representado pela amostra analisada. Para isso é importante que sejam tomadas precauções durante os processos operacionais da fabricação, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010, BRASIL, 2010, BUGNO, 2001).

A esterilização terminal de um produto embalado é um procedimento que garante os riscos mínimos de contaminação microbiana de um lote. Contudo,

algumas classes de produtos não podem ser esterilizados no seu acondicionamento final, e por isso devem ser preparados por processamento asséptico. Esse processo é projetado de maneira a prevenir a contaminação dos componentes estéreis por microrganismos viáveis durante a produção (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O teste de esterilidade realizado no produto final deve ser considerado apenas como uma das últimas medidas de controle utilizadas para assegurar a esterilidade do produto (BRASIL, 2010). O número de amostras analisadas depende do tamanho do lote, a menos que esteja especificado na monografia individual o número exato, na Farmacopeia consta que o número de unidades do lote a serem analisadas varia de acordo com a quantidade e o tipo de produto (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O teste deve ser realizado por pessoas treinadas e qualificadas em um ambiente controlado de acordo com a norma NBR ISO 14644-1 de 2005, sob condições assépticas, utilizando capela de fluxo laminar classe II tipo A (máximo 3520 partículas \geq a $0,5 \mu\text{m}^3$) em uma sala limpa classe B - ISO 7 (máximo 352 000 partículas \geq a $0,5 \mu\text{m}^3$ em suspensão no ar e 10 UFC/ m^3 - unidades formadoras de colônia por metro cúbico por amostragem ativa do ar ou 5 UFC/4 horas por placas de sedimentação com diâmetro de 90 mm) (KRPPNER, 2010, PINTO; KANEKO; OHARA, 2003, ABNT NBR ISO14644-1, 2005).

Os testes de esterilidade de fármacos oncogênicos, mutagênicos, antibióticos, hormônios, esteróides e outros estes devem ser realizados na capela classe II tipo B2, já que essa possui um sistema de exaustão externo ao ambiente do laboratório. Os testes não devem ser realizados sob exposição direta de luz ultravioleta ou em áreas sob tratamento com aerossóis. As condições devem ser adequadas de forma a evitar contaminação acidental da amostra durante o teste e, também, não afetar a detecção de possíveis contaminantes. Além disso, devem ser realizados regularmente o controle ambiental da área de trabalho, o controle do ar e de superfícies, contagens de partículas, determinação de velocidade e direção do fluxo de ar (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O meio de cultura utilizado no teste deve oferecer condições de crescimento para os mais diversos microrganismos com exigências diferentes (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). No teste de esterilidade os meios de cultura utilizados são: o meio fluido de tioglicolato e o caldo de caseína-soja. O tioglicolato é utilizado para cultura de bactérias anaeróbicas, embora possa detectar também o crescimento de bactérias aeróbicas, já o caldo caseína-soja é empregado para a cultura de

leveduras, fungos e bactérias aeróbicas. Os meios de cultura devem ser preparados de acordo com o recomendado pela Farmacopeia, porém formulações desidratadas também podem ser empregadas. Ambos devem cumprir com os requisitos dos Testes de promoção de crescimento, além de serem esterilizados por um processo validado. Nos casos em que os meios de cultura são utilizados para o teste de esterilidade de penicilinas e cefalosporinas a preparação dos meios deve ser modificada conforme preconiza a Farmacopeia (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Previamente ao teste de esterilidade de insumos farmacêuticos, medicamentos ou produtos para saúde, o teste de validação para bacteriostase e fungistase deve ser realizado. De modo a garantir que qualquer atividade bacteriostática ou fungistática inerente ao produto não tenha influência sobre a confiabilidade do teste, demonstrando assim que o procedimento utilizado é adequado para o produto sob exame. Este teste deve ser realizado quando o ensaio de esterilidade for realizado pela primeira vez para um produto e sempre que houver modificações na formulação do produto e/ou nas condições experimentais do teste. A validação deve ser feita previamente ao teste de esterilidade do produto em análise (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O teste de esterilidade pode ser realizado utilizando dois métodos de acordo com a forma de inoculação da amostra ao meio de cultura: o método de filtração em membrana (inoculação indireta) ou de inoculação direta conforme a natureza do produto, exceto quando um dos métodos for especificado na monografia individual. O controle negativo deve estar incluso no teste. Antes da realização do teste, a desinfecção das superfícies externas dos frascos e ampolas deve ser realizada, mergulhando-os em solução antisséptica adequada ou utilizando outros procedimentos de desinfecção externa das embalagens como, por exemplo, vapores de peróxido de hidrogênio. Para artigos cujas embalagens não resistam a esse tratamento, a assepsia deve ser feita por meio de tecido não liberador de partículas embebido em solução antisséptica (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010, BUGNO, 2001).

1.2.2 Métodos analíticos: filtração em membrana e inoculação direta em meio de cultura

No método de filtração são utilizadas membranas filtrantes com porosidade nominal não superior a 0,45 μm cuja eficiência em reter microrganismos tenha sido estabelecida. Os filtros de nitrato de celulose são utilizados para soluções aquosas, oleosas e fracamente alcoólicas e filtros de acetato de celulose são empregados para soluções fortemente alcoólicas. Filtros especialmente adaptados podem ser requeridos para determinados produtos, como antibióticos. Para produtos oncológicos extremamente agressivos, a membrana de éster de celulose deve ser substituída por difluoreto de polivinilideno (PVDF) ou politetrafluoroetileno (PTFE) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O dispositivo de filtração e a membrana são estéreis, sua configuração é adequada de forma que a solução a ser examinada possa ser introduzida, filtrada e a membrana possa ser removida sob condições assépticas. Após a remoção, a membrana é transferida para o meio de cultura ou o meio de cultura pode ser adicionado ao próprio dispositivo. O tipo de fluido empregado na lavagem da membrana depende da natureza do produto, sendo especificado na monografia individual quando necessário. Os controles negativos devem ser incluídos para os fluidos e solventes utilizados, nestes não se deve observar crescimento microbiano. Além disso, os fluidos utilizados não devem apresentar atividade antimicrobiana nas condições do teste e isto deve ser verificado. Dependendo do tipo de amostra como soluções oleosas, sólidos solúveis, antibióticos sólidos existe um procedimento específico a ser empregado na filtração por membrana (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

No método de inoculação o produto é transferido de forma direta e assepticamente para os meios de cultura. A quantidade de produto a ser transferido para o meio de cultura é especificada pela Farmacopeia, de modo que não seja maior que 10% do volume do meio de cultura, exceto quando especificado de maneira diferente na monografia individual. No caso do fármaco apresentar atividade antimicrobiana, o teste deve ser realizado após a neutralização da atividade com uma substância neutralizante adequada ou por diluição em quantidade suficiente de meio de cultura. A transferência da amostra pode ser realizada com auxílio de pipeta ou seringa para produtos líquidos ou espátula para sólidos. Produtos sólidos podem

ser diluídos em solução estéril, esta solução ou suspensão é transferida para o meio de cultura. O método de inoculação direta é simples, mas dependendo da natureza da amostra, procedimentos prévios são necessários, por exemplo, amostras lipófilas imiscíveis no meio de cultura (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

1.2.3 Ambiente controlado e sala limpa

O ensaio de esterilidade é realizado em ambientes controlados, onde a concentração de partículas em suspensão no ar e viáveis e não viáveis são controladas. Este ambiente é construído e utilizado de maneira a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas dentro da sala, na qual outros parâmetros relevantes como, por exemplo, temperatura, umidade e pressão, são controladas conforme necessário (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A classificação de limpeza do ar de salas e zonas limpas é regulada pela norma ABNT NBR ISO14644-1, por meio da análise de concentração de partículas em suspensão no ar. A parte 4 desta norma descreve como uma sala limpa deve ser projetada, construída e preparada para utilização. Sala e zona limpa são definidas por certificação de acordo com a norma aplicável, sendo que os parâmetros avaliados incluem integridade de filtros, diferenciais de pressão e velocidade, padrões e mudanças do ar (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010, ABNT NBR ISO14644-1, 2005, ABNT NBR ISO14644-4, 2001).

O monitoramento de partículas viáveis é importante para alcançar as exigências relativas ao ambiente controlado e qualidade microbiológica dos produtos produzidos nesse ambiente, embora não forneça informação a respeito do conteúdo microbiológico do ambiente. Os ambientes controlados estão sujeitos a um programa de avaliação microbiológica, onde é realizado o monitoramento de partículas em suspensão no ar. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O monitoramento pode ser realizado método passivo, onde placas de sedimentação são expostas por um período máximo de 1 hora na altura de trabalho, estas monitoram a contaminação transportada pelo ar. Porém, os resultados não fornecem informação quantitativa e podem ser influenciados pela movimentação do ar durante operação. O método ativo emprega amostradores de ar, onde certo volume de ar é amostrado e este é acelerado até a superfície de uma placa com meio de cultura. O

resultado fornecerá informação quantitativa a respeito do número de UFC (unidades formadoras de colônia) por volume de ar amostrado (BUGNO, 2001).

Os programas de monitoramento microbiológico devem avaliar a efetividade das práticas de limpeza e desinfecção que apresentam impacto sobre a carga microbiana do ambiente. Esse monitoramento microbiológico não identifica nem quantifica todos os contaminantes microbianos presentes no ambiente, mas o monitoramento de rotina pode fornecer informação se o ambiente está operando dentro do controle adequado. O nível de alerta no monitoramento microbiológico ambiental apresenta contaminação significativamente superior às condições de operação normais. Quando excedido o nível de alerta, este não necessariamente deve exigir ação corretiva, mas deve ser realizada uma investigação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

No programa de controle ambiental a identificação das estirpes microbianas é importante para o conhecimento dos microrganismos presentes no ambiente controlado, e para definir a eficácia dos procedimentos de limpeza e desinfecção (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Além disso, a identificação ao nível de espécie dessas estirpes pode ser utilizada para correlacionar com os contaminantes encontrados no teste de esterilidade (SUTTON; CUNDELL, 2004). Segundo o Manual de Monitoramento Ambiental em Salas Limpas e Instalações de Produção de Vacinas da Organização Mundial de Saúde deve ser realizada a identificação ao nível de espécie dos microrganismos encontrados no monitoramento ambiental, quando o limite de partículas viáveis for excedido. A detecção frequente de um microrganismo indica uma fonte de contaminação, a emergência de microrganismos resistentes a desinfetantes ou contaminação pelo operador podem estar associados à contaminação (WHO, 2012).

1.2.4 Tecnologia alternativa ao processo asséptico

A tecnologia dos isoladores tem sido utilizada para minimizar a intervenção humana nas áreas de produção e processamento reduzindo o risco de contaminação microbiana dos produtos fabricados assepticamente do ambiente (WHO, 2011). Este equipamento é capaz de proteger o produto da contaminação do ambiente e do manipulador (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os isoladores devem ser empregados após um processo de validação apropriado, no qual os

fatores de risco associados a esta tecnologia são levados em consideração como a qualidade do ar no interior e exterior do isolador e sanitização do mesmo (WHO, 2011, BRASIL, 2010).

O isolador não permite trocas entre ambientes protegidos e não protegidos, estes podem ser fisicamente selados contra a entrada de contaminantes externos ou podem ser efetivamente selados pela aplicação contínua de sobre pressão. A manipulação de material por funcionários é realizada por meio de luvas ou vestimentas completas ou parciais. O ar que entra no isolador passa através de um filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) ou ULPA (Ultra Low Penetration Aerosol) e a exaustão de ar normalmente passa por um filtro HEPA. Vapores de peróxido de hidrogênio ou ácido peracético normalmente são usados para esterilização das superfícies ou ambiente interno. A esterilização do interior dos isoladores e todo conteúdo são normalmente validados para um nível de garantia de esterilidade de 10^{-6} , ou seja, não mais que uma unidade contaminada em um milhão de unidades produzidas. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os sistemas de isoladores apresentam um custo de manutenção menor comparado a uma sala limpa e maior segurança no teste de esterilidade para resultados falso-positivos (ADISSI, 2002). A Norma NBR ISO 14644-7 dispõe sobre os requisitos mínimos para construção, instalação e teste dos dispositivos de separação (compartimentos de ar limpo, mini-ambientes e isoladores) (ABNT NBR ISO 14644-7, 2004).

1.2.5 Interpretação dos resultados obtidos no teste de esterilidade

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, os tubos em análise do teste de esterilidade devem ser incubados por 14 dias. Durante este período, os tubos devem ser examinados quanto às evidências macroscópicas de crescimento microbiano (turvação do meio de cultura). Se, ao final do período de incubação, não houver evidências de crescimento microbiano, a amostra é considerada satisfatória para o ensaio de esterilidade. Mas, caso seja observado crescimento microbiano nos tubos em análise, a amostra não cumpre com o requisito de esterilidade, a não ser que se evidencie falha durante a execução do teste como, por exemplo, contaminação não relacionada com o produto em análise (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O teste de esterilidade pode ser considerado inválido se uma ou mais das

seguintes condições forem observadas: i) Os dados de monitoramento microbiológico da área de realização do teste apresentarem falha; ii) A revisão dos procedimentos analíticos utilizados durante o teste revelarem falha; iii) Houver crescimento microbiano nos controles negativos; iv) Após a identificação do microrganismo(s) isolado(s) no teste, o crescimento dessa espécie(s) possa ser atribuído a falhas relacionadas ao material utilizado e/ou a técnicas utilizadas durante o teste de esterilidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Caso considerado inválido, o teste de esterilidade deve ser repetido com o mesmo número de unidades do teste inicial. Após a repetição do teste, se não houver crescimento microbiano, a amostra cumpre com o requisito de esterilidade. Mas, se for observado crescimento microbiano, a amostra é considerada insatisfatória para o teste de esterilidade. Os microrganismos recuperados no teste devem ser identificados e segundo Farmacopeia Brasileira, as técnicas microbiológicas que utilizam a bioquímica convencional são geralmente eficientes na identificação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A Farmacopeia Brasileira recomenda a utilização de métodos moleculares para determinar se duas estirpes pertencem a um mesmo clone e possuem origem comum. Enquanto que as técnicas de identificação microbiológicas baseada na bioquímica podem demonstrar que duas estirpes não são idênticas. A metodologia de amplificação de ácidos nucleicos descrita na Farmacopeia cita o princípio do método, procedimento, avaliação e interpretação dos resultados e garantia da qualidade. Mas, apenas a aplicação desta metodologia para detecção de RNA contaminante do HCV (hepatites C vírus ou vírus da hepatite C) em misturas de plasma é descrita (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A identificação dos microrganismos detectados no ensaio de esterilidade e nas áreas limpas podem fornecer pistas elucidativas sobre a fonte de contaminação microbiana do produto analisado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Nas indústrias farmacêuticas, a identificação bacteriana em áreas limpas é exigida por diversas razões associadas à garantia da qualidade (BRASIL, 2010).

1.3 TAXONOMIA BACTERIANA

1.3.1 Definição e histórico

A taxonomia é uma disciplina essencial na Biologia, pois proporciona um sistema de referência para todo o conhecimento biológico. Para os procariotos compreende a classificação, identificação e nomenclatura (GEVERS et al., 2006). A classificação é responsável por agrupar os organismos (taxa) de acordo com a similaridade morfológica, bioquímica, fisiológica, genética e relacionamento filogenético. A nomenclatura lida com a atribuição de nomes aos grupos taxonômicos de acordo com as regras internacionais (International Code of Nomenclature of Bacteria). A identificação determina a identidade da estirpe como membro de um taxon descrito ou como uma espécie não identificada previamente (GEVERS et al., 2006, TINDALL et al., 2010, BERGEY, 1986).

Desde o início, os cientistas procuraram estabelecer um sistema de classificação de procariotos que refletisse as relações naturais e evolutivas. Atualmente, classificação bacteriana ainda é bastante discutida entre os taxonomistas, e tem sido sugerido que a filogenia entre espécies bacterianas possa ser melhor compreendida se considerada como uma rede (KUNIN et al, 2005). Ao longo da história da sistemática de procariotos, diversas tecnologias foram desenvolvidas e introduzidas para auxiliar na definição de espécie (GEVERS et al., 2006).

A chamada taxonomia clássica teve como base para a classificação critérios morfológicos e fisiológicos (PRAKASH et al., 2007). De acordo com a 8ª Edição do Manual de Bergey's (1974), a classificação bacteriana era baseada na morfologia, coloração de Gram e requerimento de oxigênio, porém o relacionamento filogenético entre as linhagens não era levado em consideração (SCHLEIFER, 2009). Essa forma de classificação dos microrganismos resultou na formação de grupos taxonômicos heterogêneos e muitas vezes artificiais (THOMPSON, 2009). A taxonomia numérica (SNEATH; SOKAL, 1973) surgiu em paralelo com o desenvolvimento computacional, o que permitiu realizar a comparação de um grande número de características fenotípicas para um grande número de cepas. Através de uma matriz de dados, o grau de similaridade das cepas era estimado. A taxonomia

numérica mostrou-se relevante devido à análise de muitas características fenotípicas que refletiam alguma informação genética (VANDAMME et al., 1996).

A classificação baseada na abordagem polifásica é uma tendência na taxonomia bacteriana. Este conceito foi proposto por Colwell em 1970, e integra diversas informações como fenotípica, genotípica e química para uma classificação mais adequada.

A análise do gene RNA ribossomal (rRNA) revolucionou a classificação dos organismos vivos, assim o sequenciamento da subunidade ribossomal menor 16S rRNA possibilitou um grande avanço na taxonomia bacteriana (WOESE, 1987, WOESE, KANDLERT, WHEELIS, 1990). A partir deste estudo o gene 16S rRNA passou a ser empregado para classificação de procariotos e estudos filogenéticos (ROSSELLÓ-MORA, 2005).

Vandamme e colaboradores (1996) consideram também a utilização de informação filogenética em sua interpretação de taxonomia polifásica. Com a utilização de metodologias moleculares como análise da sequência do gene 16S rRNA e reassociação DNA-DNA o conceito de espécie bacteriana foi refinado (PRAKASH, 2007).

1.3.2 Definição de espécie bacteriana

A definição de espécie bacteriana é baseada no critério proposto por Wayne e colaboradores (1987). Assim, espécie bacteriana pode ser definida como conjunto de cepas que compartilham um grau de similaridade fenotípica e um valor de similaridade igual ou superior a 70% na hibridização DNA-DNA (DDH) e mais de 97% de similaridade na sequência do gene 16S rRNA (WAYNE et al., 1987, KOSTANTINOS et al., 2006, ROSSÉLLO-MORA; AMANN, 2001). A definição com base no valor de DDH é pragmática e universal para o domínio Bacteria. Apesar de criticada devido à dificuldades da metodologia, a hibridização DNA-DNA é considerada metodologia “padrão-ouro” para definição de espécie (KOSTANTINOS et al., 2006, GORIS et al., 2007). Vandamme e colaboradores (1996) sugerem que pode ser necessário relaxar o critério de 70% DDH para algumas espécies.

Goris e colaboradores (2007) verificaram que a similaridade de 70% DDH é correspondente a 95% da average nucleotide identity (ANI), a ANI é uma média de identidade nucleotídica do genoma total entre duas cepas. Estudos sugerem que a

ANI é um método robusto e sensível para medir o relacionamento evolutivo entre duas cepas bacterianas relacionadas (KOSTANTINOS et al., 2006).

Apesar de ser amplamente aceita a definição polifásica de espécie, esta ainda é discutida, pois não é baseada na teoria evolutiva e as fronteiras entre as espécies são arbitrárias. Michel Vos (2010) propõe definir espécie bacteriana baseada na divergência adaptativa. Este conceito é baseado na teoria evolutiva, especificamente no modelo ecotipo estável, e incorpora os processos de descendência evolutiva, adaptações ecológicas e recombinação homóloga.

Staley (2009) propõe um conceito baseado em filogenômica. Este conceito é baseado na teoria filogenética onde a evolução dos microrganismos é inferida pela análise de genes e proteínas. Embora diversos autores sugiram novos conceitos para definição de espécie bacteriana, a classificação atual baseia-se no modelo operacional, a chamada abordagem polifásica. Um novo conceito no futuro pode vir a surgir que considere eventos de recombinação e transferência horizontal de genes, mas atualmente o efeito do fluxo gênico ainda não é claro. Embora esses eventos ocorram as características genóticas e fenotípicas de um taxon ainda são mantidas, e são insuficientes para a classificação e identificação de bactérias (SCHLEIFER, 2009).

Para muitos microbiologistas, espécie bacteriana é uma entidade real que pode ser reconhecida como grupos de genótipos (PALYS, NAKAMURA, COHAN, 1997). Se a espécie existe como grupos genotipicamente bem resolvidos, eles poderiam ser definidos mais naturalmente, uma vez que na prática espécie é definida segundo regras e valores de corte (HANAGE, FRASER, SPRATT, 2006).

1.4 CARACTERIZAÇÃO DE PROCARIOTOS

A Taxonomia apresenta três “elementos chave”: classificação, caracterização e nomenclatura. Esses elementos são campos dinâmicos, mas um depende de outro. Assim, a nomenclatura de um grupo de microrganismos depende da maneira como eles são classificados e a classificação vai depender de como aquele microrganismo foi caracterizado. A nomenclatura é regida pelo Código Bacteriológico, já a classificação e caracterização de procariontes não são formalmente regulamentadas e sofreram grandes mudanças nos últimos 50 anos (TINDALL et al., 2010).

A caracterização de procariotos segundo a taxonomia polifásica é baseada em dois tipos de abordagens: fenotípico e genotípico. A caracterização fenotípica inclui características morfológicas, fisiológicas e químicas, já a genotípica baseia-se na análise do material genético do microrganismo (SCHLEIFER, 2009).

1.4.1 Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica formou a base da descrição e caracterização microbiana. A caracterização morfológica inclui a observação da forma bacteriana, formação de esporo, presença de flagelo, coloração de Gram, textura, opacidade e aparência da margem da colônia. As características fisiológicas e bioquímicas incluem condições de crescimento em diferentes temperaturas, valores de pH e concentração salina; motilidade; produção de pigmentos e metabolismo respiratório. Tais características são muito utilizadas, contudo representam um pequeno número de características visíveis do microrganismo. Além disso, tais características podem não refletir o relacionamento filogenético dos procariotos. Porém, a experiência de um microbiologista associada a informações da morfologia, condições de cultivo, informação clínica e ecológica e o sítio de isolamento do espécime clínico servem de ponto de partida na caracterização de uma estirpe (MOORE et al., 2010, VANDAMME et al., 1996).

Os testes fisiológicos fornecem um perfil bioquímico baseado na utilização de substratos fornecendo informação a respeito da atividade metabólica daquele microrganismo. Diversos testes comerciais foram desenvolvidos, contudo esses testes incluem um limitado número de taxa que englobam principalmente espécies bacterianas de interesse clínico, a reprodutibilidade e compatibilidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios é outro problema, que pode ser minimizado através de protocolos bem padronizados (MOORE et al., 2010). A comparação do perfil de proteínas totais pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) demonstrou ser confiável para agrupar cepas relacionadas. Diversos estudos revelaram uma correlação entre elevada similaridade do perfil de proteínas totais e DDH (VANDAMME et al., 1996).

A caracterização química (chemotaxonomy) avalia diversos componentes estruturais da célula procarionte como parede celular, membrana celular e citoplasma. Diferenças no peptídeo glicano, ácidos graxos, lipídeos polares, ácidos

teicóicos, ácidos micólicos e quinonas respiratórias podem ser detectados (TINDALL et al., 2010). Esse tipo de análise é importante na diferenciação sistemática e pode ser associada ao relacionamento filogenético dos taxa (MOORE et al., 2010).

O desenvolvimento da espectrometria de massa Matrix-Assisted Laser Desorption- Ionisation Time of Flight (MALDI-TOF) para caracterização de microrganismos tem sido revisada e discutida. Em geral, a análise pode ser realizada a partir de células totais, células lisadas ou extrato bacteriano. Um espectro a partir da análise das proteínas é produzido, esse perfil é comparado a um banco de dados de referência para a identificação. Essa metodologia tem sido utilizada para identificação bacteriana e de leveduras. Alguns estudos demonstraram que o método é acurado e reprodutível, com baixo custo e tempo de preparo. Sendo uma metodologia com potencial para substituir as identificações fenotípicas nos laboratórios de microbiologia clínica (MELLMANN et al., 2008, BIZZINI et al., 2010, STEVENSON et al., 2010).

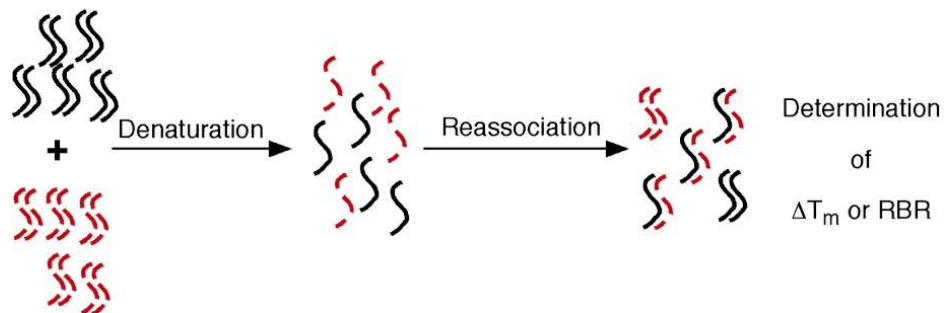
1.4.2 Caracterização genotípica

As técnicas moleculares baseadas na análise do DNA têm sido utilizadas em diversos trabalhos de taxonomia e tipagem bacteriana, bem como para compreensão dos mecanismos evolutivos (GÜRTLER; MAYALL, 2001). A primeira metodologia empregada foi a determinação conteúdo guanina-citosina (% mol G-C) do genoma recomendada para classificação em níveis taxonômicos elevados e descrição de táxon bacteriano. O conteúdo % G-C é importante na caracterização da natureza genômica, a porcentagem G-C no genoma procarioto pode variar de 26 a 76%. Pela metodologia, uma diferença de mais de 10% mol G-C considera-se gêneros diferentes e menos de 3% como sendo a mesma espécie. (SCHELEIFER, 2009, PRAKASH et al., 2007).

A hibridização DNA-DNA (DDH) considerada metodologia “padrão-ouro” para definição de espécie bacteriana, é baseada na comparação entre dois genomas. Esta metodologia não quantifica diretamente a identidade entre as sequências, mas sim a eficiência de hibridização entre as moléculas de DNA (KONSTANTINOS et al., 2006) (Figura 1). Para realizar esta metodologia é necessário que as cepas em análise tenham uma similaridade acima de 97% na sequência do gene 16S rRNA (TINDALL et al., 2010). Segundo Erko Stackebrandt e Ebers (2006) o critério de

similaridade do gene 16S rRNA seria acima de 98,7%. Sob condições controladas moléculas de DNA de diferentes organismos podem se reassociar, formando um DNA híbrido. Essa reassociação depende da semelhança entre as sequências nucleotídicas, e a comparação entre as misturas DNA híbrido e DNA homólogo ou puro produz um grau de similaridade entre os genomas. Dois parâmetros podem ser utilizados para quantificar o grau de similaridades: ΔT_m (diferença entre as temperaturas de *melting*) e taxa relativa de ligação (*relative binding ratio* – RBR) (ROSÉLLO-MORA; AMANN, 2001).

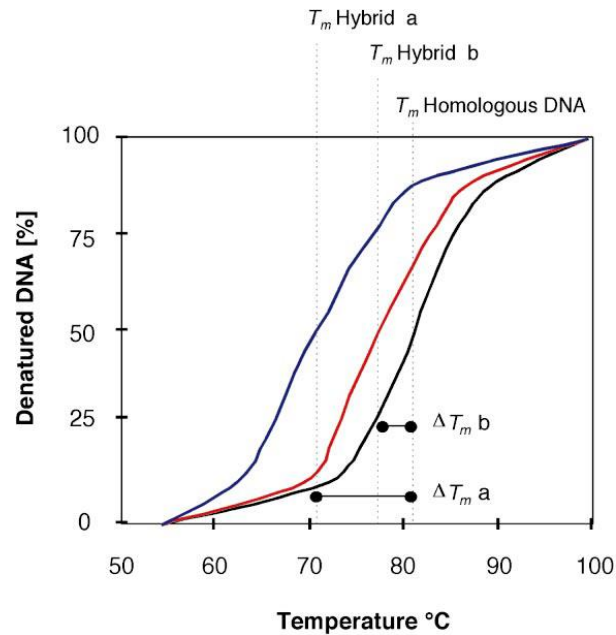
Figura 1: Reassociação DNA-DNA



fonte: (ROSÉLLO-MORA; AMANN, 2001).

O RBR reflete uma quantidade relativa de DNAs híbridos em comparação com a de DNA homólogo, que é considerado 100% de reassociação. O ΔT_m reflete a estabilidade térmica da fita dupla de DNA. A desnaturação do DNA pode ser influenciada por três fatores: %mol G-C, força iônica da solução em que o DNA esteja dissolvido e temperatura. Na desnaturação da fita dupla de DNA a temperatura na qual 50% das moléculas estão desnaturadas é denominada temperatura de *melting* T_m . Como a ligação entre a dupla fita do DNA híbrido é mais frágil, este tende a desnaturar a uma temperatura inferior comparado ao DNA puro (Figura 2). Logo, o ΔT_m é uma diferença entre o T_m do DNA homólogo com o T_m do DNA híbrido. Os valores de NBR 70% ou maior ou um ΔT_m menor ou igual a 5°C são utilizados para o delineamento de espécies (ROSÉLLO-MORA; AMANN, 2001). A hibridização pode ser feita em duas condições, $T_m-30^\circ\text{C}$ (condição ótima) ou $T_m-15^\circ\text{C}$ (condição supra-ótima), no caso de cepas estreitamente relacionadas.

Figura 2: Curva de desnaturação do DNA homólogo e dois DNAs híbridos.



fonte: (ROSÉLLO-MORA; AMANN, 2001).

Contudo, a técnica de DDH é trabalhosa e poucos laboratórios dispõem desta metodologia. Uma alternativa a DDH também chamada de índice do genoma, a ANI (Average Nucleotide Identity) calculada através da comparação par-a-par do genoma, apresenta correlação confiável com os resultados de DDH, onde 95-96% de ANI refletiria 70% DDH (TINDALL et al., 2010).

Na década de 1980, o sequenciamento de genes rRNA demonstrou ser muito útil como marcador molecular em análises filogenéticas. O gene 16S rRNA foi amplamente estudado, o sequenciamento desse gene forneceu informações importantes que possibilitaram definir as Archaeas como um Domínio independente (ROSÉLLO-MORA; AMANN, 2001). Atualmente, a análise filogenética baseada no gene 16S rRNA representa um critério principal para a designação de novos grupos taxonômicos. Contudo, essa análise é incompleta, pois considera apenas um gene e não necessariamente representa a história natural do organismo. Os genes rRNA podem ser transferidos horizontalmente entre organismos, assim esse sinal filogenético pode não representar a história evolutiva daquele organismo. Para avaliar a robustez da filogenia baseada no gene 16S rRNA, estudos compararam filogenias baseadas no genoma completo ou em partes do genoma (genes

consevados) com as do gene 16S rRNA . Concluiu-se que o gene 16S rRNA apresentou resultados congruentes para gênero bacteriano. Estudos recentes demonstraram que todos os genes no genoma, inclusive genes ribossomais, estão sujeitos a eventos de recombinação ou de transferência horizontal (HGT) (KONSTANTINOS; TIEDJE, 2007).

Em bactérias, os genes ribossomais são transcritos do operon ribossomal 30S, esta molécula é clivada pela enzima RNAase III formando as subunidades 16S, 23S e 5S. O tamanho do operon ribossomal (*rrn*), a sequência nucleotídica e a estrutura secundária desses três genes ribossomais são conservados dentro das espécies bacterianas (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2010). No operon *rrn*, as subunidades 5S, 16S, 23S são separadas por regiões espaçadoras não codificantes (Intergenic spacer regions - ISRs ou Internal transcribed spacer - ITS), tanto as subunidades quanto o ITS podem ser usadas em análises filogenéticas. Análise das sequências dos ITS tem sido aplicada na identificação e diferenciação de diversas espécies bacterianas (PRAKASH et al, 2007, MING MAN et al., 2010, LIGUUORI et al., 2011).

A região espaçadora entre os genes rRNA 16S e 23S codifica vários tRNAs e contém várias sequências repetitivas em regiões não codificantes (BACOT; REEVES, 1991). Por se tratar de uma região não codificante, o ITS sofre menor pressão evolutiva, permitindo acumular maior variação genética que os genes ribossomais codificantes (CHUN et al., 1999). Essas regiões do genoma apresentam um elevado grau de variabilidade entre as espécies, tanto no seu comprimento quanto na sequência nucleotídica. Como diversas espécies bacterianas podem ter vários alelos do operon ribossomal no genoma, a probabilidade de variação nucleotídica nessa região se torna ainda maior, mesmo entre cepas de uma mesma espécie. Esta diversidade permite o desenvolvimento de protocolos baseados na técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) para discriminar espécies, com base nos padrões de bandas obtidos por amplificação das regiões espaçadoras (OSORIO et al, 2005).

Contudo, o 16S rRNA é o marcador mais utilizado devido ao tamanho das sequências nucleotíicas das subnidades 23S e 5S, a subunidade ribossomal 5S possui apenas 120 pares de bases (pb) e o 23S por 3300 pb (PRAKASH et al., 2007). A análise do gene 16S rRNA têm sido empregada na identificação e classificação de cepas bacterianas. As estirpes bacterianas podem ser identificadas

com base na similaridade da sequência, pela comparação com as sequências depositadas nos bancos de dados, BLAST - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e SEQ MACH - RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN 2010).

Além disso, o gene 16S rRNA também pode ser utilizado para estimar diversidade microbiana em estirpes ambientais através da abordagem metagenômica. Segundo Handelsman e colaboradores (1998), a metagenômica é uma análise genômica de uma mistura de populações microbianas provenientes de uma amostra ambiental, essa abordagem é independente do cultivo (RODRIGUES, 2011).

Embora o gene 16S rRNA seja amplamente utilizado para inferir relações filogenéticas devido a sua distribuição universal em bactérias e natureza altamente conservada, eventos de recombinação e transferência horizontal de segmentos no 16S rRNA podem ocorrer. Assim, a identificação apenas pelo gene 16S rRNA pode fornecer uma informação equivocada. Alguns estudos identificaram a transferência completa do operon rRNA dentro da mesma e entre espécies (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2010).

A presença de múltiplas cópias no operon ribossomal e sua heterogeneidade dentro do genoma são consideradas como outro fator limitante para o uso na identificação de espécies. O número de cópias do operon ribossomal no genoma bacteriano pode variar de 1 a 15. As sequências dessas múltiplas cópias são praticamente idênticas na maioria dos casos com 1-2% de divergência (SCHLEIFER, 2009). Contudo, existe um estudo que demonstrou uma variabilidade na sequência nucleotídica superior a 6,4% em *Thermobispora bispora* (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2010). Análises ao nível de filo também apresentam certas dificuldades para organizar a ordem dos ramos baseados no gene 16S rRNA, pois o poder de resolução não é suficiente. Para espécies estreitamente relacionadas, somente o sequenciamento do gene 16S rRNA não é suficiente para diferenciação dessas espécies (SCHLEIFER, 2009). Além disso, espécies diferentes podem compartilhar identidade completa da sequência do gene 16S rRNA (SATOMI, LA DUC, VENKATESWARAN, 2006). Nestes casos, outros genes conservados (*housekeeping*) do genoma bacteriano podem realizar a discriminação das espécies estreitamente relacionadas (PETTI, 2007, RICHERT, BRAMBILLA, STACKEBRANDT, 2007).

No início da década de 1990, estirpes bacterianas que exibissem uma similaridade no gene 16S rRNA menor que 97% e um DDH menor que 70% pertenceriam a espécies diferentes. E estirpes com uma similaridade no 16S rRNA igual ou maior a 97% poderiam ou não estar relacionado com um DDH de 70%, ou seja, poderia ser ou não a mesma espécie bacteriana (FOX, WISOTZKEY, JURTSUK, 1992, STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Um estudo recente de Stackebrandt e Ebers (2006) propôs o valor de 98,7% ao invés de 97% para o gene 16 rRNA com o objetivo de facilitar os taxonomistas sem prejudicar a definição de espécie (ADÉKAMBI, DRANCOURT, RAOULT, 2008). Segundo Erko Stackebrandt e Jonas Ebers (2006), estirpes que compartilham uma similaridade entre 98,7-99% no 16S rRNA devem ser submetidos a hibridização DNA-DNA para definição de uma nova espécie. Este trabalho baseou-se na comparação de dados de DDH e sequências de 16S rRNA obtidos a partir de publicações no *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) em 2005. Outra questão importante citada foi o valor de corte 70% DDH, este pode vir a não ter correlação filogenética e exemplos raros podem vir a surgir no futuro, onde valores entre 70% DDH e acima estarão relacionados com similaridades em torno de 99% no gene 16S rRNA. Nesses casos, os taxonomistas devem lembrar-se do trabalho de Wayne (1987), que diz "que qualquer esquema taxonômico baseado em filogenia deve demonstrar consistência fenotípica" (STACKEBRANDT; EBERS, 2006).

Outros genes denominados -"housekeeping"-, codificadores de enzimas essenciais para a manutenção da função celular, como RNA polimerase subunidade beta (*rpoB*), DNA girase subunidade beta (*gyrB*), proteína de choque térmico (*dnaK*) e recombinase A (*recA*) são utilizados como marcadores, pois são genes conservados e cópia única no genoma. A análise desses genes serve como ferramenta complementar ao sequenciamento do 16S rRNA (RAJENDHRAN, GUNASEKARAN, 2010). Embora utilizado como marcador molecular o gene *groEL*, que codifica uma proteína denominada chaperonina, pode apresentar mais de uma cópia no genoma bacteriano (LUND, 2009).

A RNA polimerase é uma enzima crucial no processo de transcrição, em bactérias é responsável pela síntese do RNA mensageiro (mRNA), RNA transportador (tRNA), RNA ribossomal (rRNA). Esta enzima consiste em três subunidades α_2 , β e ω , sendo a maior parte da atividade catalítica desempenhada

pela subunidade β que é codificada pelo gene *rpoB*, o gene completo possui aproximadamente 3000 pares de bases. O sequenciamento do gene *rpoB* vem sendo utilizado na identificação de espécies de Enterobactérias, *Staphylococcus*, *Barthionella*, *Corynebacterium* e *Acinetobacter* (MOLLET, DRANCOUT, RAOULT, 1997, DRANCOURT; RAOULT, 2002, RENESTO, 2001, KHAMIS, RAOULT, LA SCOLA, 2004, LA SCOLA et al., 2006) e em estudos de diversidade microbiana (CASE, 2007) . O banco de dados *GenBank* contém cerca de 30.000 sequências depositadas desse gene, o sequenciamento completo do *rpoB* pode ser necessário para descrição de novas espécies bacterianas usando o corte de 97,7% ou menor de similaridade ou 98,2% para subespécies (ADÉKAMBI, DRANCOURT, RAOULT, 2008).

Adékambi e colaboradores (2008) compararam os valores publicados de DDH, ANI e similaridade do gene completo *rpoB* de 230 espécies bacterianas de 45 gêneros distintos e observaram uma similaridade intraespecífica no *rpoB* entre 98,2-100% e que o valor de 97,7% de similaridade no *rpoB* estava relacionada com os valores 70% DDH e 94,3% ANI. Um corte de 85,5% de similaridade no *rpoB* foi proposto para diferenciação de gêneros. Segundo este estudo, o valor de corte depende do tamanho do fragmento utilizado na identificação. Para fragmentos com 300-600 pb o valor mínimo é de 94-95% de similaridade para designação correta da espécie, para sequências com 600-825 pb a similaridade necessária é de 96-97%. Diversos trabalhos apontam que a região hipervariável é mais adequada para identificação e análises filogenéticas ao nível de espécie e subespécie.

O gene *gyrB* que codifica a subunidade β da DNA girase é universal em bactérias, cópia única no genoma e apresenta uma taxa de substituição de 0,7-0,8% por milhões de anos. Tais características permitem o uso deste gene para discriminar e identificar espécies relacionadas. Atualmente, o *gyrB* tem sido empregado como marcador molecular em alguns grupos bacterianos como *Bacillus*, *Vibrio*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacteria* e *Aeromonas* (LI et al., 2008).

As Chaperonas são uma classe de proteínas moduladoras que desempenham um papel central no controle conformacional de outras proteínas, essas estão associadas ao estresse celular e são conhecidas como proteínas de choque térmico *Heat Shock Proteins* (HSP) (SILVA, 2008). A HSP60 também conhecida como *groEL* codifica uma proteína de 60 kDa altamente conservada e dependente de ATP. O gene *groEL* tem sido utilizado em estudos filogenéticos e

identificação de microrganismos, por exemplo em espécies do gênero *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Gemella* e *Vibrio parahaemolyticus* (HILL et al., 2004, HOSSAIN et al., 2012, HUNG et al., 2010).

A proteína *recA* é uma enzima fundamental no processo de recombinação do DNA bacteriano. Além da função direta no reparo do DNA, essa proteína funciona como um regulador chave na resposta SOS (NAHRSTEDT, SCHRODER, MEINHARDT, 2005). Diversos trabalhos utilizaram o gene *recA* como marcador filogenético para diferenciação de espécies relacionadas (WENG et al., 2009, PAYNE et al., 2005).

Embora diferentes marcadores moleculares tenham sido propostos, o poder discriminatório de um locus é considerado inferior ao de vários loci, uma vez que representa uma pequena região do genoma. Assim, o sequenciamento de vários genes conservados (*Multilocus Sequence Analysis*, MLSA) tem sido proposto para aumentar o poder discriminatório (RAJENDRAN, GUNASEKARAN, 2010). Trabalhos recentes questionaram se o sequenciamento de múltiplos genes pode ser empregado para diferenciar espécies próximas. Análises baseadas em múltiplos genes fornecem uma “proteção” contra distorções por recombinação em um único locus (GEVERS et al., 2005). Esses genes apresentam uma evolução lenta, porém mais rápida do que o gene 16S rRNA, e a maioria das variações acumuladas nesses genes são consideradas como neutras. Além disso, genes conservados codificam produtos essenciais para o metabolismo bacteriano e conseqüentemente espera-se que estejam presentes em todas as estirpes de um gênero. Esta abordagem consiste em concatenar as seqüências de múltiplos genes para construir um dendograma. O número de genes usados e o tamanho do fragmento não são determinados, não existe uma regra para essa seleção (HANAGE, FRASER, SPRATT, 2006). Contudo, o mesmo grupo de genes utilizados em um grupo bacteriano pode não ser informativo para outro gênero ou família (GEVERS et al., 2005).

O emprego de sete loci tornou-se uma norma em outro tipo de abordagem denominado *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (MAIDEN et al., 1998). O MLST é uma variação do MLSA usado para caracterização de procariotos a um nível intra-específico. Neste um número de alelo é atribuído a cada seqüência de um gene e os sete genes fornecem um perfil de alelos. Grupos com o mesmo perfil de alelos representam clones ou linhagens (GEVERS et al., 2005). Esta técnica é amplamente

utilizada na tipagem de microrganismos patogênicos, pois a caracterização de estirpes patogênicas é fundamental na epidemiologia de doenças infecciosas, gerando as informações necessárias para identificar, controlar e intervir contra surtos de doenças (URWIN; MAIDEN, 2003).

Metodologias utilizando perfis de fragmentos de DNA (-“*fingerprinting*”-) podem utilizar em elementos repetitivos utilizando PCR como *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences* - PCR (ERIC), BOX (derivado do elemento *boxA*) e *Repetitive Extragenic Palindromic* - PCR (REP). Outras técnicas utilizam enzimas de restrição, por exemplo: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), Perfil plasmidial, Ribotipagem, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ANDRA) e *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (PRAKASH et al., 2007).

A técnica de PFGE é empregada para separar grandes fragmentos de DNA por eletroforese em campo elétrico pulsado. Esta metodologia é reconhecida como “padrão ouro” para identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários. A caracterização de linhagens patogênicas é fundamental para fins epidemiológicos, assim o PFGE pode ser empregado em estudos de surtos hospitalares e comparação de populações microbianas de diferentes regiões (MAGALHÃES, 2005). Em geral, esses métodos fornecem informação ao nível de linhagem, não sendo aplicado para definição de espécie. A maior desvantagem de alguns desses métodos baseados no perfil de bandas é a dificuldade de comparação entre laboratórios, com exceção do AFLP e ribotipagem (TINDALL et al., 2010).

Desde o sequenciamento dos primeiros genomas bacterianos em 1995, análises comparativas de genomas procarióticos tem revelado a natureza complexa da estrutura e organização destes genomas, a enorme diversidade genética entre estes organismos, mesmo entre estirpes de uma mesma espécie, levando a questionamentos importantes sobre os mecanismos pelos quais estes microrganismos evoluem e como devem ser classificados taxonomicamente (CATANBO, DEEGRIVE, MIRANDA, 2007).

No entanto, mesmo com os avanços tecnológicos que possibilitam o sequenciamento de um genoma mais rapidamente e com menor custo, esse custo é relativo e ainda será um empecilho para a maioria dos taxonomistas. A vantagem encontra-se na disponibilidade da sequência do genoma depositada em banco de

dados públicos (STACKEBRANDT, 2011). A era genômica está fornecendo inestimáveis informações para estudos evolutivos tanto micro (abaixo do nível de espécie) quanto macro-evolução (acima do nível de espécie) (ABBY; DAUBIN, 2007). Sem dúvida, esse conhecimento contribuirá para avanços e mudanças na taxonomia de procariotos (KLENK; GÖKER, 2010).

1.5 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

A identificação bacteriana em laboratórios de microbiologia é realizada principalmente utilizando as características morfológicas das colônias bacterianas, coloração de Gram e testes fenotípicos. A primeira etapa para a identificação bacteriana é a obtenção de uma cultura pura. A determinação da reação de Gram e morfologia da estirpe bacteriana são fundamentais para a realização da identificação fenotípica. Se houver algum erro na determinação da reação de Gram e/ou morfológica, os testes subsequentes podem ser conduzidos de forma equivocada resultando em uma identificação incorreta (SUTTON; CUNDELL, 2004).

Alguns sistemas automatizados ou semi-automatizados baseados em testes fenotípicos têm sido utilizados por laboratórios clínicos. Estes sistemas permitem identificar bactérias de relevância clínica de forma mais rápida e corretamente (BOSSHARD et al., 2006). Dentre os sistemas comerciais mais utilizados estão o API (BioMérieux) e o VITEK (BioMérieux). O sistema semi-automatizado API está disponível como conjunto de testes para identificação de bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras. Apresenta-se como um sistema de testes bioquímicos combinados com um banco de dados (APIWEB). O sistema automatizado VITEK é usado na identificação de microrganismos e em teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Este é constituído por um sistema de enchimento/selador de cartões, uma incubadora/leitora, um computador e uma impressora. Para a identificação microbiana são utilizados cartões projetados para identificação, compostos por 43 poços (VITEK 2) que contêm substratos bioquímicos desidratados, onde não é necessário nenhum reagente adicional (BioMérieux, 2013).

O sistema VITEK apresenta um *software* que processa e interpreta os resultados. A identificação realizada pelo VITEK abrange mais de 300 espécies microbianas de importância clínica e algumas no campo industrial BioMérieux,

2013). Entretanto, todos os sistemas de testes fenotípicos apresentam problemas, por exemplo: i) Nem todas as cepas de uma espécie apresentam uma característica particular; ii) Algumas cepas podem apresentar resultados diferentes em testes repetidos; iii) Os bancos de dados são limitados ou a espécie pode não ter sido descrita; iv) Os resultados do teste baseiam-se na interpretação individual e experiência, sendo que pequenas alterações na execução do teste podem fornecer resultados falsos (BOSSHARD et al., 2004). Apesar das limitações apresentadas pelos sistemas de identificação fenotípica, o emprego destes na rotina dos laboratórios clínicos é satisfatório, já que é conhecido o perfil metabólico dos principais microrganismos patogênicos para o homem. Eigner e colaboradores (2005) realizaram um estudo em laboratórios clínicos e demonstraram que os sistemas compactos são confiáveis para identificação rápida de vários grupos de microrganismos de origem clínica e assim possuem uma ampla aceitação.

No entanto, para microrganismos de origem ambiental cujas características bioquímicas são bastante variadas, a aplicação de testes fenotípicos nem sempre é eficiente para identificação bacteriana (ROCHA, 2006, BAIIO, 2007). Com relação à identificação de bactérias provenientes do controle ambiental e de produtos farmacêuticos, alguns estudos mostram a necessidade de metodologias moleculares para a conclusão da identificação de diversos grupos bacterianos (SUTTON; CUNDELL, 2004, CUNDELL, 2006). Cundell (2006) realizou uma revisão sobre estratégias de identificação e caracterização microbiana em produtos farmacêuticos e em programas de monitoramento microbiano, considerando necessária a utilização de metodologias moleculares para análise mais efetiva das investigações sobre os contaminantes de produtos e ambientes farmacêuticos, com objetivo de identificar a origem e determinar ações preventivas na indústria.

1.5.1 Identificação molecular

A identificação bacteriana baseada em métodos moleculares surgiu como alternativa ou complemento para os procedimentos de identificação fenotípica (BOSSHARD et al, 2006). Em 1987, Woese e outros pesquisadores demonstraram que as relações filogenéticas em bactérias poderiam ser determinadas por comparação de regiões estáveis do código genético (WOESE, 1987). Atualmente, a

análise da sequência do gene 16S rRNA tem sido utilizada não apenas para a determinação do relacionamento filogenético, mas também tem contribuído para a identificação bacteriana (CLARRIDGE, 2004, DRANCOURT, BERGER, RAOULT, 2004, MIGNARD; FLANDROIS, 2006).

O gene 16S rRNA é universal nas bactérias, possui 1.500 pares de bases e apresenta regiões variáveis e conservadas. Existe um grande número de sequências desse gene disponível nos bancos de dados permitindo a comparação de sequências do gene 16S rRNA com sequências de estirpes bacterianas desconhecidas. Esta é a metodologia de escolha para determinação do gênero bacteriano (CLARRIDGE, 2004, PETTI, 2007). Devido as limitações do sequenciamento do 16S rRNA já citadas anteriormente, outros genes conservados do genoma bacteriano podem ser utilizados na identificação de espécies estreitamente relacionadas como: *rpoB*, *groEL*, *gyrB*, *recA* entre outros (PETTI, 2007, RICHERT, BRAMBILLA, STACKEBRANDT, 2007).

Junto com o gene 16S rRNA, o sequenciamento de outros genes *housekeeping* pode ajudar a definir uma nova espécie ou subespécie e refinar análises de comunidade bacteriana, como monitoramento de resistência conferida por mutação (ADÉKAMBI, DRANCOURT, RAOULT, 2008).

1.6 COCOS GRAM POSITIVOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

As bactérias Gram positivas, especialmente os cocos, são isoladas com maior frequência a partir de amostras biológicas humanas e produzem uma variedade de doenças, incluindo foliculite, forúnculo, celulite, além de pneumonia e bacteremia. As famílias de cocos Gram positivos com maior relevância clínica são: Micrococcaceae, Staphylococcaceae e Streptococcaceae (KONEMAN, 2010, BANNERMAN; PEACOCK, 2003).

Os gêneros incluídos na família Streptococcaceae são *Lactococcus*, *Lactovum* e *Streptococcus*, dentre esses somente os *Streptococcus* apresentam relevância clínica. A família Micrococcaceae possui 15 gêneros (*Acaricomes*, *Arthrobacter*, *Auritidibacter*, *Citricoccus*, *Enteractinococcus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Pelczaria* - nome rejeitado, *Renibacterium*, *Rothia*, *Sinomonas*, *Stomatococcus*, *Yaniella* e *Zhihengliuella*) dos quais somente *Acarinomes*,

Arthrobacter, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Renibacterium* e *Rothia* estão associados a infecções humanas. Na família Staphylococcaceae (*Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus*, *Salinicoccus* e *Staphylococcus*), o gênero *Staphylococcus* apresenta maior destaque devido a sua importância clínica. Embora os gêneros *Macrococcus* e *Jeotgalicoccus* também possam causar infecções em humanos (EUZEBY, 2013, MURRAY, 2011).

Os gêneros com maior importância clínica são os *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. O *Staphylococcus aureus* é considerado o patógeno humano mais importante do gênero seguido de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. auriculares*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. hominis* e *S. lugdunensis*. Muitas espécies são patógenos oportunistas que colonizam a pele e mucosa humana. A recuperação de uma estirpe do gênero *Staphylococcus* requer uma avaliação da importância clínica para determinar se é um contaminante, patógeno ou microrganismo presente na microbiota (MURRAY, 2011). Os *Streptococcus* são conhecidos como um dos principais patógenos humanos. As espécies mais importantes causadoras de infecções agudas são *S. pyogenes*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae*, outras espécies menos virulentas também foram associadas a infecções humanas (HARDIE; WHILEY, 1997).

O gênero *Enterococcus* surgiu como uma das mais importantes causas de infecções hospitalares da última década. Associado ao aumento no número de casos está a resistência intrínseca a vários antibióticos habitualmente (SOOD et al., 2008).

1.6.1 Outros cocos gram positivos

Outros gêneros pertencentes ao grupo dos cocos Gram positivos são *Planococcus* (presentes em ambientes marinhos); *Kytococcus* (encontrado em ambiente marinho); *Dermacoccus* (presentes na pele de mamíferos); *Alloiococcus* (estirpe a partir de fluido de ouvido humano), e *Aerococcus* (estirpes a partir do ar, urina humana e animal) (EUZÉBY, 2013).

Dentro do grupo dos cocos Gram positivos, a família Streptococcaceae é catalase negativo e os gêneros *Rothia*, *Aerococcus* e *Alloiococcus* apresentam variação bioquímica na reação da catalase, 90% ou mais das espécies ou cepas são fracamente positivas. Os demais gêneros são positivos para esta prova bioquímica

(BANNERMAN; PEACOCK, 2003, KONEMAN, 2010).

Os gêneros *Kytococcus* e *Dermacoccus* pertencem à família Dermacoccaceae; *Planococcus* a família Planococcaceae; *Alloiococcus* a família Carnobacteriaceae; *Rothia* a família Actinomycetaceae e *Aerococcus* a família Aerococcaceae (EUZÉBY, 2013). Esses microrganismos são de origem ambiental, mas podem ser isolados de amostras clínicas humanas (SZCZERBA, 2005, LE BRUN et al., 2005, BLENNOW et al., 2012, HERNANDO et al., 1999, LAWSON et al., 2001). Esses gêneros ainda são pouco estudados e não estão presentes nos bancos de dados dos sistemas de identificação fenotípica convencional. Por esta razão esses microrganismos podem não ser identificados ou identificados incorretamente.

Outros gêneros como *Arthrobacter*, *Nesterenkonia*, *Demetria*, *Dietzia* e *Janibacter* apresentam variação morfológica em seu ciclo de crescimento, podendo apresentar a forma de cocos ou bastonetes curtos de acordo com a fase do ciclo. Essa característica pode levar a erros na identificação desses microrganismos, uma vez que a caracterização morfológica é importante para a escolha do procedimento de identificação a ser utilizado. Há relatos clínicos de bacteremia causada por *Arthrobacter woluwensis* (SHIN, HONG, SON, 2006), *Dietzia maris* (BEMER-MELCHIOR et al, 1999) e *Janibacter sp.* (LOUBINOUX, 2005). Esses microrganismos embora não sejam patógenos humanos podem causar doenças, portanto há a necessidade de mais estudos que permitam a identificação correta dos mesmos.

1.7 MICRORGANISMOS ENCONTRADOS COMO CONTAMINANTES DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E EM AMBIENTES CONTROLADOS

A identificação de contaminantes microbianos em produtos farmacêuticos e estirpes ambientais de áreas limpas pode fornecer informações importantes a respeito de possíveis fontes de contaminação e distribuição das espécies bacterianas em ambientes controlados. A presença de bactérias Gram positivas e leveduras pode ser um indicativo de deficiência no controle ambiental (JIMEZES, 2007).

Se a identificação bacteriana das estirpes revelarem cocos Gram positivo do

gênero *Staphylococcus*, a fonte de contaminação pode ser originada do manipulador, caso seja do gênero *Micrococcus* ou relacionados a este a fonte provavelmente seja ambiental. Caso sejam bacilos Gram positivos aeróbios esporulados pertencentes ao gênero *Bacillus* e similares, a fonte de contaminação pode ser derivada do ambiente, uma vez que estas bactérias podem se apresentar na forma de esporos que são resistentes a desinfetantes e a radiação ultravioleta. Se forem identificados bastonetes Gram negativos, a fonte de contaminação pode ser derivada da água ou de qualquer superfície úmida (PINTO, KANEKO, OHARA, 2003).

O controle microbiológico dentro de um ambiente controlado é essencial, o conhecimento dos principais microrganismos presentes no ambiente é fundamental na escolha do método ou combinação de métodos que serão empregados na desinfecção. (NAGARKAR et al., 2001). Portanto, a determinação da diversidade microbiana em salas limpas, bem como quaisquer características de resistência a desinfetantes que os microrganismos possam apresentar, são importantes para o desenvolvimento de tecnologias de desinfecção (WU; LIU, 2007).

Vários grupos bacterianos podem estar presentes como contaminantes de produtos farmacêuticos e em áreas limpas, entre eles os bastonetes Gram positivos não esporulados (bactérias corineformes e nocardioformes); bastonetes Gram positivos esporulados (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*); cocos Gram positivos fermentadores da glicose; cocos Gram positivos não fermentadores da glicose (relacionados ao gênero *Micrococcus*), bastonetes Gram negativos entre outros (BAIO, 2007, SOUZA, 2011). A identificação bacteriana destes organismos tem sido realizada utilizando a caracterização fenotípica, entretanto há relatos que demonstram identificações bacterianas equivocadas e mostram a necessidade da aplicação de metodologias moleculares para a conclusão das identificações (CUNDELL, 2006).

Um dos grupos bacterianos encontrados como contaminantes de produtos farmacêuticos e em áreas limpas são os cocos Gram positivos. Pacheco (2010) realizou um estudo para avaliação da diversidade bacteriana encontrada em sala limpa, esta análise corroborou estudos anteriores e confirmou o grupo dos cocos Gram positivos como um dos que apresentam maior relevância nos estudos de áreas limpas. As espécies com maior predominância neste estudo foram *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus cohnii* e *Bacillus subtilis*.

Segundo Martínéz-Bermudéz e colaboradores (1991), os principais microrganismos encontrados como contaminantes de matérias-primas farmacêuticas são *Bacillus sp* e no grupo dos cocos Gram positivos os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* coagulase-negativos.

1.7.1 Cocos gram positivos ambientais

Dentro do grupo dos cocos Gram positivos e catalase positivos encontrados no ambiente o gênero *Micrococcus* e outros gêneros relacionados a este apresentam grande importância quanto à presença desses como contaminantes. Esses microrganismos possuem inúmeras adaptações genéticas que os permitem sobreviver em condições extremas. A espécie *M. luteus* consegue sobreviver em condições inóspitas, em baixas temperaturas e poucos nutrientes, apesar de não formar esporos como estrutura de sobrevivência. Essa persistência no ambiente em condições extremas por um período longo é devido à presença do gene *Rpf* (*resuscitation promoting factor*) (GREENBLATT et al., 2004, MUKAMOLOVA et al., 2002, YOUNG et al., 2010).

De acordo com a classificação taxonômica o gênero *Micrococcus* pertence ao reino Bacteria; filo Actinobacteria; classe Actinobacteria; sub-classe Actinobacteridae; ordem Actinomycetales; sub-ordem Micrococccineae; família Micrococccaceae (EUZÉBY, 2013). Segundo o Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica (1986), a família Micrococccaceae incluía quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*. Estudos de homologia de ácidos nucleicos, análise da composição da parede celular e de ácidos graxos demonstraram que estes microrganismos não estavam intimamente relacionados como se acreditava. Eles observaram que o gênero *Micrococcus* era geneticamente relacionado com o gênero *Arthrobacter* e os actinomicetos aeróbios, enquanto os estafilococos mostravam relação genética com os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Bacillus* (KONEMAN, 2010).

Atualmente, vários estudos baseados em metodologia moleculares foram realizados descrevendo novos gêneros bacterianos e agrupando os gêneros existentes em diferentes famílias. Sendo assim, a família Micrococccaceae é composta pelos gêneros *Acaricomes*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Kocuria*,

Micrococcus, *Nesterenkonia*, *Renibacterium*, *Rothia*, *Sinomonas*, *Stomatococcus* e *Zhihengliuella* e a família Staphylococcaceae composta pelos gêneros *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus*, *Salinicoccus* e *Staphylococcus* (EUZÉBY, 2013).

1.7.2 O gênero *Micrococcus*

O gênero *Micrococcus* foi descrito pela primeira vez em 1872 (COHN, 1872), e desde então tem sido revisto diversas vezes (STACKEBRANDT et al., 1995). Stackebrandt e colaboradores (1995) realizaram análise de sequências do gene 16S rRNA das nove espécies conhecidas de *Micrococcus* e propuseram várias modificações taxonômicas para esses microrganismos. Segundo esses pesquisadores, *Micrococcus luteus* e *Micrococcus lylae* são as únicas espécies que permanecem no gênero *Micrococcus*. As espécies *M. roseus*, *M. varians* e *M. kristinae* pertencem agora ao gênero *Kocuria*, como *K. roseus*, *K. varians* e *K. kristinae*, respectivamente. As espécies *M. halobius*, *M. nishinomiensis* e *M. sedentarius* foram incluídas em três gêneros separados como *Nesterenkonia halobia*, *Kytococcus nishinomiensis* e *Dermacoccus sedentaris*, respectivamente. *Micrococcus agilis* foi reclassificado no gênero *Arthrobacter* como *A. agilis*.

Este gênero é formado por cocos gram positivos não móveis, catalase e oxidase positivo, não formadores de esporos. São microrganismos mesófilos, não halofílicos e aeróbios. Segundo a descrição quimiotaxonômica por Stackebrandt (1995), o peptidoglicano contém L-lisina e pode apresentar a variação A2 ou A4 α . As menaquinonas predominantes são MK-8 e MK-8(H₂) ou MK-8(H₂). Em menor quantidade podem aparecer as menaquinonas MK-7, MK-7(H₂) e MK-9(H₂). A parede celular apresenta ácidos teicurônicos e ausência de ácidos teicóicos e micólicos. Os principais ácidos graxos são de cadeia iso e anteiso, sendo os principais anteiso C_{15:0} e iso C_{15:0}. Os lipídeos polares são fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, e um desconhecido fosfolípídeo e glicolípídeo ninhidrina-negativo, fosfatidilinositol pode estar presente. O conteúdo de Guanina e Citosina (G+C) no genoma varia entre 69 a 76 mol% (STACKEBRANDT et al., 1995).

Esses microrganismos estão presentes no ambiente e podem ser encontrados em pele de mamífero. Já foram estirpes de diversos locais como solo de floresta, Estação Chinesa na Antártida, raízes de plantas e locais de tratamento

de águas residuais (LIU et al., 2000, LIU et al., 2007, KLOSS, TORNABENE, SCHLEIFER, 1974, ZHANG et al., 2010, ZHAO et al., 2009, CHEN et al., 2009). Atualmente foram validadas e descritas nove espécies do gênero: *Micrococcus luteus*, *M. lylae*, *M. yunnanensis*, *M. antarcticus*, *M. flavus*, *M. terreus*, *M. lactis*, *M. cohnii*, *M. endophyticus* (EUZÉBY, 2013). A espécie *Micrococcus niitiensis* foi retirada, uma retratação foi publicada no Jornal Internacional de Sistemática, pois os autores não conseguiram depositar uma cultura pura da cepa em duas coleções de cultura. A espécie tipo do gênero é *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872.

A espécie *Micrococcus luteus* apresenta importância biotecnológica (YOUNG et al., 2010) e clínica. Há diversos relatos clínicos associando *Micrococcus luteus* a casos de bacteremia, endocardite e pneumonia (VALDIVIA-ARENAS, 2009, LEY et al., 1998, PECES et al., 1997, MILTIADOUS; ELISAF, 2011, USÓ et al., 2003, ADANG et al., 1992). Contudo, ainda há poucos estudos relacionados à caracterização bioquímica e genotípica deste gênero.

1.7.2.1 Importância biotecnológica

Devido à relevância biotecnológica e potencial papel na biorremediação, a espécie *Micrococcus luteus* teve seu genoma sequenciado completamente. Este microrganismo pode ser empregado no tratamento de resíduos tóxicos devido à sua habilidade em degradar poluentes orgânicos tóxicos e tolerância a metais. A espécie *M. luteus* já foi encontrada em solos contaminados, derramamentos de óleo e lodo, sendo capaz de degradar hidrocarbonetos (YOUNG et al., 2010).

Diversos microrganismos como *Micrococcus* sp, *Pseudomonas* sp e *Arthrobacter paraffineus* podem produzir um tipo de biossurfactante, estes apresentam propriedades emulsificantes, dispersantes e solubilizantes. Os biossurfactantes podem ser empregados na remoção de petróleo e de metais pesados de solos ou ambientes aquáticos contaminados. A produção de tais moléculas com atividade de redução da tensão superficial ocorre quando os substratos fornecidos aos microrganismos são hidrocarbonetos, possibilitando aos microrganismos utilizarem estes compostos, normalmente insolúveis em meio aquoso (COLLA; COSTA, 2003).

A indústria petrolífera enfrenta alguns problemas causados por

microrganismos como biodeterioração dos óleos, biocorrosão de equipamentos e tubulações e produção de compostos indesejados (polímeros, gomas, ácidos orgânicos e H₂S), os quais alteram as características do petróleo para extração e refino (CORD-RUWICH, KLEINITZ, WIDDEL, 1987). *Micrococcus sp*, *Bacillus sp*, *Dietzia sp* têm sido encontrados em depósitos petrolíferos e são citados como biodegradadores de hidrocarbonetos. Assim, a detecção desses microrganismos com potencial biodegradação, biodeterioração e biocorrosão é de grande importância à medida que estes podem estar relacionados com a perda da qualidade do petróleo (CRESPIM, 2008, VASCONCELLOS, 2006).

Nos últimos anos, alguns microrganismos como *M. luteus*, *Streptomyces sp.*, *Aspergillus sp* e *Bacillus sp.* têm sido estudados e empregados na remoção de metais tóxicos como o cádmio de efluentes, provenientes de diversas atividades industriais. O tratamento baseado na tecnologia de bioissorção representa uma técnica promissora para remoção e recuperação de metais pesados em solução aquosa (PUYEN, 2012, CONGEEVARAM et al., 2007, MESQUITA et al., 2000). A acumulação de metais pesados, por mecanismos independentes do metabolismo celular se dá através de interações físico-químicas entre o metal e constituintes da parede celular denomina-se bioissorção (VOLESKY; CHONG, 1995).

O extensivo uso de pesticidas na agricultura acaba produzindo grande acúmulo desses compostos químicos no solo, alguns microrganismos presentes no solo como *Arthrobacter sp.*, *Rhizobium sp.* e *Pseudomonas sp.* são capazes de interagir e degradar tais compostos químicos. Já foi descrito a presença de um plasmídeo em *Micrococcus sp.* envolvido na degradação malation e chlorpirifós, estes compostos são utilizados pelo microrganismo como fonte de carbono no seu crescimento. (KUMARI, 1997, GODA et al., 2010).

Alguns trabalhos descrevem que *M. luteus* é capaz de precipitar e cristalizar ouro na superfície celular, isto sugere que essas propriedades possam ser usadas para a adsorção e concentração de ouro em pequenas concentrações em mineradoras (LEVCHENKO et al., 1997, YOUNG et al., 2010, REITH et al., 2007).

1.7.2.2 Importância médica

O gênero *Micrococcus* é conhecido por ser um contaminante ambiental em indústrias farmacêuticas e não patogênico. Contudo, há diversos relatos clínicos demonstrando que este microrganismo pode causar infecção em humanos.

O uso contínuo prolongado de epoprostenol via catéter venoso em pacientes com hipertensão arterial pulmonar (PAH), parece estar associado com a incidência de infecções. *Micrococcus sp.* é o segundo agente etiológico mais comum entre os pacientes que recebiam essa terapia. Desta forma, é importante ressaltar que quando isolado, *Micrococcus sp.* não deve ser visto como um contaminante, mas sim como um agente patogênico capaz de produzir síndrome sistêmica exigindo intervenção terapêutica (OUDIZ et al., 2004, YAP; MERMEL, 2003, VALDIVIA-ARENAS, 2009, HIRATA et al., 2009).

Endocardite por *M. luteus* é uma infecção rara, porém já foram relatados diversos casos na literatura (MULTIADOUS; ELISAF, 2011, USÓ et al., 2003, SEIFERT, KALTHEUNER, PERDREAU-REMGINGTON, 1995). Outros relatos clínicos envolvem *Micrococcus sp.* em bacteremia e pneumonia (VON EIFF et al., 1996, ADANG et al., 1992, PECES et al., 1997, LEY et al., 1998).

1.8 JUSTIFICATIVA

O Setor de Identificação Bacteriana é responsável por realizar avaliações microbiológicas identificando contaminantes bacterianos provenientes de produtos farmacêuticos e ambientes controlados. As identificações do grupo bacteriano dos cocos Gram positivos não fermentadores da glicose tem sido realizadas utilizando métodos convencionais, bem como pelos sistemas automatizados (VITEK e VITEK 2 – BioMerieux) e semi-automatizado (API - BioMerieux). Entretanto, nestes sistemas não existem perfis metabólicos no banco de dados ou conjunto de substratos presentes nas galerias de testes bioquímicos capazes de discriminar vários gêneros e espécies bacterianas encontradas em ambientes controlados e como contaminantes de produtos farmacêuticos. Sendo assim, os cocos Gram positivos não fermentadores da glicose, muitas vezes apresentam identificação que não são concluídas através da caracterização fenotípica.

Esta questão nos levou a buscar novas metodologias na tentativa de solucionar a identificação destas amostras bacterianas não caracterizadas pelos sistemas convencionais. A identificação bacteriana correta de contaminantes de produtos farmacêuticos e de ambientes controlados ou áreas limpas é imprescindível para garantir a qualidade dos produtos analisados. Por este motivo torna-se necessária à aplicação de metodologias moleculares para a conclusão das identificações do grupo bacteriano em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar a caracterização fenotípica e molecular das estirpes do grupo dos cocos Gram positivos não fermentadores da glicose provenientes de análises microbiológicas de produtos farmacêuticos estéreis realizadas no INCQS/FIOCRUZ.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização fenotípica dos cocos Gram positivos não fermentadores da glicose e catalase positivos utilizando os sistemas comerciais API Staph (BioMerieux), VITEK e VITEK 2 (BioMerieux).
- Realizar a caracterização molecular dos cocos Gram positivos e catalase positivos utilizando a metodologia da análise da sequência do gene 16S rRNA .
- Realizar a caracterização molecular das estirpes relacionados ao gênero *Micrococcus* utilizando a metodologia da análise da sequência do gene *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *groEL*.
- Realizar a caracterização fenotípica pelo sistema API 50CH para as estirpes relacionadas ao gênero *Micrococcus*.
- Analisar os resultados obtidos nas identificações das estirpes bacterianas pelas duas metodologias fenotípica e molecular.

3 METODOLOGIA

3.1 ESTIRPES BACTERIANAS

Neste estudo foram analisadas cinquenta e oito estirpes bacterianas de cocos Gram positivos não fermentadores da glicose e produtores da enzima catalase provenientes de análises microbiológicas de produtos farmacêuticos estéreis realizadas no INCQS/FIOCRUZ, durante o período de 2005 a 2011 (Tabela 1), e doze cepas tipo (*Micrococcus luteus* INCQS 00009 = ATCC7468 , *Micrococcus luteus* INCQS 00011 = ATCC10240 , *Micrococcus luteus* INCQS 00012 = ATCC14452, *Micrococcus luteus* INCQS 00112 = ATCC7468D, *Micrococcus luteus* INCQS 00256 = ATCC272, *Micrococcus yunnanensis*^T JCM16547, *Micrococcus endophyticus*^T JCM 16951, *Micrococcus flavus*^T JCM 14000, *Kocuria palustris*^T JCM 12076, *Kocuria kristinae* ATCC BAA752, *Kocuria rhizophila* INCQS 00010 = ATCC9341 e *Kocuria rhizophila* INCQS 00116 = ATCC15957. As estirpes foram estocadas a -20° C em skim milk contendo 20% (v/v) de glicerol.

Tabela 1

Origem e data do isolamento das estirpes bacterianas

Estirpe	Origem	Ano de isolamento
3275	Monitoramento Ambiental	2005
3276	Monitoramento Ambiental	2005
3285	Produto	2005
3302	Monitoramento Ambiental	2005
3303	Monitoramento Ambiental	2005
3308	Monitoramento Ambiental	2005
3309	Monitoramento Ambiental	2005
3319	Monitoramento Ambiental	2005
3324	Monitoramento Ambiental	2005
3327	Monitoramento Ambiental	2005
3328	Produto	2005
3329	Monitoramento Ambiental	2005
3330	Monitoramento Ambiental	2005

Tabela 1 (Cont.)

Origem e data do isolamento das estirpes bacterianas

Estirpe	Origem	Ano de isolamento
3333	Monitoramento Ambiental	2005
3342	Monitoramento Ambiental	2005
3343	Monitoramento Ambiental	2005
3347	Monitoramento Ambiental	2005
3355	Monitoramento Ambiental	2005
3356	Monitoramento Ambiental	2005
3359	Monitoramento Ambiental	2005
3364	Monitoramento Ambiental	2005
3387	Produto	2006
3396	Produto	2006
3409	Monitoramento Ambiental	2006
3414	Monitoramento Ambiental	2006
3415	Monitoramento Ambiental	2006
3432	Produto	2006
3442	Monitoramento Ambiental	2006
3447 B	Monitoramento Ambiental	2006
3450	Monitoramento Ambiental	2006
3451	Monitoramento Ambiental	2006
3455	Monitoramento Ambiental	2006
3459	Monitoramento Ambiental	2006
3460 B	Monitoramento Ambiental	2006
3464	Monitoramento Ambiental	2006
3466	Monitoramento Ambiental	2006
3471	Monitoramento Ambiental	2006
3474	Monitoramento Ambiental	2006
3496	Monitoramento Ambiental	2007
3497	Monitoramento Ambiental	2007
3498.2	Monitoramento Ambiental	2007
3508	Produto	2007
3517.2	Monitoramento Ambiental	2007
3530	Produto	2007
3538 A	Monitoramento Ambiental	2007
3542	Monitoramento Ambiental	2007
3562	Monitoramento Ambiental	2007
3574	Monitoramento Ambiental	2007
3579	Monitoramento Ambiental	2007

Tabela 1 (Cont.)

Origem e data do isolamento das estirpes bacterianas

Estirpe	Origem	Ano de isolamento
3701	Monitoramento Ambiental	2010
3710	Monitoramento Ambiental	2011
3723	Monitoramento Ambiental	2011
3730	Monitoramento Ambiental	2011
3731	Monitoramento Ambiental	2011
3732	Monitoramento Ambiental	2011
3734	Monitoramento Ambiental	2011
3737	Monitoramento Ambiental	2011
3738	Monitoramento Ambiental	2011

3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

As estirpes bacterianas foram submetidas à caracterização morfo-tintorial pela coloração de Gram. Testes fenotípicos preliminares foram realizados como oxidação-fermentação da glicose (O/F Glicose com extrato de levedura), prova da catalase 3% e KOH 3% (hidróxido de potássio) (Manual DIFCO, KONEMAN, 2010). A observação dos resultados da O/F Glicose foi realizada em 24, 48 horas e 7 dias. A caracterização fenotípica utilizando os sistemas comerciais API e VITEK (BioMerieux) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante como descrito abaixo:

3.2.1 API Staph

Todas as estirpes bacterianas foram submetidas à identificação pelo sistema API Staph. Para a preparação da galeria foi adicionada água destilada nos alvéolos da caixa de incubação para criar uma atmosfera úmida, a galeria foi retirada da embalagem e colocada na caixa de incubação identificada. O inóculo foi preparado a partir de uma cultura pura de cada estirpe, o meio de cultura utilizado no crescimento bacteriano foi *Trypticase Soy Agar* (TSA) e as estirpes foram incubadas a 30°C por 24-48 horas. Utilizando a ampola API Staph Medium, uma suspensão foi preparada e

ajustada para o equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Posteriormente, a suspensão foi distribuída nas cúpulas, somente nas cúpulas ADH (arginina dihidrolase) e URE (urease) foram adicionadas quatro gotas de óleo mineral estéril para criar uma condição de anaerobiose. A caixa de incubação foi fechada e incubada a 30°C por 24 horas. Após o período de incubação foi adicionada uma gota dos seguintes reagentes abaixo nas respectivas cúpulas e a leitura realizada após 10 minutos:

- Cúpula VP (Voges Proskauer): Reagentes VP1 e VP2
- Cúpula NIT (Redução de nitrato): Reagentes NIT1 e NIT2
- Cúpula PAL (Fosfatase alcalina): Reagentes ZYM A e ZYMB

O resultado positivo ou negativo atribuído a cada cúpula na ficha de resultado, foi observado através da mudança de coloração do substrato segundo a bula API Staph. A identificação foi obtida a partir da comparação do perfil numérico ao sistema de identificação online apiweb™.

3.2.2 API 50CH

O perfil bioquímico das estirpes 3275, 3359, 3364, 3414, 3455, 3415, 3466 e da cepa tipo *Micrococcus yunnanensis*^T foi avaliado utilizando o sistema API 50CH. Para a preparação da galeria foi adicionada água destilada nos alvéolos da caixa de incubação para criar uma atmosfera úmida, a galeria foi retirada da embalagem e colocada na caixa de incubação identificada. O inóculo foi preparado a partir de uma cultura bacteriana pura, o meio de cultura utilizado foram TSA e ágar sangue, as estirpes foram incubados a 30°C e 37°C por 24-48 horas. Foi preparada uma suspensão bem densa a partir de todo o crescimento na placa em 1 mL de solução salina 0,85% estéril (tubo 1). Em um segundo tubo contendo 5 mL de solução salina 0,85% foi preparada uma outra suspensão ajustada para 2 da escola de McFarland (tubo 2), esta foi preparada a partir de algumas gotas da suspensão do tubo1, o número de gotas utilizado foi anotado. Para o meio API 50CHB/E foi transferido o dobro do número de gotas anotado anteriormente da suspensão do tubo 2. A suspensão preparada no meio API 50 CHB/E foi transferida para as cúpulas. Para criar uma condição de anaerobiose foram adicionadas quatro gotas de óleo mineral estéril em cada cúpula. As galerias foram incubadas a 30° e 37°C. O resultado foi considerado positivo quando observado viragem da coloração na cúpula de

vermelho a amarelo, para a esculina foi considerado positivo quando ocorreu a viragem para negro. A leitura das galerias foram realizadas em 24, 48 horas e 7 dias.

3.2.3 VITEK

Cinquenta estirpes bacterianas foram submetidas à identificação pelo sistema VITEK. A partir de uma cultura pura e fresca de 24 horas em TSA, preparou-se o inóculo homogêneo utilizando 2 mL de solução salina 0,85%, a concentração foi ajustada para 0,5 da escala de Mc Farland. O cartão utilizado foi o GPI (Gram Positive Identification). Após a identificação do cartão, este foi colocado de maneira que o canudo do cartão ficasse em contato com o inóculo. O suporte contendo o tubo com o inóculo e o cartão foi levado à câmara de vácuo. Posteriormente, o cartão foi selado a quente utilizando a alça bacteriológica. Os cartões foram retirados do suporte e introduzidos no aparelho para identificação. O resultado foi obtido e impresso após 15 horas.

3.2.4 VITEK 2

Vinte cinco estirpes e as cepas tipo *M. yunnanensis*^T, *M. endophyticus*^T, *M. flavus*^T, *K. palustris*^T foram selecionadas para identificação pelo sistema VITEK 2, o cartão utilizado para identificação foi o GP (*Gram Positive*). No cassete com os tubos VITEK foram adicionado 3 mL de solução salina do VITEK 0,75% para preparação do inóculo, antes do preparo o densichec plus (fotocolorímetro) foi calibrado utilizando a solução salina pura e as escalas de McFarland (0, 0.5, 2, 3). As estirpes bacterianas foram cultivadas em TSA e incubadas a 30°C por 24 horas. Uma suspensão homogênea foi preparada a partir dessa cultura e a turvação ajustada a 0,5-0,63 da escola de McFarland pelo *densichec plus*. Os cartões foram abertos e colocados no cassete, de forma que o canudo do cartão ficasse dentro do inóculo. O cassete foi então levado a câmara de vácuo no aparelho VITEK 2. Posteriormente, o cassete foi transferido para a segunda câmara para leitura. Após a leitura do código de barras dos cartões, esses foram identificados no computador. Os resultados foram obtidos após 5-6 horas.

3.2.5 Crescimento bacteriano a 45°C

As estirpes 3275, 3359, 3364, 3414, 3415, 3432, 3455, 3466, 3460B, 3474 e a cepa tipo *Micrococcus yunnanensis*^T foram submetidas ao crescimento a 45°C. Os meios de cultura selecionados foram TSA e *Trypticase Soy Broth* (TSB), o teste foi realizado em uma estufa calibrada a 45°C, termômetros extras foram utilizados para medir e garantir que a temperatura no interior da estufa estivesse a 45°C. As estirpes bacterianas foram cultivadas em TSA e incubadas a 30°C por 24 horas, a partir desta cultura as estirpes foram repicadas em TSA e TSB. A turvação no TSB foi ajustada para 0,5 Mc Farland, esse teste foi feito em duplicata para avaliar o crescimento a 30°C e 45°C e garantir a viabilidade do meio de cultura utilizado. O crescimento bacteriano foi verificado em 24, 48, e 7 dias. Ao final, tanto as placas TSA quanto os tubos com TSB foram colocados a 30°C para verificar a viabilidade das estirpes. Este teste foi repetido três vezes.

3.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

3.3.1 Extração de DNA total

As estirpes bacterianas foram semeadas em placas de TSA e incubadas a 30°C por 24 horas. Em microtubos identificados foram adicionados 0,5 mL de água ultra pura isenta de DNase e RNase (Invitrogen) e duas alçadas da cultura bacteriana de cada estirpe. Os tubos foram colocados em banho-maria fervente (100°C) por 15 minutos. Após esta etapa, os mesmos foram imediatamente congelados a -20°C. Os microtubos foram centrifugados por 1 minuto a rotação máxima (14.000 RPM) para sedimentar os restos celulares antes de sua utilização.

3.3.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Os genes alvos do genoma bacteriano para amplificação foram o 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *groEL*. O volume final em cada microtubo foi de 50µl. As reações individuais foram compostas de água ultra pura isenta de DNase e RNase esterilizada, tampão de reação 1X, 3mM de MgCl₂, 10 mM de cada dNTP (dNTP set

[dATP, dCTP, dGTP, dTTP.] / microtubo), 100ng dos iniciadores (Tabela 2), 1,5 U da enzima Taq polimerase (Promega®) e 4µl do DNA obtido pela extração por choque térmico. A reação foi realizada nas seguintes condições, com exceção do gene *recA*: pré-desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55° C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, seguido pela extensão a 72°C por 7 minutos no último ciclo (WATTS et al., 2000, KHAMIS, RAOULT, LA SCOLA, 2004, GUO et al, 2008, STEINGRUBE et al., 1995). Para o gene *recA* as condições de ciclagem utilizadas foram: pré-desnaturação a 95° C por 15 minutos, seguidos por 35 ciclos a 95°C por 20 segundos, 55° C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 40 segundos, seguido pela extensão a 72°C por 6 minutos no último ciclo (RIESER et al., 2012) (Tabela 2).

Tabela 2

Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes conservados

Gene	Fragmento (pb)	Iniciador	Sequência do iniciador 5'-3'	Referência
16S rRNA	1500	PA ^{a,s}	AGAGTTTGTATCTGGCTCAG	Watts et al.,2000
		PH ^{a,s}	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	Watts et al.,2000
		519R ^s	GTATTACCGCGGCGGCTG	Jonhson, 1994
		1242F ^s	CACACGTGCTACAATGG	Jonhson, 1994
		1831 ^s	GAGGAACACCGATGGCGAAGG	Watts et al.,2000
		1832 ^s	GCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT	Watts et al.,2000
<i>rpoB</i>	400	2700F ^{a,s}	CGWATGAACATYGGBCAGGT	Khamis et al.,2004
		3130R ^{a,s}	TCCATYTCRCCRAARCGCTG	Khamis et al.,2004
<i>gyrB</i>	1200	gyrB ^{a,s}	GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGC ACGCGGGCGGCAAGTTCGGC	Guo et al., 2008
		gyrB ^{a,s}	GTTGATGTGCTGGCCGTCGAGT CGGCGTCCGCCAT	Guo et al., 2008
<i>groEL</i>	400	hspF ^{a,s}	ACCAACGATGGTGTGTCCAT	Steingrube et al., 1995
		hspR ^{a,s}	CTTGTCGAACCGCATACCCT	Steingrube et al., 1995
<i>recA</i>	800	GpraUF2 ^{a,s}	GGSAAGGGSKCNGTNATGCG	Rieser et al, 2012

Tabela 2 (Cont.)

Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes conservados

Gene	Fragmento (pb)	Iniciador	Sequência do iniciador 5'-3'	Referência
		GpraUR2 ^{a,s}	CCTTSCCCTGSCCNARYT	Rieser et al, 2012
		606FW ^s	AGATCGGCGTGTTCCTTCGGC	Rieser et al, 2012
		307REV ^s	GTGTCCACSCCGAGCTTGG	Rieser et al, 2012

^a: amplificação; ^s: sequenciamento

3.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. O gel foi preparado dissolvendo 2g da agarose ultra pura (Invitrogen) em 100 mL de TAE1X (Invitrogen) no micro-ondas por 3 minutos a potência média, de forma que ao final toda a agarose estivesse dissolvida e límpida. Foram aplicados 7µl do produto de PCR com 1µl do corante de corrida (solução de azul de bromofenol e xileno cianol) e 1 µl do marcador de peso molecular (TrackIt[®] 100 pb DNA Ladder Invitrogen) nos poços do gel. Para os produtos purificados foram aplicados 2 µl do DNA purificado com 3 µl do corante de corrida e 2 µl do marcador de massa molecular (Invitrogen) nos poços. O tampão de corrida utilizado na eletroforese foi TAE1X (Invitrogen). A tensão aplicada foi de 50 V por 50 minutos. Posteriormente a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado com o equipamento ImageQuant 300 (GE).

3.3.4 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit PureLink PCR (Invitrogen). A purificação foi realizada conforme as instruções do fabricante, com exceção do isopropanol. No protocolo sugerido pelo fabricante os reagentes deveriam ser diluídos com isopropanol, contudo esse diluente foi substituído por etanol absoluto (Merck). Para purificação dos produtos de PCR com bandas inespecíficas foi empregado o E-gel[®](Invitrogen), um sistema de eletroforese em gel de agarose corado com CYBR Safe. Utilizou-se o gel CloneWell 0,8%, o protocolo foi seguido conforme as instruções do fabricante.

3.3.5 Sequenciamento e análise das sequências nucleotídicas

Os fragmentos purificados foram posteriormente sequenciados utilizando o sistema comercial Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems-Perkin Elmer Co). As sequências nucleotídicas foram editadas utilizando os programas Chromas, SeqMan v. 7.00 (*DNASTAR Lasergene*). O consenso das sequências nucleotídicas foi comparado ao banco de dados GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Ribosomal DataBase Project - RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

3.3.6 Análises filogenéticas

As seqüências consenso foram alinhadas utilizando o software ClustalX. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o software MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), o método selecionado foi Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) e o modelo de substituição adotado *p-distance*. A robustez das topologias foi realizada através da análise de *bootstrap* (1.000 réplicas).

3.3.7 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

As estirpes 3275, 3276, 3303, 3303, 3308, 3309, 3327, 3342 e 3343 foram submetidas à técnica de PFGE. As estirpes foram repicadas em TSA e incubadas por 72 horas a 30°C. Em um tubo contendo 3 mL de solução salina 0,85% foi feita uma suspensão a 2 da escala de McFarland a partir da cultura bacteriana em TSA. Para microtubos foram transferidos 2 mL da suspensão bacteriana, que foram centrifugados a 8.000 RPM por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foram adicionados ao precipitado bacteriano (pellet) 200 µl do tampão PIV e 200 µl agarose 2% (NuSieve® GTG® agarose, BioWhittaker Molecular Applications). A solução foi homogeneizada cuidadosamente com a ponteira, o líquido foi então dispensado no interior de um canudo estéril. Após deixar os canudos 5 minutos na geladeira, com auxílio de um swab e bisturi estéreis os blocos de agarose foram cortados e colocados em um tubo com 2 mL de solução de lise. Esses foram incubados a 37°C por 24 horas. Após este período, a solução de lise foi retirada e

adicionou-se 2 mL da solução contendo EDTA, Sarcosina 1% e proteinase K 1 mg/mL. Os tubos foram deixados durante a noite a 50°C.

Em novos tubos contendo 4 mL de TE 1x foram adicionados 4 blocos de agarose. Os tubos contendo o restante dos blocos foram guardados na geladeira. Os blocos selecionados foram lavados com TE 1x duas vezes por dia durante três dias consecutivos. Após a etapa de lavagem, retirou-se o TE e foram adicionados 200 µl da solução contendo a enzima XbaI (40 unidades por estirpe), tampão 1x e soro albumina bovina (BSA) 0,01%. Os tubos foram incubados a 37°C por 20 horas. Preparou-se 2,5 L do tampão de corrida TBE 0,5x. O gel de agarose a 1,2% foi preparado utilizando 100 mL TBE 0,5x e 1,2 g agarose *Low Melting* (NA, Amersham Biosciences). Após o período de incubação, a solução contendo a enzima foi retirada e os tubos colocados no *heatblock* a 68,5°C para inativar a enzima e derreter a agarose para aplicação no gel. No gel foram aplicadas as estirpes e o ladder 50-1000Kb (Lambda PFG Marker- BioLabs), após a aplicação o gel foi colocado no aparelho de PFGE e iniciada a eletroforese. Condição de corrida: pulso inicial 1 segundo, pulso final 25 segundos por 20 horas sob uma tensão de 6 V, angulação 120° e temperatura de 13°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

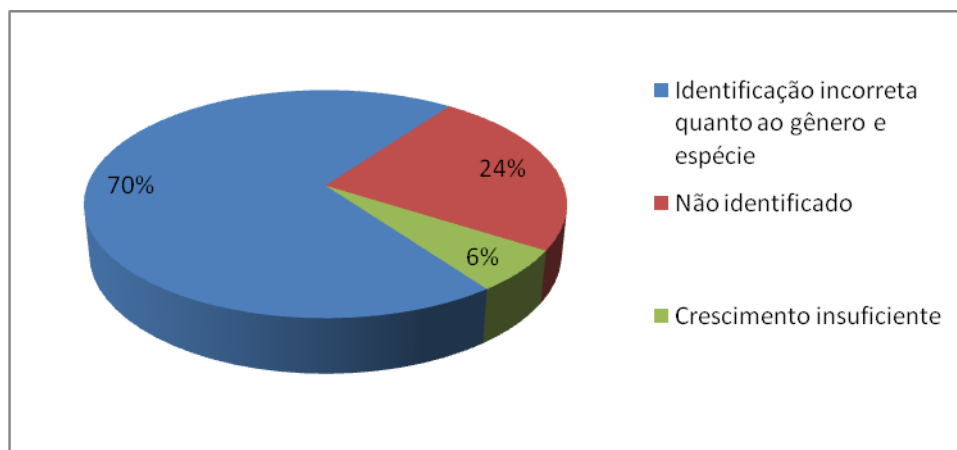
Os gêneros bacterianos caracterizados neste estudo são encontrados em diferentes locais no ambiente. Os cocos Gram positivos não fermentadores da glicose que possuem características fenotípicas semelhantes aos cocos pertencentes ao gênero *Micrococcus* tais como *Kocuria* e *Arthrobacter*, gêneros com espécies inicialmente descritas como *Micrococcus*, podem ser encontrados no ambiente natural assim como em ambientes com condições extremas como áreas limpas (STACKEBRANDT et al., 1995, LA DUC et al., 2007, MOISSE et al., 2007). As áreas limpas ou controladas são ambientes altamente seletivos para microrganismos que toleram dissecação, agentes químicos oxidantes, radiação ultravioleta (LA DUC et al., 2007). O grupo de bactérias caracterizadas neste estudo é um dos mais predominantes em áreas limpas (PACHECO; PINTO, 2010, LA DUC et al., 2007).

As características morfo-tintoriais de todas as estirpes bacterianas incluídas neste estudo foram determinadas pela coloração de Gram, sendo todas caracterizadas como cocos Gram positivos. Todas as estirpes estudadas produziram a enzima catalase e apresentaram o teste do KOH negativo. O teste do KOH pode ser utilizado para confirmar o resultado do Gram (POWERS, 1995, BUCK, 1982). No nosso estudo, os resultados do Gram foram 100% concordantes com os do teste do KOH. A observação da morfologia, tamanho e arranjo das células são importantes na caracterização de cocos Gram positivos de importância clínica. As células bacterianas de *Staphylococcus*, por exemplo, são geralmente menores comparadas às células de *Micrococcus*, e possuem arranjo em forma de cachos, diferente das células dos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus* e outros (KONEMAN, 2010). A coloração de Gram é um método simples para caracterização morfológica de bactérias, mas que pode levar a alguns equívocos, já que certos microrganismos podem ser Gram variáveis e/ou possuírem morfologia que altere ao longo do ciclo de crescimento dos mesmos. No presente estudo, que inclui estirpes ambientais foram identificados gêneros bacterianos que apresentam alteração da morfologia celular conforme as condições de cultivo (*Janibacter* spp.), ciclo de crescimento (*Arthrobacter* spp.) ou fase da curva de crescimento (*Brachy bacterium* spp. e *Dietzia* spp).

A caracterização inicial é importante na diferenciação de alguns grupos de cocos Gram positivos, por exemplo, a prova da catalase pode ser utilizada na

diferenciação das famílias Micrococcaceae e Streptococcaceae. O teste da fermentação da glicose pode ser empregado na diferenciação da família Micrococcaceae e do gênero *Staphylococcus*, lembrando que até a edição de 1986 do Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica este gênero estava incluso na família Micrococcaceae. Atualmente, quinze gêneros fazem parte da família Micrococcaceae (*Acaricomes*, *Arthrobacter*, *Auritidibacter*, *Citricoccus*, *Enteractinococcus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Pelczaria* – nome rejeitado, *Renibacterium*, *Rothia*, *Sinomonas*, *Stomatococcus*, *Yaniella*, *Zhihengliuella*) e o gênero *Staphylococcus* foi transferido para a família Staphylococcaceae com base em estudos de homologia de ácidos nucleicos e outras propriedades como composição da parede celular e de ácidos graxos (EUZÉBY, 2013, KONEMAN, 2010). Assim a determinação do Gram e os testes bioquímicos iniciais são necessários para a escolha do sistema de identificação fenotípica mais adequado a ser empregado. Neste estudo foi incluída apenas a caracterização de cocos Gram positivos que apresentaram resultado negativo para oxidação e fermentação da glicose.

A análise da sequência do gene 16S rRNA foi utilizada como metodologia de referência na identificação. Os resultados obtidos a partir do sistema de identificação automatizado VITEK e VITEK 2, e do sistema semi-automatizado API Staph foram avaliados em paralelo com a identificação obtida pela análise da sequência do gene 16S rRNA. Assim, das 50 estirpes submetidas à identificação pelo sistema VITEK (Tabela 3), 35 (70%) foram identificadas incorretamente quanto ao gênero e espécie, 12 (24%) estirpes não foram identificadas e outras 3 (6%) tiveram crescimento insuficiente (Figura 3). O sistema automatizado VITEK foi substituído pelo Vitek 2 e por este motivo as estirpes que apresentaram crescimento insuficiente não foram repetidas (3415, 3432, 3459), e sim submetidas ao VITEK 2 e API Staph. Das 5 estirpes de *Kocuria* sp. (3319, 3330, 3333, 3474 e 3538 A), identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, 3 estirpes (3319, 3333 e 3474) não foram identificadas pelo sistema VITEK e as outras 2 (3538 A e 3330) foram identificadas incorretamente como *Staphylococcus auriculares*, sendo o resultado da estirpe 3538 A considerado “boa identificação” com 75% de probabilidade de acerto na identificação.

Figura 3 - Dados gerais do Sistema Automatizado VITEK

As 35 estirpes identificadas incorretamente mostraram resultados com elevada probabilidade de acerto (acima de 82%), com exceção da estirpe 3517.2 com 52% e 3330 com 56%. A maioria das estirpes submetidas ao VITEK pertence ao gênero *Micrococcus*, os resultados demonstraram que este sistema não foi capaz de identificar corretamente nenhuma estirpe deste gênero. Todas as estirpes de *Micrococcus* foram identificadas como *Staphylococcus* sp. e apenas uma (3324 A) como *Corynebacterium* sp. O banco de dados do sistema não contempla o gênero *Micrococcus* nem os outros gêneros encontrados neste estudo como *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Demetria*, *Dietzia*, *Janibacter*, *Macrococcus* e *Brachybacterium*. Por esta razão nenhuma destas estirpes foi identificada corretamente. As provas bioquímicas presentes no cartão GPI, específico para identificação de cocos Gram positivos, e o banco de dados foram desenvolvidos para identificação de espécimes de origem clínica.

Dessa forma, o sistema VITEK mostrou ser ineficiente na identificação de cocos Gram positivos não fermentadores da glicose. Contudo, Sadar e colaboradores (1995) consideram aceitável o emprego do sistema VITEK na identificação de *Enterococcus*. Outros trabalhos demonstraram bom desempenho do VITEK na identificação de *Streptococcus* e *Staphylococcus* coagulase-negativo (REFSAHL; ANDERSEN, 1992, JAYARAO et al., 1991). Para cocos Gram positivos de origem clínica o sistema VITEK apresenta melhor desempenho, ainda assim Hamoudi e colaboradores (1984) concluíram que este sistema deve ser utilizado com cautela na identificação de microrganismos Gram positivos.

Tabela 3

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
<i>Micrococcus yunnanensis</i> JCM 16547	Amarela	NR		NR		<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,92	1505
						FJ214355		
						<i>M. luteus</i> DSM20020	99,71	
						AJ536198 (1418pb)		
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,66	
<i>Micrococcus endophyticus</i> JCM 16951	Amarela	NR		NR		<i>M. endophyticus</i> JCM	99,09	1503
						EU005372		
						<i>M. endophyticus</i> JCM	99,72	
<i>Micrococcus flavus</i> JCM 14000	Amarela	NR		NR		<i>M. flavus</i> JCM	99,85	1491
						DQ491453		
<i>Micrococcus luteus</i> INCQS00009	Amarela	NR		NR		<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,50	1503
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,33	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	98,74	

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
<i>Micrococcus luteus</i> INCQS00011	Amarela	NR		NR		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,78 99,53 98,75	1491
<i>Micrococcus luteus</i> INCQS00012	Amarela	NR		NR		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,78 99,53 98,95	1492
<i>Micrococcus luteus</i> INCQS00112	Amarela	NR		NR		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,44 99,00 98,95	1514
<i>Micrococcus luteus</i> INCQS00256	Amarela	NR		NR		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,44 99,00 98,61	1514
<i>Kocuria palustris</i> JCM 12076	Amarela	NR		NR		<i>Kocuria palustris</i> DSM <i>K. rhizophila</i> DSM <i>K. polaris</i> JCM	100 96,80 94,55	1507
<i>Kocuria kristinae</i> ATCC BAA752	-	NR		NR		<i>Kocuria kristinae</i> DSM <i>K. halotolerans</i> DSM <i>K. koreensis</i> JCM	99,38 97,09 97,01	1510

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
<i>Kocuria rizophila</i> INCQS00010	Amarela	NR		NR		<i>Kocuria rhizophila</i> DSM <i>K. salsicia</i> JCM	99,32 98,74	1500
<i>Kocuria rizophila</i> INCQS00116	Amarela	NR		NR		<i>Kocuria rhizophila</i> DSM <i>K. salsicia</i> JCM	99,32 98,74	1498
3275	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	98	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,85 99,59 99,32	1490
3276	Amarela	NI		<i>Micrococcus sp</i>	99,4	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,57 99,39 98,81	1492
3285	Branco creme	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	98,6	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM <i>A globiformis</i> DSM <i>A nicotinovorans</i> DSM	98,23 96,99 96,80	1497
3302	Amarela	NI		NI		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,71 99,60 99,02	1502

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
3303	Creme	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	NI		<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,78	1429
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,65	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	99,28	
3308	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	75	<i>Micrococcus sp</i>	99,4	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,71	1499
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,46	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	98,95	
3309		<i>Staphylococcus auricularis</i>	97	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,64	1504
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,53	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	98,95	
3319	Amarela	<i>Corynebacterium sp</i>	38	<i>Kocuria varians/rosea</i>	97,4	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM	99,93	1505
						<i>K. salsicia</i> JCM	98,81	
3324A	Amarela	<i>Corynebacterium sp</i>	97	<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,57	1488
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,32	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	98,74	
3327	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	98	<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,78	1499
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,53	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	98,95	
3328	Laranja	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	98,6	<i>Dietzia cinnamea</i> DSM	99,49	1415
						<i>D. lutea</i> DSM	98,68	
						<i>D. maris</i> DSM	97,94	

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
3329	Crème	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	NI		<i>Janibacter terrae</i> JCM <i>J. anophelis</i> JCM <i>J. limosus</i> JCM	98,58 98,30 98,30	1487
3330	Amarela	<i>Staphylococcus. hominis</i>	56	<i>Kocuria varians/rosea</i>	96,0	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM <i>K. salsicia</i> JCM	100 98,88	1505
3333	Amarela	<i>Corynebacterium sp</i>	38	<i>Micrococcus sp</i>	99,5	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM <i>K. salsicia</i> JCM	99,93 98,81	1512
3342	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	90	<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,71 99,58 99,21	1440
3343	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,64 99,51 99,14	1444
3347	Branco creme	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. endophyticus</i> JCM <i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665	99,58 99,43 99,33	1509
3355	Amarela pálida	NI		<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,50 99,26 98,67	1491

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
3356	Amarela	NI		<i>Micrococcus sp</i>	83,8	<i>M. yunnanensis JCM</i> <i>M. luteus NCTC2665</i> <i>M. endophyticus JCM</i>	99,43 99,33 98,74	1492
3359	Amarela	NI		NI		<i>M. yunnanensis JCM</i> <i>M. luteus NCTC2665</i> <i>M. endophyticus JCM</i>	99,71 99,60 99,02	1501
3364	Creme	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	NI		<i>M. yunnanensis JCM</i> <i>M. luteus NCTC2665</i> <i>M. endophyticus JCM</i>	99,78 99,53 98,95	1503
3387	Amarela	NI		<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis JCM</i> <i>M. luteus NCTC2665</i> <i>M. endophyticus JCM</i>	99,78 99,52 98,95	1485
3396	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	90	<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis JCM</i> <i>M. luteus NCTC2665</i> <i>M. endophyticus JCM</i>	99,50 99,39 98,81	1496
3409	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. yunnanensis JCM</i> <i>M. luteus NCTC2665</i> <i>M. endophyticus JCM</i>	99,78 99,59 99,02	1494

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
3414	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	98	<i>Micrococcus sp</i>	99,4	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,78 99,60 99,02	1500
3415	Amarela	Crescimento insuficiente		<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. endophyticus</i> JCM <i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665	99,65 99,50 99,39	1496
3432	Banco	Crescimento insuficiente		<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. lylae</i> DSM <i>M. cohnii</i> DSM	99,86 97,44	1494
3442	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	98,6	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,57 99,33 98,74	1498
3447B	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,57 99,40 98,81	1503
3450	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,85 99,66 99,09	1499
3451	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	NI		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,71 99,60 99,02	1503

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
3455	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	98	<i>Micrococcus sp</i>	99,6	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,85 99,73 99,16	1494
3459	Branco creme	Crescimento insuficiente	-	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>Demetria terragena</i> DSM <i>Demacoccus barathri</i> DSM	96,73 94,66	1503
3460B	Amarela	NI		<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,64 99,46 98,88	1505
3464	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,78 99,53 98,95	1490
3466	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. endophyticus</i> JCM <i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665	99,58 99,57 99,46	1492
3471	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	98	<i>S. hominis</i>	68,5	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,57 99,46 98,74	1493
3474	Amarela	NI		<i>Kocuria varians/rosea</i>	76,3	<i>Kocuria palustris</i> DSM <i>K. rosea</i> DSM	100 97,02	1497

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
3496	Amarela	NI		NI		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,71 99,46 98,88	1488
3497	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	NI		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,50 99,26 98,67	1487
3498-2	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	94	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,78 99,53 98,95	1500
3508	Amarela	NI		<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,85 99,59 99,02	1487
3517-2	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	52	<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,71 99,46 98,88	1488
3530	Crème	NI		<i>Micrococcus sp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,71 99,59 99,02	1491
3538-A	Amarelo claro	<i>Staphylococcus auricularis</i>	75	<i>Micrococcus sp</i>	90,6	<i>Kocuria palustris</i> DSM <i>K. rosea</i> DSM	100 97,02	1493

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
3542	Amarela	NI		<i>Micrococcus spp</i>	99,8	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,64 99,39 98,81	1490
3562	Amarelo claro	<i>Staphylococcus auricularis</i>	97	Perfil inaceitável		<i>Brachybacterium conglomeratum</i> DSM <i>B. paraconglomeratum</i> DSM <i>B. faecium</i> DSM	98,62 98,57 98,17	1488
3574	Amarelo claro	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	82	Perfil Inaceitável		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,64 99,53 98,95	1490
3579	Amarela	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	<i>Micrococcus sp</i>	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,64 99,39 98,81	1491
3701	Laranja	<i>Staphylococcus auricularis</i>	99	Identificação incorreta		<i>Macrococcus equiperficus</i> ATCC <i>M. brunensis</i> CCM <i>M. carouselicus</i> DSM <i>M. hajekii</i> CCM <i>M. bovicus</i> ATCC <i>M. lamae</i> CCM	99,59 99,52 99,31 99,31 99,18 98,91	1469

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
3710	Amarela	NR		<i>Kocuria</i>	98,8	<i>Kocuria marina</i> JCM	99,86	1471
				<i>varians/rosea</i>		<i>K. carniphila</i> CCM	98,10	
3723	Amarela	NR		<i>Micrococcus</i> sp	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,92	1499
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,66	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	99,09	
3730	Amarelo claro	NR		<i>Micrococcus</i> sp	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,57	1493
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,46	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	98,88	
3731	Amarela	NR		<i>Micrococcus</i> sp	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,57	1503
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,33	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	98,74	
3732	Amarelo claro	NR		<i>Micrococcus</i> sp	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,64	1490
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,53	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	98,95	
3734	Laranja Claro	NR		<i>Micrococcus</i> sp	99,9	<i>Arthrobacter globiformis</i>	98,09	1497
						DSM	98,05	
						<i>A. oxidans</i> DSM	97,90	
						<i>A. polychromogenes</i> DSM		

Tabela 3 (Cont.)

Identificação fenotípica pelos sistemas VITEK, API Staph e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	Cor da colônia	Identificação VITEK	S (%)	Identificação API	S (%)	Identificação 16S rRNA	S (%)	Pares de Bases (Pb)
3737	Amarela	NR		Não interpretável		<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,71	1503
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,60	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	99,02	
3738	Amarela	NR		<i>Micrococcus</i> sp	99,9	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,50	1492
						<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,26	
						<i>M. endophyticus</i> JCM	98,67	

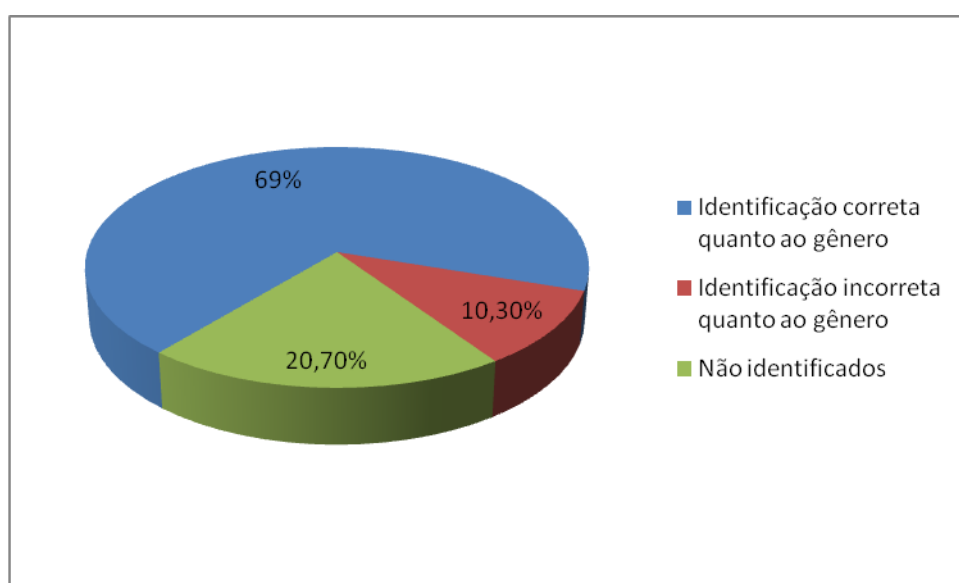
NR: não realizado; NI: não identificado.

M. yunnanensis JCM (FJ214355 – 1426 pb); *M. luteus* (AJ536198 - 1418 pb); *M. luteus* (CP001628 - 1632 pb) ; *M. endophyticus* JCM (EU005372 - 1438 pb); *M. flavus* JCM (DQ491453 – 1407 pb); *M. lylae* (X80750 - 1472 pb): sequência depositada no NCBI referente ao gene 16S rRNA da cepa tipo de cada espécie.

Obs: As sequências nucleotídicas das estirpes foram comparadas com a sequência referente à cepa tipo de cada espécie desta tabela.

O sistema de identificação API Staph foi avaliado utilizando 58 estirpes de cocos Gram positivos não fermentadores da glicose (Tabela 3). Segundo o banco de dados deste sistema, é possível identificar estirpes bacterianas pertencentes aos gêneros *Kocuria*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*. A identificação é feita por um perfil numérico que é comparado ao banco de dados fornecendo um resultado com maior probabilidade. O API Staph identificou 39 (67,3%) estirpes corretamente quanto ao gênero bacteriano, 7 (12,0%) estirpes foram identificadas incorretamente quanto ao gênero e 12 (20,70%) estirpes não identificadas (Figura 4).

Figura 4 - Dados gerais do Sistema Semi-Automatizado API Staph



Das 44 estirpes identificadas pelo sistema API Staph 7 estirpes foram identificadas incorretamente quanto ao gênero bacteriano (3285, 3328, 3333, 3459, 3538 A, 3471 e 3734) e 4 identificadas incorretamente quanto à espécie (3319, 3330, 3474 e 3710). As estirpes 3319, 3330, 3474 e 3710 identificadas como *Kocuria* pelo API Staph tiveram a espécie identificada incorretamente quando comparado ao resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA. O banco de dados apiwebTM contempla apenas as espécies *K. kristinae* e *K. rosea/K. varians*. As espécies *K. rhizophila*, *K. palustris* e *K. marina* que foram detectadas, não são contempladas pelo banco de dados, assim como as outras espécies do gênero *Kocuria* descritas até o momento (total de 14 espécies) (EUZEÉBY, 2013).

O sistema API Staph demonstrou um bom desempenho na identificação do gênero *Kocuria*, quatro das seis estirpes foram identificadas como *Kocuria* spp. Pela análise da sequência do gene 16S rRNA, quatro tiveram o gênero identificado corretamente pelo API Staph e as outras duas (3333 e 3538 A) foram identificadas equivocadamente como *Micrococcus* spp. Os perfis bioquímicos do API Staph referentes às estirpes identificadas como pertencentes ao gênero *Kocuria* e *Micrococcus*, que tiveram a identificação confirmada pela análise do gene 16S rRNA, foram analisados. Com base nesses dados, um perfil “consenso” foi montado para cada gênero (Tabela 4).

A análise do perfil bioquímico mostrou que essas estirpes não utilizam a maioria dos substratos presente na galeria, mas a metabolização da glicose e frutose parece ser importante para a caracterização da estirpe como pertencente ao gênero *Kocuria*, principalmente a glicose. Caso essas provas sejam negativas ou apenas a glicose negativa, o sistema irá fornecer um resultado equivocado, como foi observado para as estirpes 3333 e 3538A que não metabolizaram tais carboidratos. Esta questão pode ser atribuída ao fato destas estirpes pertencerem a espécies do gênero *Kocuria* que não estão incluídas no banco de dados deste sistema de identificação. Com certeza estas provas bioquímicas não diferenciam os gêneros *Micrococcus* e *Kocuria*.

O resultado da oxidação da glicose foi variável quando comparamos o teste convencional (O/F Glicose) e API Staph. Nenhuma estirpe de *Kocuria* oxidou a glicose no teste convencional, já no API Staph as amostras 3330, 3474 e 3710 foram positivas, e 3333 e 3538A indeterminadas, isto é, a coloração do meio ficou laranja ao invés de amarelo que é considerado resultado positivo ou vermelho quando o resultado é negativo. Outras provas bioquímicas também apresentaram o mesmo comportamento. Essa variação para a mesma prova bioquímica entre testes diferentes pode acontecer porque os indicadores de pH utilizados nos testes e a faixa de viragem do pH são diferentes. No caso do sistema de identificação VITEK, o resultado é baseado na turvação. Dessa forma, cada método tem uma maneira para avaliar o resultado dos testes bioquímicos. Além disso, a concentração do substrato também pode variar.

Tabela 4

Perfil bioquímico das estirpes pertencentes aos gêneros *Micrococcus* e *Kocuria* estabelecido pela análise dos resultados obtidos pelo sistema semi-automatizado API Staph

Estirpe	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MSG	NAG	ADH	URE
<i>Micrococcus</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V ^b	-	-	-	V ^d	-	-	-	V ^c
<i>Kocuria</i> sp	V ^b	V ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo; V: variável sendo ^a: n° de estirpes positivas ≥80% , ^b: n° de estirpes positivas ≥50%, ^c: n° de estirpes positivas ≤35% e ^d: n° de estirpes positivas ≤ 10%.

Provas bioquímicas 0: controle; GLU: D-glicose; FRU: D-frutose; MNE: D-manose; MAL: D-maltose; LAC: D-lactose; TRE: D-trealose; MAN: D-manitol; XLT: xilitol; MEL: D-melibiose; NIT: nitrato de potássio; PAL: β-naftil fosfato; VP: piruvato de sódio; RAF: D-rafinose; XYL: D-xilose; SAC: D-sacarose; MSG: metil-αD-glucopiranosido; NAG: N-acetil- glucosamina; ADH: L-arginina; URE: ureia.

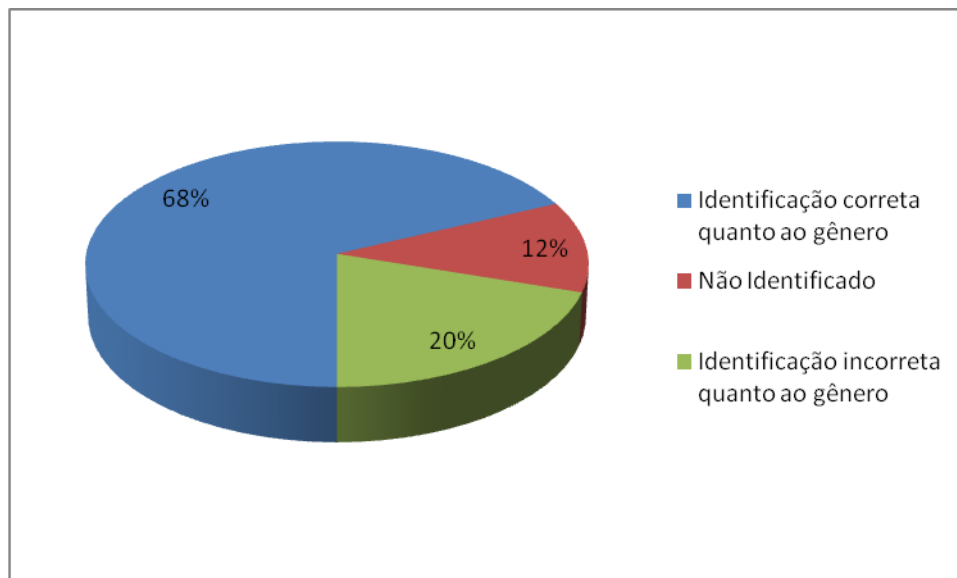
A galeria API Staph identificou 43 estirpes como *Micrococcus* sp., essas apresentaram um perfil bioquímico pouco reativo para a maioria dos substratos presentes na galeria (Tabela 3). De acordo com a identificação realizada pela análise da sequência do gene 16S rRNA, 45 estirpes foram caracterizadas como pertencentes ao gênero *Micrococcus*, dentre essas o sistema API Staph identificou corretamente o gênero para 36 estirpes demonstrando um desempenho razoável (80%). Contudo, 6 estirpes de *Micrococcus* (3359, 3451, 3471, 3496, 3497 e 3574) não foram identificadas pelo sistema API Staph, essas estirpes apresentaram um perfil atípico com diversas provas positivas ou duvidosas. O sistema API Staph só identificou corretamente as estirpes de *Kocuria* e *Micrococcus* que apresentaram um perfil bioquímico semelhante ao perfil presente no banco de dados. Caso uma estirpe fosse positiva para outras provas diferente das que constam na tabela 4, o perfil numérico era modificado gerando resultados equivocados.

Dentro do grupo de estirpes bacterianas em análise, sete estirpes (3285, 3734, 3328, 3329, 3459, 3562 e 3701) foram identificadas pelo 16S rRNA como pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Janibacter*, *Demetria*, *Brachybacterium* e *Macrococcus*. Estas estirpes não foram identificadas pelo sistema API Staph, uma vez que esses gêneros não estão presentes no banco de dados. Os perfis bioquímicos das estirpes pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Dietzia* e *Demetria* (3285, 3734 3328 e 3459) foram semelhantes aos perfis das cepas de *Micrococcus* em estudo (positivos para nitrato de potássio e β-naftil

fosfato, e negativos para os demais substratos), gerando identificações equivocadas como *Micrococcus* sp com porcentagens elevadas (>98,6%). Já as estirpes pertencentes aos gêneros *Janibacter*, *Brachybacterium* e *Macrococcus* (3329, 3562 e 3701) obtiveram os seguintes resultados perfil inaceitável, perfil inaceitável e identificação incorreta, respectivamente. As estirpes 3562 (*Brachybacterium*) e 3701 (*Macrococcus*) tiveram perfis atípicos, foram positivos em diversos substratos. Quando o perfil numérico não é correspondente com nenhum outro perfil no banco de dados, o resultado é considerado inaceitável.

Segundo Heikens e colaboradores (2005), o API Staph é um teste razoável para identificação de *Staphylococcus* coagulase-negativo. Neste trabalho, o método fenotípico (API Staph) e genotípico (sequenciamento dos genes 16S rRNA e tuf – codifica o fator Tu de alongamento) de identificação foram comparados. A maioria dos trabalhos de avaliação do sistema API Staph foi desenvolvido para *Staphylococcus*. Apenas dois trabalhos (MARPLES; RICHARDSON, 1982, GAHRN-HANSEN et al., 1987) utilizaram estirpes de *Micrococcus*, contudo essas estirpes foram identificadas pela metodologia convencional e considerando o ano das publicações há uma grande chance de terem sido identificadas incorretamente.

No presente estudo, 25 estirpes foram identificadas pelo sistema VITEK 2. Dezesete estirpes foram identificadas corretamente quanto ao gênero bacteriano (68%), 3 estirpes não identificadas (12%) e 5 estirpes identificadas incorretamente quanto ao gênero (20%) (Figura 5). O sistema VITEK 2 identificou corretamente as 5 estirpes de *Kocuria* sp. (3330, 3333, 3474, 3539 A e 3710), mas a espécie foi identificada equivocadamente (Tabela 5). Dentre os microrganismos identificados pelo cartão GP somente as espécies *K. kristinae*, *K. rosea* e *K. varians* estão inclusas. Assim, outras espécies de *Kocuria* quando submetidas à identificação pelo Vitek 2 terão somente o gênero identificado corretamente.

Figura 5 - Dados gerais do Sistema Automatizado VITEK 2

A partir da análise dos perfis bioquímicos das estirpes identificadas como *Kocuria* e *Micrococcus* pelo VITEK 2 e confirmadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, um perfil “consenso” foi descrito para cada gênero (Tabela 6). Todas as estirpes de *Micrococcus* foram positivas para as provas LeuA (Leucina Arilamidase), AlaA (Alanina Arilamidase), ProA (L-Prolina Arilamidase), PyrA (L-Pirrolidonil Arilamidase), AGLU (Alfa-Glucosidase), os perfis das estirpes foram muito semelhantes. Todas as estirpes de *Kocuria* foram positivas para ADH1 (arginina dihidrolase) e ILATk (alcalinização L-lactato). As estirpes 3333 e 3538 A foram pouco reativas comparado a 3330 e 3710. A cepa tipo *K. palustris* apresentou apenas uma prova bioquímica igual a 3538 A (ADH1), ambas foram pouco reativas.

As quatro cepas tipo (*M. yunnanensis* JCM 16547, *M. endophyticus* JCM 16951, *M. flavus* JCM 14000 e *Kocuria palustris* JCM 12076) foram identificadas corretamente quanto ao gênero bacteriano (Tabela 4). Os perfis bioquímicos das cepas tipo de *Micrococcus* foram semelhantes ao perfil consenso do gênero. O perfil da estirpe 3455 (*M. yunnanensis*/*M. luteus*) e 3432 (*M. lylae*) foram idênticos. Assim, não foi possível associar um perfil ou prova bioquímica específica às espécies de *Micrococcus*.

Tabela 5

Identificação fenotípica pelo sistema VITEK 2 e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	VITEK 2	S (%)	16S rRNA gene	S (%)	Pares de bases
<i>M. yunnanensis</i> JCM 16547	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. yunnanensis</i> JCM FJ214355	99,92	1505
			<i>M. luteus</i> DSM20020 AJ536198 (1418pb)	99,71	
			<i>M. luteus</i> NCTC2665 CP001628 (1632pb)	99,66	
			<i>M. endophyticus</i> JCM EU005372	99,09	
<i>M. endophyticus</i> JCM 16951	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. endophyticus</i> JCM EU005372	99,72	1503
<i>M. flavus</i> JCM 14000	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. flavus</i> JCM DQ491453	99,85	1491
<i>K. palustris</i> JCM 12076	<i>Kocuria varians</i>	98	<i>Kocuria palustris</i> DSM	100	1507
			<i>K. rhizophila</i> DSM	96,80	
3275	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	93-95	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,85	1490
			<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,59	
3328	<i>Não identificado</i>		<i>M. endophyticus</i> JCM	99,32	1415
			<i>Dietzia cinnamea</i> DSM	99,49	
			<i>D. lutea</i> DSM	98,68	
			<i>D. maris</i> DSM	97,94	
3329	<i>Dermaococcus sp/ Kytococcus sp</i>	96-99	<i>Janibacter terrae</i> JCM	98,58	1487
			<i>J. anophelis</i> JCM	98,30	
			<i>J. limosus</i> JCM	98,30	

Tabela 5 (Cont.)

Identificação fenotípica pelo sistema VITEK 2 e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	VITEK 2	S (%)	16S rRNA gene	S (%)	Pares de bases
3330	<i>Kocuria varians</i>	96	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM <i>K. salsicia</i> JCM	100 98,88	1505
3333	<i>Kocuria varians</i>	95	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM <i>K.salsicia</i> JCM	99,93 98,81	1512
3359	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,71 99,60 99,02	1501
3364	<i>Kytococcus</i> sp/ <i>Micrococcus</i> sp/ <i>Dermacoccus</i> sp	BD	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,78 99,53 98,95	1503
3414	Não identificado		<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,78 99,60 99,02	1500
3415	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. endophyticus</i> JCM <i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665	99,65 99,50 99,39	1496
3432	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. lylae</i> DSM	99,86	1494
3455	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. yunnanensis</i> JCM <i>M. luteus</i> NCTC2665 <i>M. endophyticus</i> JCM	99,85 99,73 99,16	1494
3459	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>Demetria</i> sp.	96,73	1503

Tabela 5 (Cont.)

Identificação fenotípica pelo sistema VITEK 2 e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	VITEK 2	S (%)	16S rRNA gene	S (%)	Pares de bases
□ 3466	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. endophyticus</i> JCM	99,58	1492
			<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,57	
			<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,46	
3474	<i>Kocuria varians</i>	94	<i>Kocuria palustris</i> DSM	100	1497
			<i>K. rosea</i> DSM	97,02	
3538-A	<i>Kocuria varians</i>	93	<i>Kocuria palustris</i> DSM	100	1493
			<i>K. rosea</i> DSM	97,02	
3562	<i>Kocuria kristinae</i>	86	<i>Brachybacterium conglomeratum</i> DSM	98,62	1488
			<i>B. paraconglomeratum</i> DSM	98,57	
			<i>B. faecium</i> DSM	98,17	
3701	<i>Granulicatella</i> sp/ <i>Leuconostoc</i> sp	BD	<i>Macrococcus equiperdicus</i> ATCC	99,59	1469
			<i>M. brunensis</i> CCM	99,52	
			<i>M. carouzelicus</i> DSM	99,31	
			<i>M. hajekii</i> CCM	99,31	
			<i>M. bovicus</i> ATCC	99,18	
			<i>M. lamae</i> CCM	98,91	
3710	<i>Kocuria varians</i>	92	<i>Kocuria marina</i> JCM	99,86	1471
			<i>K. carniphila</i> CCM	98,10	
3723	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,92	1499
			<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,66	
			<i>M. endophyticus</i> JCM	99,09	

Tabela 5 (Cont.)

Identificação fenotípica pelo sistema VITEK 2 e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Estirpe	VITEK 2	S (%)	16S rRNA gene	S (%)	Pares de bases
□ 3730	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,57	1493
			<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,46	
			<i>M. endophyticus</i> JCM	98,88	
3731	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,57	1503
			<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,33	
			<i>M. endophyticus</i> JCM	98,74	
3732	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,64	1490
			<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,53	
			<i>M. endophyticus</i> JCM	98,95	
3734	Não identificado		<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM	98,09	1497
			<i>A. oxidans</i> DSM	98,05	
			<i>A. polychromogenes</i> DSM	97,90	
3737	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,71	1503
			<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,60	
			<i>M. endophyticus</i> JCM	99,02	
3738	<i>Micrococcus luteus/ M. lylae</i>	96-99	<i>M. yunnanensis</i> JCM	99,50	1492
			<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,26	
			<i>M. endophyticus</i> JCM	98,67	

BD: baixa discriminação

As sequências nucleotídicas das estirpes e cepas tipo sequenciadas foram comparadas a sequência da cepa tipo de cada espécie depositada no NCBI.

Tabela 6

Perfil bioquímico das estirpes pertencentes aos gêneros *Micrococcus* e *Kocuria* estabelecido pela análise dos resultados obtidos pelo sistema automatizado VITEK 2

Estirpe	AMY	PIPLC	dXYL	ADH1	BGAL	AGLU	APPA	CDEX	AspA	BGAR	AMAN	PHOS	LeuA	ProA	BGURr	AGAL	PyrA	BGUR	AlaA	TyrA	dSOR	URE
<i>Micrococcus</i> sp	-	-	-	V ^b	-	V ^a	V ^c	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	V ^a	-	V ^c
<i>Kocuria</i> sp	-	-	-	+	V ^c	V ^c	-	-	-	-	-	-	V ^c	-	-	-	V ^c	-	V ^b	-	-	V ^c
Estirpe	POLYB	dGAL	dRIB	ILATk	LAC	NAG	dMAL	BACI	NOVO	NC6.5	dMAN	dMNE	MBdG	PUL	dRAF	O129R	SAL	SAC	dTRE	ADH2s	OPTO	
<i>Micrococcus</i> sp	-	-	-	V ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Kocuria</i> sp	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V ^c	-	-	V ^c	

+: positivo; -: negativo; V: variável sendo ^a: n° de estirpes positivas ≥80%, ^b: n° de estirpes positivas ≥50%, ^c: n° de estirpes positivas <50% e ^d: n° de estirpes positivas ≤ 10%.

AMY: D-amígdalina; PIPLC: fosfatidilinositol fosfolipase C; dXYL: D-xilose; ADH1: arginina dihidrolase 1; BGAL: beta-galactosidase; AGLU: alfa-glucosidase; APPA: Ala-Fe-Pro arilamidase; CDEX: ciclodextrina; AspA: L-aspartato arilamidase; BGAR: beta galactopiranosidase; AMAN: alfa-manosidase; PHOS: fosfatase; LeuA: leucina arilamidase; ProA: L-prolina arildaminase; BGURr: beta-glucuronidase; AGAL: alfa-galactosidase; PyrA: L-pirrolidoniil arilamidase; BGUR: beta-glucuronidase; AlaA: alanina arilamidase; TyrA: tirosina arilamidase; dSOR: D-sorbitol; URE: uréase; POLYB: resistência à polimixina B; dGAL: D-galactose; dRIB: D-ribose; ILATk: alcalinização L-lactato; NAG: N-acetil-D-glucosanimina; dMAL: D-maltose; BACI: resistência à bacitracina; NOVO: resistência à novobiocina; NC6.5: crescimento em cloreto de sódio (NaCl) 6,5%; dMAN: D-manitol; dMNE: D-manose; MBdG: metil-B-D-glucoriranosídeo; PUL: pululano; dRAF: D-rafinose; O129R: resistência O/129; SAL: salicina; SAC: sacarose; dTRE: D-trealose; ADH2s: arginina dihidrolase 2; OPTO: resistência à optoquina.

As 12 estirpes pertencentes ao gênero *Micrococcus* identificadas pelo sistema VITEK 2 geraram o resultado “*slashline*”. Este resultado refere-se a uma identificação taxonômica multi opcional. Isto ocorre quando o perfil bioquímico é o mesmo para um grupo de microrganismos, por exemplo: *M. luteus* e *M. lylae*; *Dermacoccus nishinomiyaensis* e *Kytococcus sedentarius* dentre outros. Testes suplementares sugeridos pelo VITEK 2 podem ser utilizados para separar os grupos multi opcionais ou de fraca discriminação (MANUAL VITEK 2, 2013).

O sistema VITEK 2 sugere a diferenciação das espécies *M. luteus* e *M. lylae* com base na coloração da colônia, citando que 95% das estirpes de *M. luteus* apresentam coloração da colônia amarela e apenas 1% das estirpes de *M. lylae* apresentam colônia com essa coloração (MANUAL VITEK 2, 2013). Essa diferenciação baseada na coloração da colônia é arbitrária, uma vez que outras espécies de *Micrococcus* também apresentam colônia com coloração amarela. A estirpe 3432 identificada pela análise da sequência do gene 16S rRNA como *M. lylae* não teve a espécie identificada corretamente por esse sistema apesar desta espécie estar contemplada no banco de dados. As estirpes 3329, 3364, 3459, 3562 e 3701 pertencentes aos gêneros *Janibacter*, *Micrococcus*, *Demetria*, *Brachybacterium* e *Macrococcus* respectivamente foram identificadas incorretamente com elevada probabilidade de acerto da identificação, com exceção da 3364 e 3701. Estes gêneros não estão presentes no banco de dados do sistema VITEK 2, exceto o gênero *Micrococcus*.

As 3 estirpes não identificadas pelo sistema VITEK 2 foram identificadas pela análise da sequência do gene 16S rRNA como pertencentes aos gêneros *Dietzia* (3328), *Arthrobacter* (3734) e *Micrococcus* (3414), os gêneros *Dietzia* e *Arthrobacter* não estão presentes no banco de dados do referido sistema. A estirpe 3414 não foi identificada, embora o perfil bioquímico desta fosse semelhante aos perfis de *Micrococcus* (positivo para LeuA, AlaA, ProA, URE e PyrA).

Para uma melhor avaliação do sistema VITEK 2 seria necessário um número maior de estirpes. Ben-Ami e colaboradores (2005) verificaram que 20 estirpes clínicas foram equivocadamente identificadas como *Kocuria* sp pelo VITEK 2, sendo que a análise do gene 16S rRNA mostrou que todos os estirpes pertenciam ao gênero *Staphylococcus*. Segundo os autores a identificação de estirpes clínicas como *Kocuria* sp é suspeita e requer confirmação genotípica. Mas, Boudewijns e colaboradores (2005) identificaram duas estirpes clínicas como *K. kristinae* pelo

VITEK 2 e o resultado foi confirmado pela análise da sequência do gene 16S rRNA.

Diversos estudos consideram o sistema VITEK 2 aceitável para identificação (CROWLEY et al., 2012, GHERARDI et al., 2012, CHATZIGEORGIOU et al., 2010, WALLET et al., 2005, FUNK; FUNK-KISSLING, 2005, SPANU et al., 2003), embora o sistema apresente limitações para determinados grupos bacterianos como *Staphylococcus* coagulase-negativo (DELMAS et al., 2008, KIM et al., 2008).

Os resultados obtidos neste estudo utilizando o equipamento VITEK 2 demonstraram que o sistema é eficiente na identificação dos gêneros *Kocuria* e *Micrococcus*, pois 100% (5/5) das estirpes de *Kocuria* e 85,7% (12/14) das estirpes de *Micrococcus* foram identificados corretamente. Porém, para os outros gêneros de cocos Gram positivos não fermentadores da glicose que não estão presentes no banco de dados do sistema VITEK 2, esses não serão identificados ou o sistema fornecerá identificações equivocadas.

Dentre os três sistemas de identificação fenotípica avaliados, apenas os sistemas API Staph e o VITEK 2 tiveram uma acurácia razoável para identificação dos gêneros *Micrococcus* e *Kocuria*. Os gêneros *Janibacter*, *Arthrobacter*, *Demetria*, *Brachybacterium* e *Dietzia* identificados pela análise da sequência do gene 16S rRNA foram caracterizados como cocos Gram positivos. Contudo, esses gêneros podem se apresentar sob a forma de cocobacilo dependendo do meio de cultura utilizado, fase da curva de crescimento ou ciclo de crescimento (KOCH, SCHUMANN, STACKEBRANDT, 1995, COLLINS, BROWN, JONE, 1988, GROTH et al., 1997, RAINEY et al., 1995, MARTIN et al., 1997). A determinação da morfologia pelo Gram é uma etapa crítica, se a caracterização for equivocada os testes subsequentes poderão ser conduzidos de forma errada levando a uma identificação incorreta (USP, 2011). Entretanto diferente do que é observado para estirpes de origem clínica, as estirpes de origem ambiental podem apresentar variações quanto a morfologia e se apresentarem como Gram variável. Deste modo, estas características dificultam a identificação fenotípica destas estirpes.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), as técnicas microbiológicas e bioquímicas convencionais são geralmente satisfatórias para identificação dos microrganismos isolados do teste de esterilidade. Porém, este estudo corrobora com outros trabalhos que demonstraram que as técnicas convencionais apresentam limitações para identificação de espécimes ambientais (SOUZA, 2010, BAILO, 2007, ROCHA, 2006, CUNDELL, 2006). O gênero *Micrococcus* e outros relacionados a

esse, como *Kocuria*, apresentam características fenotípicas muito semelhantes. Esses gêneros não utilizam a maioria dos substratos das provas fenotípicas utilizadas para a identificação de bactérias de origem clínica, o que dificulta a identificação fenotípica deste grupo bacteriano. Além disso, muitas espécies foram descritas com uma única cepa e os dados fenotípicos descritos não representam as características mais comuns da espécie em questão.

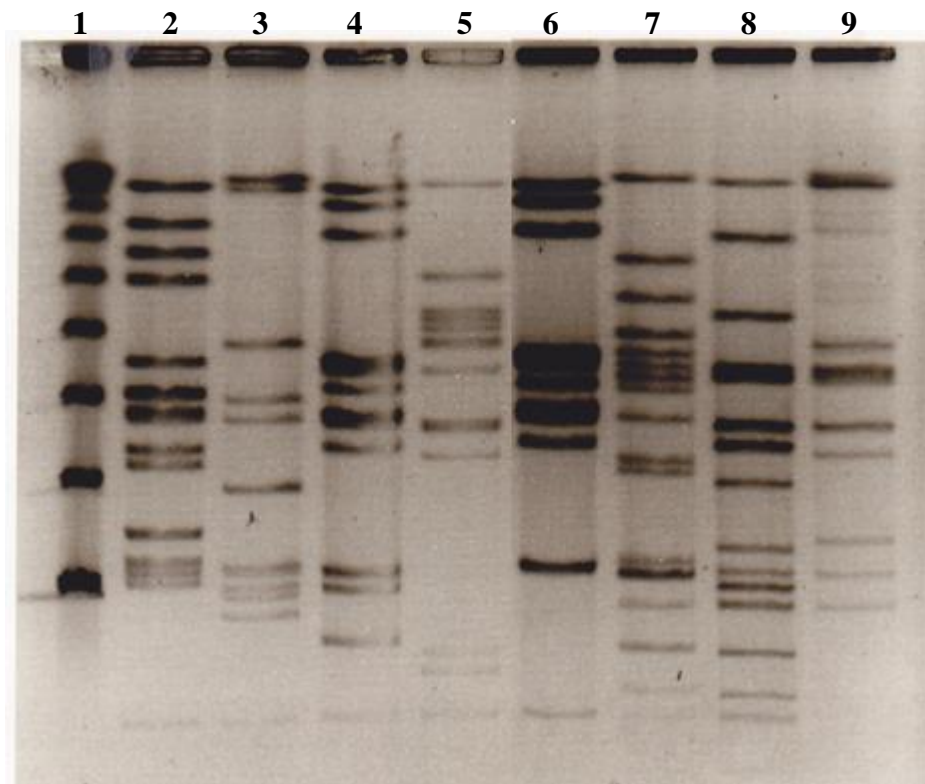
Os gêneros *Micrococcus*, *Kocuria*, *Janibacter*, *Arthrobacter*, *Demetria*, *Brachybacterium*, *Macrococcus* e *Dietzia* identificados pela análise da sequência do gene 16S rRNA neste estudo mostram a diversidade dos cocos Gram positivos cultiváveis não fermentadores da glicose que podem ser encontrados em ambientes controlados ou como contaminantes em testes de esterilidade, e possivelmente em produtos farmacêuticos. Destes gêneros somente dois (*Micrococcus* e *Kocuria*) estão presentes nos bancos de dados dos sistemas de identificação fenotípica convencional, e ainda assim poucas espécies desses gêneros estão incluídas. Tais resultados também alertam para a necessidade da aplicação de metodologias moleculares na identificação de microrganismos de origem ambiental e que as técnicas bioquímicas fenotípicas não são satisfatórias para esta finalidade, diferente do que é recomendado pela Farmacopeia Brasileira (2010).

A Farmacopeia Americana (2011) ressalta que para alguns grupos bacterianos, como não fermentadores, corinebactérias e *Staphylococcus* coagulase-negativo, os sistemas de identificação fenotípica podem não ter um bom desempenho. Além disso, outras questões como limitação do banco de dados, espécies não reativas ou ainda não descritas são mencionados como problemas que requerem a identificação genotípica. Entretanto, a Farmacopeia Brasileira (2010) aborda a aplicação de metodologias moleculares apenas para tipagem de microrganismos com o objetivo de determinar clonalidade e origem. A técnica de amplificação de ácidos nucleicos descrita na Farmacopeia cita o princípio do método, procedimento, avaliação e interpretação dos resultados e garantia da qualidade. Mas, apenas a aplicação na detecção do RNA contaminante do vírus da hepatite C (HCV) em misturas de plasma é descrita.

As estirpes selecionadas submetidas ao PFGE foram identificadas como *M.luteus*/*M.yunnanensis* pela análise da sequência do gene 16S rRNA (Figura 6). Apesar da falta de definição da espécie, as estirpes analisadas foram recuperadas no monitoramento ambiental no ano de 2005, e a análise sequencial das estirpes

teve como objetivo verificar se representavam a mesma fonte de contaminação. O perfil de bandas obtido mostrou que as estirpes são diferentes uma das outras, indicando que esses microrganismos estão presentes no ambiente, e não representam uma única fonte de contaminação. A estirpe 3308 apresentou problema na eletroforese e por este motivo o perfil não está ilustrado.

Figura 6 - PFGE. Perfil de restrição obtido com a enzima XbaI. Linhas verticais numeradas representam: 1- Marcador da tamanho molecular, 2 - 3275, 3 - 3276, 4 -3302, 5 - 3303, 6 - 3309, 7 - 3327, 8 - 3342, 9 - 3343.



A análise do gene 16S rRNA foi eficiente na determinação de gênero bacteriano (Tabela 3), 8 gêneros bacterianos foram identificados (*Micrococcus*, *Kocuria*, *Janibacter*, *Arthorbacter*, *Demetria*, *Brachybacterium*, *Macrococcus* e *Dietzia*). Todas as estirpes foram identificadas quanto ao gênero bacteriano por essa metodologia, os sistemas API Staph e VITEK 2 identificaram corretamente apenas 69 e 68% das estirpes, respectivamente. Assim, somente com a análise da sequência do gene 16S rRNA foi possível identificar todas as estirpes provenientes

de ambientes controlados ou de contaminantes de produtos estéreis. Com relação à determinação da espécie bacteriana, segundo o parâmetro recomendado por Stackebrandt e Ebers (2006), não é possível diferenciar espécies de estirpes que compartilham similaridade acima de 98,70% para o gene 16S rRNA. As estirpes 3285, 3329, 3459, 3562 e 3734 apresentam similaridade menor que 98,7% com as espécies descritas mais relacionadas, este resultado sugere que essas estirpes possam pertencer a uma espécie bacteriana nova. Para determinar se realmente estas representam uma espécie bacteriana nova, é necessário submeter essas estirpes a metodologia de reassociação de DNA-DNA total e a caracterização química celular. Com relação à estirpe 3459 identificada como pertencente ao gênero *Demetria* será provavelmente necessário realizar somente a caracterização química, uma vez que apresentou uma similaridade de 96,73% com *Demetria terrigena*. Este gênero foi descrito em 1997 e só existe uma espécie descrita até o momento (EUZÉBY, 2013).

Baseado nas recomendações de Stackebrandt e Ebers (2006) , só foi possível determinar a espécie das estirpes 3432 (*M. lylae*), 3474 (*K. palustris*), 3538 A (*K. palustris*), 3710 (*K. marina*) e 3328 (*Dietzia cinnamea*), essas apresentaram similaridade acima de 98,7% para o gene 16S rRNA com apenas uma espécie já descrita. Para as estirpes (3319, 3330 e 3333) identificadas como *Kocuria*, não foi possível discriminar a espécie. Estas apresentaram similaridade com *K. rhizophila* (>99,9%) e *Kocuria salsicia* (>98,7%). Embora provavelmente pertençam a espécie *Kocuria rhizophila*, seria necessário avaliar outro gene conservado como o *rpoB* para confirmar a identificação. Essa análise não foi realizada pois não dispomos da cepa tipo de *K. salsicia*, somente sequências do gene 16S rRNA estão depositados no banco de dados *GenBank*.

Com base na análise filogenética do gene 16S rRNA, foi possível observar que as estirpes pertencentes aos gêneros *Micrococcus*, *Kocuria*, *Janibacter*, *Arthrobacter*, *Demetria* e *Brachybacterium* ficaram localizadas dentro do grupo relacionado ao gênero (Figura 7). As estirpes 3285 (*Arthrobacter*), 3734 (*Arthrobacter*), 3562 (*Brachybacterium*), 3459 (*Demetria*) e 3329 (*Janibacter*) agruparam dentro do grupo relacionado ao gênero correspondente. É possível observar que essas estão alocadas em ramos distintos da espécie mais relacionada. A topologia da árvore demonstra que essas estirpes são diferentes da espécie mais próxima, associando esta informação ao valor de similaridade do gene 16S rRNA, os

resultados sugerem que podem representar espécies novas (Figura 7). As amostras identificadas como *Kocuria* agruparam com as espécies relacionadas do gênero formando grupos monofiléticos, demonstrando um elevado grau de relacionamento entre as mesmas. Embora não seja possível diferenciar as estirpes 3319, 3330 e 3333 pela similaridade do gene 16S rRNA, essa análise aponta que essas estão mais próximas da espécie *K. rhizophila* do que *K. salsicia* (Figura 7).

As estirpes 3285 e 3474 foram identificadas como *Arthrobacter* utilizando a análise da sequência do gene 16S rRNA, a topologia da árvore filogenética do gênero sugere que realmente essas estejam mais relacionadas com as espécies *A. crystallopoietes* e *A. globiformis* segundo os valores de similaridade, respectivamente. Assim, a filogenia está de acordo com os baixos valores de similaridade, corroborando a hipótese de que as estirpes 3285 e 3474 possam ser espécies novas (Figura 8).

Com relação ao gênero *Micrococcus*, não foi possível diferenciar as espécies *M. luteus*, *M. yunnanensis* e *M. endophyticus* pela análise da sequência do gene 16S rRNA, uma vez que estas compartilham valores de similaridade maiores que 98,7% (Tabela 3). Entretanto, a análise filogenética demonstrou claramente a formação de dois grupos distintos entre *M. luteus*/*M. yunnanensis* e *M. endophyticus* (Figura 9). As amostras 3415 e 3347 que apresentaram maior similaridade para o gene 16S rRNA com *M. endophyticus* agruparam próximo a referida espécie. As espécies *M. luteus* e *M. yunnanensis* são muito próximas, não sendo possível evidenciar uma diferença significativa pela análise filogenética do gene 16S rRNA. Todas as estirpes incluídas nesta avaliação ficaram mais próximas de *M. yunnanensis* (Figura 9 e 10). Dentro deste grupo (3364, 3542, *M. luteus* INCQS00011 e INCQS00112) se destacaram demonstrando haver alguma variação dentro do grupo de *M. yunnanensis*.

Para diferenciar as espécies *M. luteus*, *M. yunnanensis* e *M. endophyticus* foram realizadas análises das sequências de outros genes conservados como *rpoB*, *gyrB*, *groEL* e *recA*. O gene *rpoB* foi sequenciado parcialmente gerando um fragmento de 400 pb aproximadamente (Tabela 7), essa região apresenta alta variabilidade e está localizada entre 2700 e 3300 pb do gene (KHAMIS, RAOULT, LA SCOLA, 2004). Contudo, esse trabalho foi baseado no gênero *Corynebacterium* e para tal demonstrou ser um bom alvo para identificação. Os mesmos iniciadores foram utilizados para *Micrococcus*, a análise parcial do gene mostrou que as

espécies *M. yunnanensis* e *M. luteus* apresentam elevada similaridade (>99%), não permitindo a diferenciação entre essas. Mas, foi possível fazer a diferenciação para *M. endophyticus* e identificação das estirpes 3347, 3415 e 3466. O valor de corte para identificação baseado na análise do gene *rpoB* depende do tamanho da sequência nucleotídica, para o fragmento sequenciado uma similaridade de no mínimo 94-95% seria adequada para designar corretamente uma espécie. Para as espécies estreitamente relacionadas (*M. luteus*, *M. yunnanensis* e *M. endophyticus*), observou-se um valor superior, 96% de similaridade, ao sugerido por Adékambi e colaboradores (2008). O gene *rpoB* têm sido utilizado em estudos taxonômicos de diversos gêneros bacterianos (KHAMIS, RAOULT, LA SCOLA, 2004). Sendo a análise da região hipervariável mais adequada para identificação e discriminação de espécies (ADÉKAMBI et al., 2008). As cepas de referência da espécie *M. luteus* da Coleção de Cultura do INCQS não foram analisadas quanto a sequência do gene *rpoB* porque os resultados preliminares já indicavam que este não era um gene informativo para diferenciação de *M. luteus* e *M. yunnanensis*.

Com a análise dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *recA* e *gyrB* não evidenciou nenhuma diferença significativa nos valores de similaridade entre *M. luteus* e *M. yunnanensis*, as sequências nucleotídicas e de aminoácidos mostraram elevada similaridade entre estas espécies (Tabela 7).

Figura 7 - Diversidade microbiana encontrada no ambiente controlado. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA (1239 nucleotídeos) utilizando o método de Neighbor-Joining (*p-distance*). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 1% de divergência.

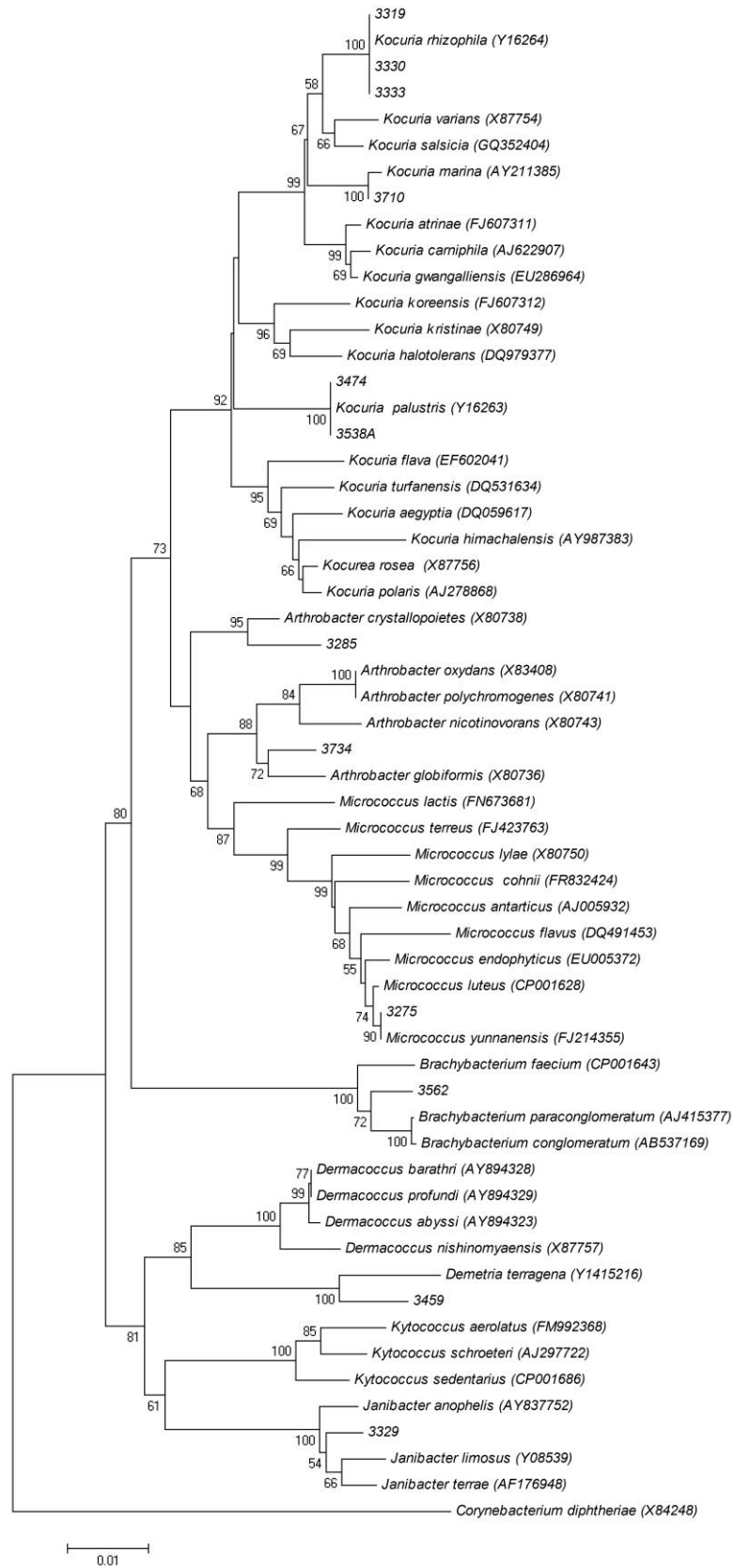


Figura 8 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA do gênero *Arthrobacter* (1414 nucleotídeos) utilizando o método de Neighbor-Joining (*p-distance*). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,5% de divergência.

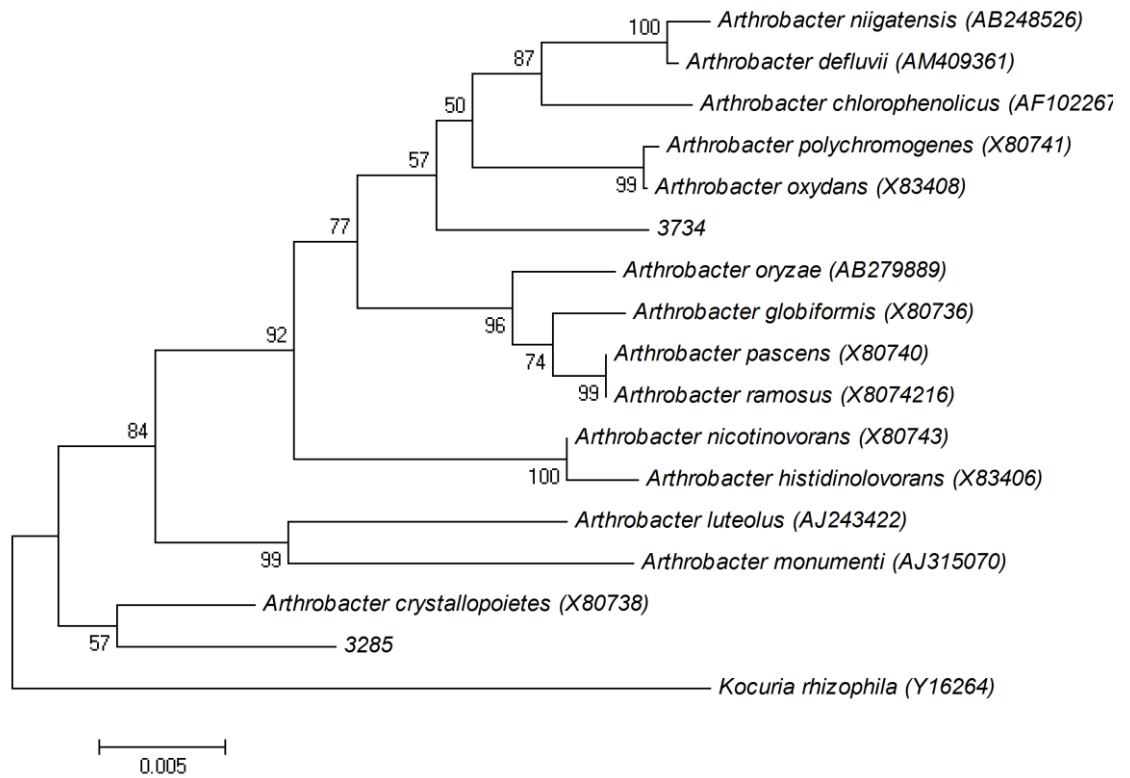
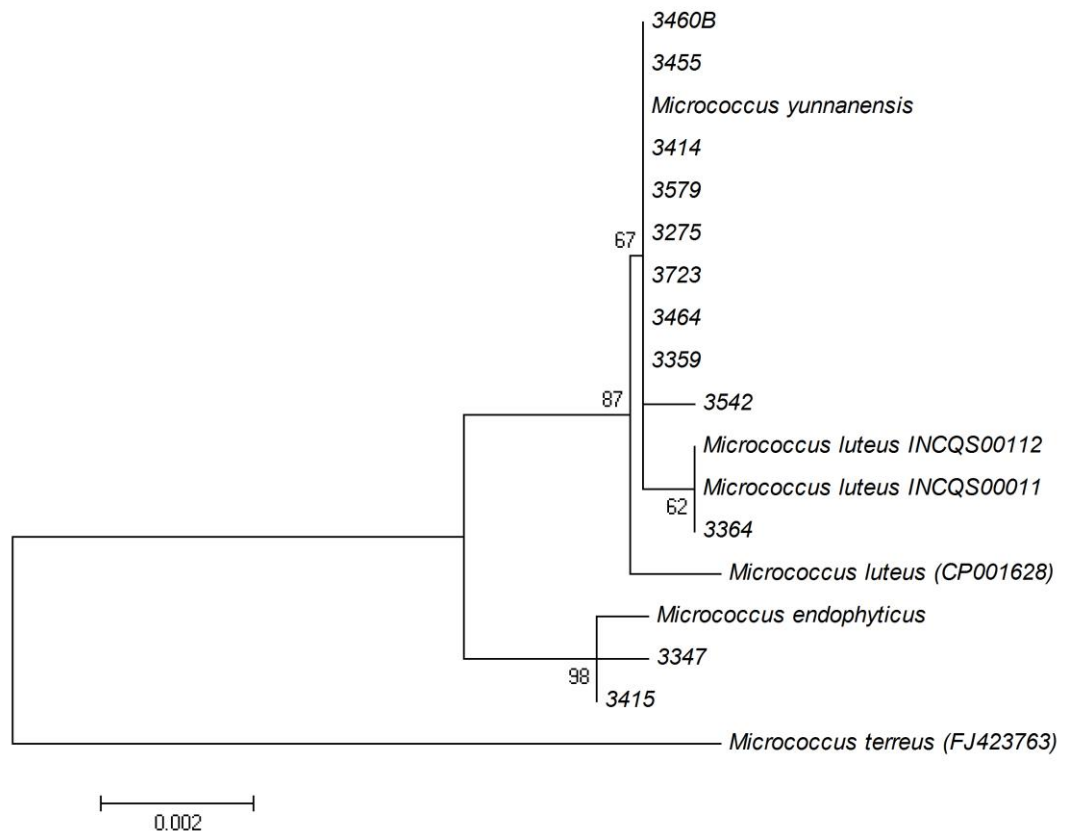


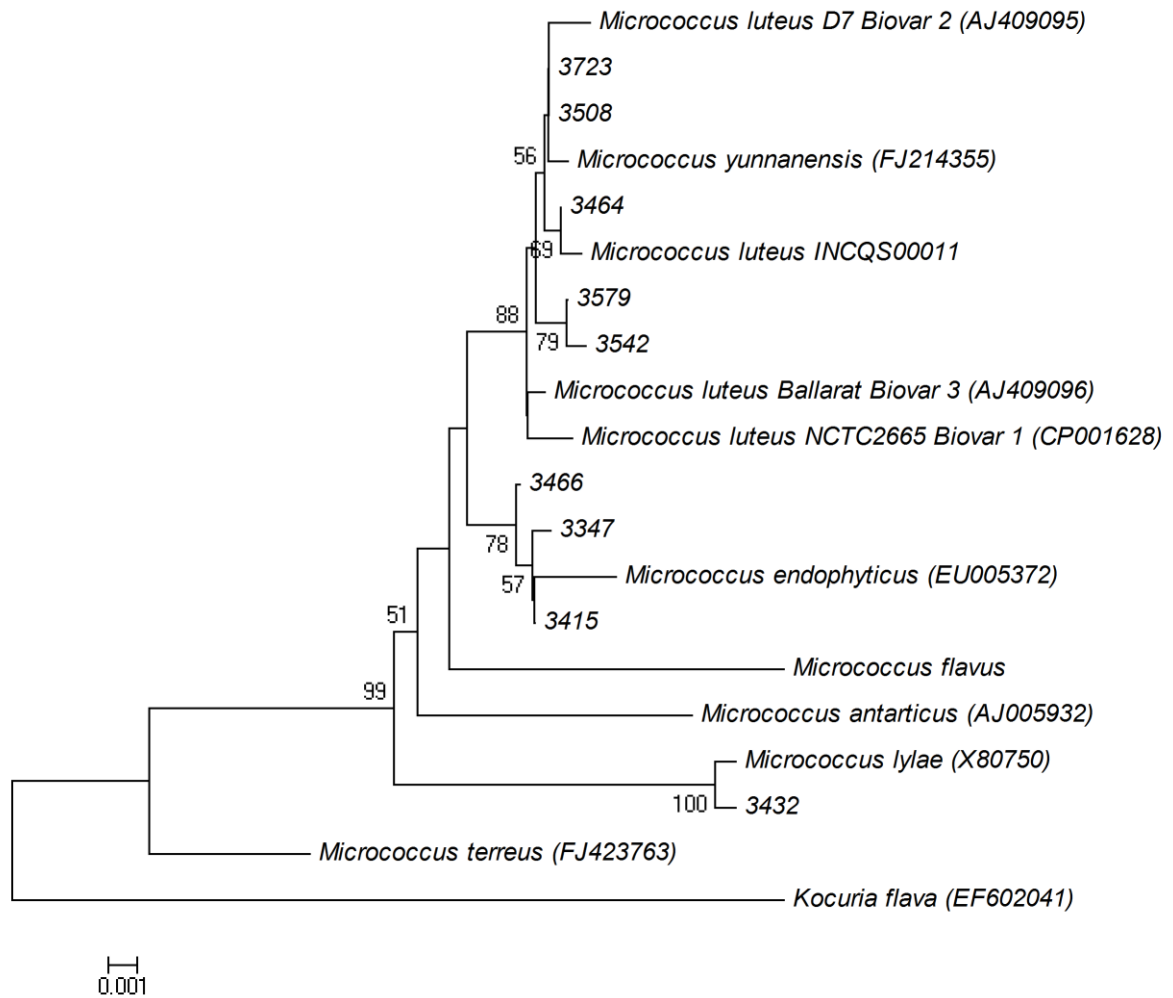
Figura 9 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA do gênero *Micrococcus* (1478 nucleotídeos) utilizando o método de Neighbor-Joining (*p-distance*). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,2% de divergência.



Segundo Wieser e colaboradores (2002), a espécie *M. luteus* é bastante heterogênea considerando suas características químicas e bioquímicas. Dessa forma, este estudo sugeriu dividir a espécie em três biovars. A cepa tipo da espécie *M. luteus* NCTC2665 representa o biovar 1, a cepa D7 (DSM 14234) representa o biovar 2 e a cepa Ballarat (DSM 14235) o biovar 3. Esses biovars podem ser diferenciados com base em características químicas e bioquímicas, uma vez que o 16S rRNA apresenta uma similaridade maior que 99%. As cepas D7 e Ballarat foram submetidas à DDH e apresentaram valores de similaridade de 77,4% e 82,5% com *M. luteus* NCTC2665, respectivamente. Logo, não representam uma espécie nova. Esses biovars apresentam na parede celular os aminoácidos lisina, ácido glutâmico, alanina e glicina, e o perfil de menaquinonas mostrou a presença de MK-8(H₂), MK-7(H₂) e MK-9(H₂). Essas características também são encontradas na espécie *M. yunnanensis*, com exceção da MK-9(H₂). Contudo, de acordo com Zhao e colaboradores (2009) os dados de DDH e as características fenotípicas confirmam que *M. yunnanensis* é uma espécie diferente de *M. luteus* e que pode ser diferenciada das outras espécies do gênero *Micrococcus*.

A análise filogenética baseada no gene 16S rRNA mostrou que as espécies *M. flavus*, *M. endophyticus*, *M. antarcticus*, *M. lylae* e *M. terreus* formam grupos bem distintos um dos outros (Figura 10). As espécies *M. cohnii* e *M. lactis* não foram incluídas na análise devido ao tamanho reduzido da sequência nucleotídica. Os biovars 1 (*M. luteus* NCTC2665) e 3 (*M. luteus* Ballarat) agruparam mais próximo um do outro, mas separadamente do biovar 2 (*M. luteus* D7). As estirpes 3415 e 3347 ficaram próximas de *M. endophyticus* e 3432 de *M. lylae*. O *M. yunnanensis* agrupou com o *M. luteus* biovar 2. Todas as estirpes identificadas como *M. yunnanensis*/*M. luteus* pelo gene 16S rRNA ficaram dentro do grupo biovar 2. O gene 16S rRNA não é bom marcador molecular para diferenciação de *M. luteus* e *M. yunnanensis*, para diferenciação das demais espécies do gênero o gene 16S rRNA pode ser empregado.

Figura 10 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA do gênero *Micrococcus* (1403 nucleotídeos) utilizando o método de Neighbor-Joining (*p-distance*). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,1% de divergência.



A análise filogenética baseado no gene *rpoB* demonstrou que as espécies *M. luteus* e *M. yunnanensis* são estreitamente relacionadas, mas *M. luteus* formou um grupo separado com a estirpe 3303 (Figura 11). Todas as estirpes, com exceção de 3303, agruparam próximo de *M. yunnanensis*. Embora apresente a mesma similaridade com as duas espécies (99,26%), a estirpe 3303 possui alguns polimorfismos na sequência nucleotídica que a torna mais próxima do *M. luteus*. As estirpes 3466, 3347 e 3415 ficaram alocadas próximas do *M. endophyticus* corroborando a filogenia baseada no gene 16S rRNA que também demonstrou esse relacionamento.

Figura 11 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *rpoB* do gênero *Micrococcus* (400 nucleotídeos) utilizando o método de Neighbor-Joining (*p-distance*). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,2% de divergência.

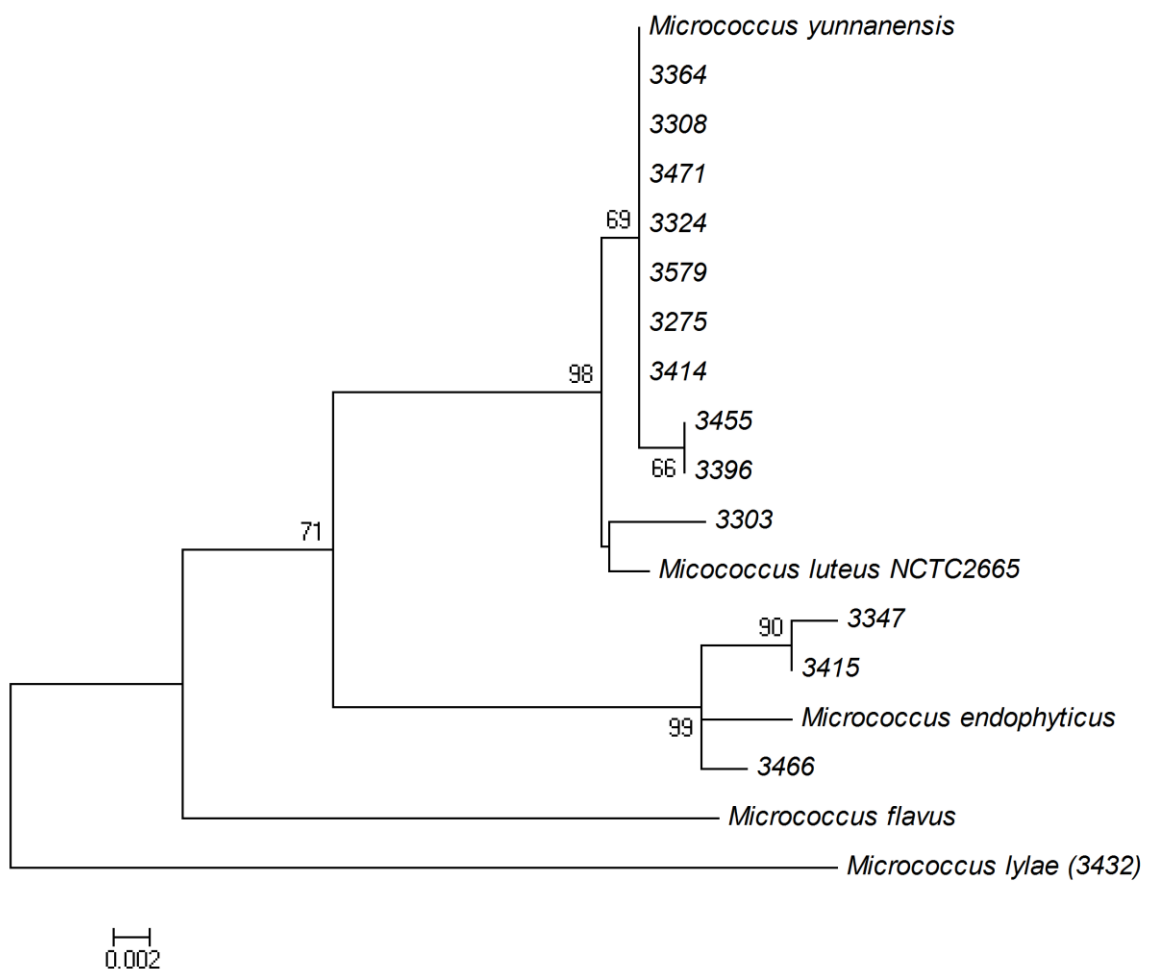


Tabela 7

Identificação genotípica pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *groEL* de algumas estirpes de *Micrococcus* sp empregadas no estudo

Estirpe	16S rRNA	Pb	<i>rpoB</i>	Pb	<i>recA</i>	Pb	<i>gyrB</i>	Pb	<i>groEL</i>	Pb	
<i>M. luteus</i> NCTC2665	99,71 <i>M. yunnanensis</i> JCM (1426 pb)	1632	99,50 <i>M. yunnanensis</i> JCM	3507	98,91 <i>M. yunnanensis</i> JCM*	1056	98,58 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	2163	99,03 <i>M.yunnanensis</i> 96,19 <i>M.</i> <i>endophyticus</i> JCM	1461	
	99,02 <i>M. endophyticus</i> JCM (1438 pb)		95,76 <i>M. endophyticus</i> JCM		94,46 <i>M. endophyticus</i> JCM*						
	98,26 <i>M. antarcticus</i> JCM (1497 pb)				93,94 <i>M. flavus</i> JCM*						
	98,03 <i>M. lylae</i> JCM (1472 pb)				90,47 <i>M. lylae</i> JCM*						
	98,00 <i>M. flavus</i> JCM (1407 pb)				88,06 <i>M. terreus</i> JCM*						
	97,95 <i>M. terreus</i> JCM (1514 pb)				87,27 <i>M. cohnii</i> JCM*						
	97,79 <i>M. cohnii</i> JCM (1407 pb)										
	96,21 <i>M. lactis</i> JCM (1429 pb)										
<i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM16547	99,92 <i>M. yunnanensis</i> JCM	1505	99,50 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	410	98,91 <i>M. luteus</i> NCTC2665	844	98,58 <i>M. luteus</i> NCTC2625	1061	99,03 <i>M. luteus</i> NCTC2665	421	
	99,66 <i>M. luteus</i> NCTC2665				94,81 <i>M. endophyticus</i> JCM*				97,01 <i>M.</i> <i>endophyticus</i> JCM		
	99,09 <i>M. endophyticus</i> JCM				94,16 <i>M. flavus</i> JCM*				94,33 <i>M. flavus</i> JCM		
					90,75 <i>M. lylae</i> JCM*						
					87,40 <i>M. terreus</i> JC*M						
					98,27 <i>M. cohnii</i> JCM*						
<i>M.</i> <i>endophyticus</i> JCM16951	99,72 <i>M endophyticus</i>	1503	95,81 <i>M. yunnanensis</i> JCM	406		815	91,67 <i>M. luteus</i> NCTC2625	973	97,01 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	369	
			95,76 <i>M. luteus</i> NCTC 2665				91,04 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM		96,19 <i>M. luteus</i> NCTC2665		

Tabela 7 (Cont.)

Identificação genotípica pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *groEL* de algumas estirpes de *Micrococcus* sp empregadas no estudo

Estirpe	16S rRNA	Pb	<i>rpoB</i>	Pb	<i>recA</i>	Pb	<i>gyrB</i>	Pb	<i>groEL</i>	Pb
<i>M. flavus</i> JCM14000	99,85 <i>M. flavus</i> JCM (1407pb)	1491	94,76 <i>M. yunnanensis</i> JCM	401		788	-		93,80 <i>M. luteus</i> NCTC2665	371
3275	99,85 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,59 <i>M. luteus</i> NCTC2665 99,32 <i>M. endophyticus</i> JCM	1490	100,0 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,50 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	407	99,87 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,03 <i>M. luteus</i> NCTC2665 94,84 <i>M. endophyticus</i> JCM	830	99,52 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,97 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	1068	99,76 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,79 <i>M. luteus</i> NCTC2665	420
3276	99,57 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,39 <i>M. luteus</i> NCTC2665 98,81 <i>M. endophyticus</i> JCM	1492	100,0 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,35 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	309	99,85 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,96 <i>M. luteus</i> NCTC2665 95,08 <i>M. endophyticus</i> JCM	674	99,81 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,75 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	1201	99,75 <i>M. luteus</i> NCTC2665 99,28 <i>M. yunnanensis</i> JCM	418
3303	99,78 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,65 <i>M. luteus</i> NCTC2665 99,28 <i>M. endophyticus</i> JCM	1429	99,26 <i>M. luteus</i> NCTC 2665/ <i>M. yunnanensis</i> JCM	410	-		98,37 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,37 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	984	99,63 <i>M. yunnanensis</i> JCM 97,88 <i>M. luteus</i> NCTC2665	284
3308	99,71 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,46 <i>M. luteus</i> NCTC2665 98,95 <i>M. endophyticus</i> JCM	1499	100,0 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,50 <i>M. luteus</i> NCTC2665	410	-		99,81 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,45 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	1103	-	

Tabela 7 (Cont.)

Identificação genotípica pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *groEL* de algumas estirpes de *Micrococcus sp* empregadas no estudo

Estirpe	16S rRNA	Pb	<i>rpoB</i>	Pb	<i>recA</i>	Pb	<i>gyrB</i>	Pb	<i>groEL</i>	Pb
3324	99,57 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,32 <i>M. luteus</i> NCTC2665 98,74 <i>M. endophyticus</i> JCM	1488	100,0 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,50 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	405	97,94 <i>M. endophyticus</i> JCM 94,0 <i>M. yunnanensis</i> JCM/ <i>M. luteus</i> NCTC2665	600	99,90 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM 98,52 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	1151	99,76 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM 98,79 <i>M. luteus</i> NCTC2665	422
3347	99,58 <i>M. endophyticus</i> JCM 99,43 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,33 <i>M. luteus</i> NCTC2665	1509	98,76 <i>M. endophyticus</i> JCM 95,57 <i>M. yunnanensis</i> JCM 95,54 <i>M. luteus</i> NCTC2665	407	-	-	-	-	-	
3359	99,71 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,60 <i>M. luteus</i> NCTC2665 99,02 <i>M. endophyticus</i> JCM	1501	99,71 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,15 <i>M. luteus</i> NCTC2665	354	98,65 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,41 <i>M. luteus</i> NCTC2665 93,96 <i>M. endophyticus</i> JCM	818	98,77 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM 98,37 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	1108	99,76 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM 99,02 <i>M. luteus</i> NCTC2665	417
3364	99,78 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,53 <i>M. luteus</i> NCTC2665 98,95 <i>M. endophyticus</i> JCM	1503	100,0 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,50 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	404	-	98,91 <i>M. luteus</i> NCTC 2665 98,39 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	1105	100,0 <i>M. luteus</i> NCTC2665 99,28 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	419	

Tabela 7 (Cont.)

Identificação genotípica pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *groEL* de algumas estirpes de *Micrococcus sp* empregadas no estudo

Estirpe	16S rRNA	Pb	<i>rpoB</i>	Pb	<i>recA</i>	Pb	<i>gyrB</i>	Pb	<i>groEL</i>	Pb
3396	99,50 <i>M. yunnanensis</i> JCM	1496	99,75 <i>M. yunnanensis</i> JCM	407	-		99,81 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	1103	100,0 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	417
	99,39 <i>M. luteus</i> NCTC2665		99,25 <i>M. luteus</i> NCTC 2665				98,73 <i>M. luteus</i> NCTC 2665		99,03 <i>M. luteus</i> NCTC2665	
	98,81 <i>M. endophyticus</i> JCM									
3414	99,78 <i>M. yunnanensis</i> JCM	1500	100,0 <i>M. yunnanensis</i> JCM	404	99,75 <i>M. yunnanensis</i> JCM	820	99,62 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	1102	99,68 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	319
	99,60 <i>M. luteus</i> NCTC2665		99,50 <i>M. luteus</i> NCTC 2665		99,02 <i>M. luteus</i> NCTC2665		98,77 <i>M. luteus</i> NCTC 2665		98,42 <i>M. luteus</i> NCTC2665	
	99,02 <i>M. endophyticus</i> JCM				94,84 <i>M. endophyticus</i> JCM					
3415	99,65 <i>M. endophyticus</i> JCM	1496	98,75 <i>M. endophyticus</i> JCM	404	98,36 <i>M. endophyticus</i> JCM	815	98,37 <i>M.</i> <i>endophyticus</i> JCM	1064	99,72 <i>M.</i> <i>endophyticus</i> JCM	410
	99,50 <i>M. yunnanensis</i> JCM		95,54 <i>M. yunnanensis</i> JCM		93,86% <i>M. yunnanensis</i> JCM		93,11 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM		97,55 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	
	99,39 <i>M. luteus</i> NCTC2665		95,51 <i>M. luteus</i> NCTC2665		93,61% <i>M. luteus</i> NCTC2665		92,95 <i>M. luteus</i> NCTC 2665		96,57 <i>M. luteus</i> NCTC2665	
3432	99,86 <i>M. lylae</i> JCM	1494	91,79 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	404	99,13 <i>M. lylae</i> JCM	813	86,94 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	1146		
	97,44 <i>M. cohnii</i> DSM				92,36% <i>M. flavus</i> JCM					
	96,86 <i>M. flavus</i> JCM				89,44 <i>M. cohnii</i> DSM					
3455	99,85 <i>M. yunnanensis</i> JCM	1494	99,75 <i>M. yunnanensis</i> JCM	401	99,87 <i>M. yunnanensis</i> JCM	829	99,90 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	1061	99,76 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	421
	99,73 <i>M. luteus</i> NCTC 2665		99,25 <i>M. luteus</i> NCTC 2665		99,03 <i>M. luteus</i> NCTC2665		98,49 <i>M. luteus</i> NCTC 2665		98,79 <i>M. luteus</i> NCTC2665	
	99,16 <i>M. endophyticus</i> JCM				94,84 <i>M. endophyticus</i> JCM					

Tabela 7 (Cont.)

Identificação genotípica pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *groEL* de algumas estirpes de *Micrococcus sp* empregadas no estudo

Estirpe	16S rRNA	Pb	<i>rpoB</i>	Pb	<i>recA</i>	Pb	<i>gyrB</i>	Pb	<i>groEL</i>	Pb
<i>M. luteus</i> INCQS00009	99,50 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,33 <i>M. luteus</i> NCTC 2665 98,74 <i>M. endophyticus</i> JCM	1503	-		99,97 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,03 <i>M. luteus</i> NCTC2665 94,84 <i>M. endophyticus</i> JCM	830	-		99,76 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,79 <i>M. luteus</i> NCTC2665	421
<i>M. luteus</i> INCQS00011	99,59 <i>M. luteus</i> NCTC2665 99,29 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,75 <i>M. endophyticus</i> JCM	1491	-		99,87 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,14 <i>M. luteus</i> NCTC2665 94,84 <i>M. endophyticus</i> JCM	816	99,33 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,48 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	1059	-	
<i>M. luteus</i> INCQS00012	99,78 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,53 <i>M. luteus</i> NCTC 2665 98,95 <i>M. endophyticus</i> JCM	1492	-		99,87 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,14 <i>M. luteus</i> NCTC2665 94,84 <i>M. endophyticus</i> JCM	820	100,0 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,27 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	415	-	
<i>M. luteus</i> INCQS00112	99,78 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,53 <i>M. luteus</i> NCTC 2665 98,95 <i>M. endophyticus</i> JCM	1490	-		99,87 <i>M. yunnanensis</i> JCM 99,14 <i>M. luteus</i> NCTC2665 94,84 <i>M. endophyticus</i> JCM	820	99,34 <i>M. yunnanensis</i> JCM 98,49 <i>M. luteus</i> NCTC 2665	1061	-	

Tabela 7 (Cont.)

Identificação genotípica pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *groEL* de algumas estirpes de *Micrococcus sp* empregadas no estudo

Estirpe	16S rRNA	Pb	<i>rpoB</i>	Pb	<i>recA</i>	Pb	<i>gyrB</i>	Pb	<i>groEL</i>	Pb
<i>M. luteus</i> INCQS00256	99,44 <i>M. yunnanensis</i> JCM	1514	-		99,63% <i>M. yunnanensis</i> JCM	817	99,59 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	983	100,0 <i>M.</i> <i>yunnanensis</i> JCM	
	99,00 <i>M. luteus</i> NCTC 2665				99,14% <i>M. luteus</i> NCTC2665		98,88 <i>M. luteus</i> NCTC 2665		99,03 <i>M. luteus</i> NCTC2665	
	98,61 <i>M. endophyticus</i> JCM				94,96% <i>M.</i> <i>endophyticus</i> JCM					

*Rieser et al., 2012

O gene *gyrB* foi amplificado e sequenciado com o objetivo de diferenciar as espécies *M. luteus* e *M. yunnanensis*. O valor de similaridade observado entre essas espécies foi de 98,58% (Tabela 7). A maioria das estirpes apresentaram valores maiores de similaridade com *M. yunnanensis*, contudo não é possível fazer essa diferenciação com base em valores muito próximos. Além disso, não é conhecido o quanto o gene *gyrB* diverge entre as espécies do gênero *Micrococcus*. Os resultados demonstram que é possível realizar a diferenciação entre as espécies de *Micrococcus* pelo sequenciamento do gene *rpoB* ou *gyrB* e até mesmo o 16S rRNA, com exceção de *M. luteus* e *M. yunnanensis*.

As sequências nucleotídicas foram então traduzidas, os valores obtidos foram também muito próximos. A similaridade entre as sequências de aminoácidos de *M. yunnanensis* e *M. luteus* foi de 98,58%. Para as estirpes os valores variavam entre 99-98% com *M. luteus* e *M. yunnanensis*.

A estirpe 3415 identificada como *M. endophyticus* apresentou uma similaridade de 98,37% com a sequência da cepa tipo. Logo, dentro da espécie *M. endophyticus* é possível observar uma variação dentro do gene.

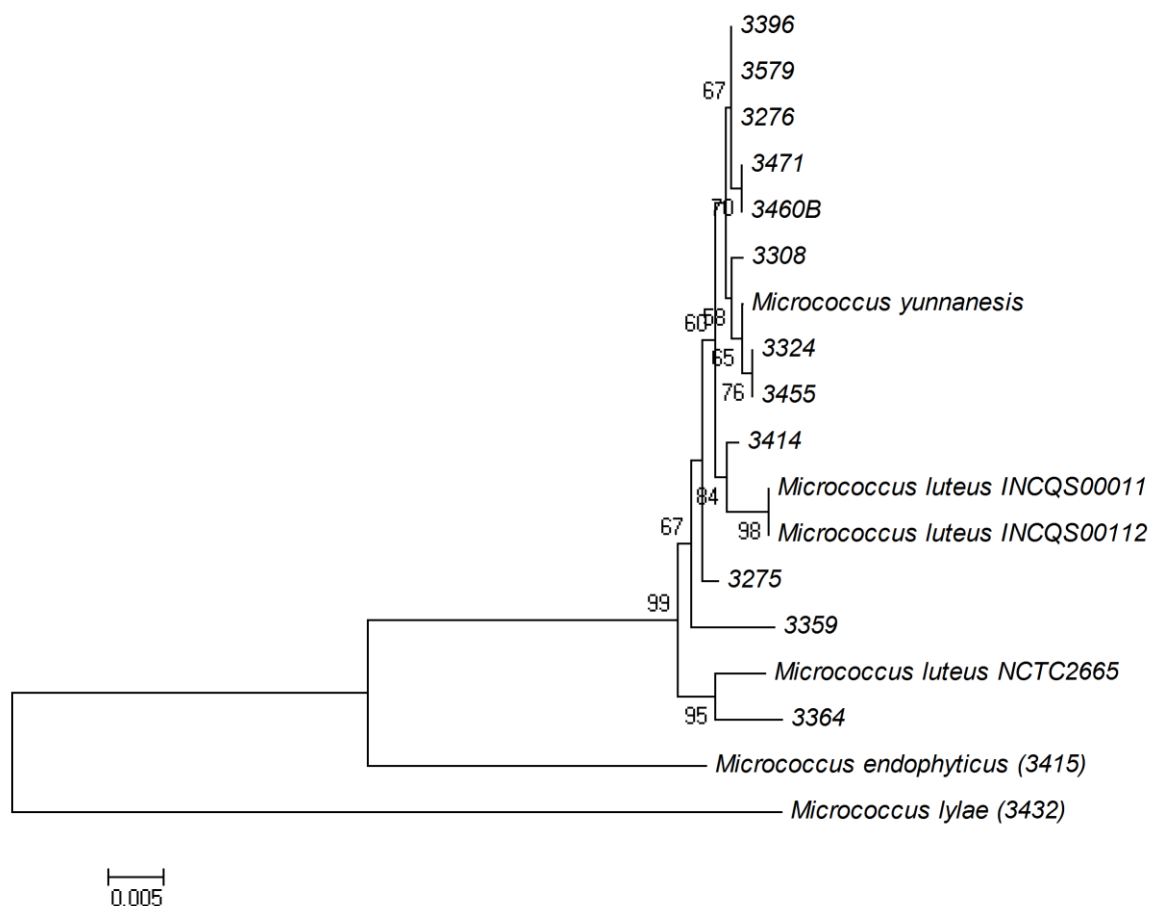
A análise filogenética baseado na sequência nucleotídica do gene *gyrB* também mostrou que as espécies *M. luteus* e *M. yunnanensis* são próximas, mas que existe a formação de dois grupos distintos (Figura 12). A maioria das estirpes agruparam com *M. yunnanensis*, apenas a estirpe 3364 ficou mais próxima de *M. luteus*. As estirpes 3275 e 3359 ficaram mais distantes do grupo *M. yunnanensis*. Apesar de possuir maior similaridade com *M. yunnanensis*, essas não são tão similares quanto as demais estirpes e por este motivo ficaram agrupadas dessa maneira.

Comparando a filogenia baseada no gene *gyrB* com o *rpoB* observa-se que as estirpes 3471, 3579, 3308, 3324, 3455, 3414 e 3275 ficaram ambas próximas de *M. yunnanensis*. A estirpe 3364 ficou mais próxima de *M. yunnanensis* na análise filogenética baseada no gene *rpoB*, mas na análise utilizando o gene *gyrB* essa ficou mais próxima de *M. luteus*. Os gene *gyrB* e *rpoB* são cópia única no genoma, antes de considerar qualquer evento genético é preciso levar em conta o tamanho do fragmento analisado. O gene *rpoB* possui mais de 3000 pb e a análise foi realizada com apenas 400 pb. Talvez com um tamanho maior sequenciado a topologia da árvore possa ser alterada.

As cepas de referência *M. luteus* INCQS00011 e INCQS00112 tanto na

filogenia baseada no gene 16S rRNA quanto no gene *gyrB* ficaram agrupadas próximo a espécie *M. yunnanensis*. Ambas são cepas ATCC identificadas como *M. luteus*. Considerando que *M. luteus* e *M. yunnanensis* são espécies diferentes, as coleções de cultura devem reavaliar suas cepas de *M. luteus*. Uma vez que, a espécie *M. yunnanensis* foi descrita recentemente e não é possível fazer a diferenciação pela similaridade do gene 16S rRNA.

Figura 12 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *gyrB* do gênero *Micrococcus* (1046 nucleotídeos) utilizando o método de Neighbor-Joining (p-distance). Valores de Bootstrap com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,5% de divergência.

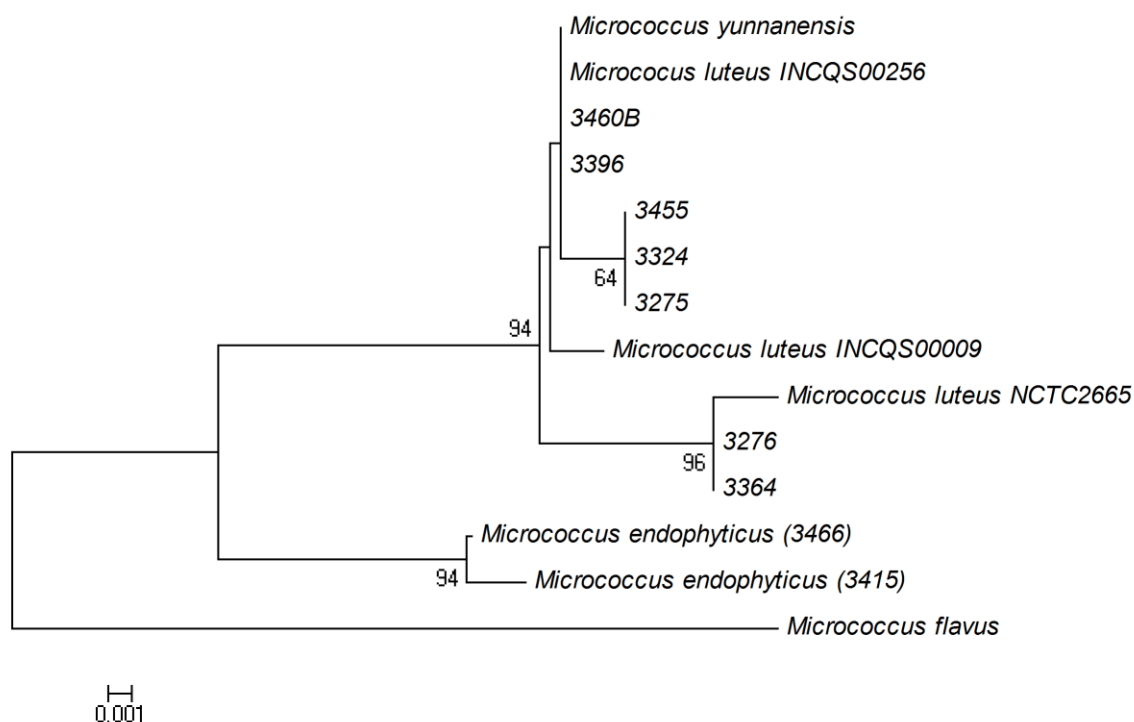


O gene *groEL* foi também avaliado com o mesmo objetivo do gene *gyrB*. Apesar de apresentar duas cópias no genoma de *M. luteus* com tamanhos e similaridades diferentes, apenas o gene *groEL* (locus 04090 – 1641pb) foi amplificado e sequenciado. Os iniciadores utilizados amplificaram um fragmento de 400 pb em média e estes apresentavam complementariedade com a região inicial do gene *groEL* (Locus 04090), os iniciadores não apresentaram complementariedade com a outra cópia do gene (locus 16540).

O sequenciamento do gene *groEL* não evidenciou nenhuma diferença significativa nos valores de similaridade entre *M. luteus* e *M. yunnanensis* (Tabela 7). As sequências nucleotídicas também foram traduzidas, as espécies apresentaram valores de similaridade superiores a 99% na sequência de aminoácidos. Contudo, para as demais espécies do gênero o gene *groEL* parece ser adequado para diferenciação.

Algumas espécies se mostraram mais relacionadas com *M. yunnanensis* e outras (Figura 13). Das estirpes incluídas na análise, somente a 3276 e 3364 agruparam com *M. luteus*. Segundo a filogenia baseada no gene *gyrB*, a estirpe 3276 é mais próxima de *M. yunnanensis* do que *M. luteus*. As duas cepas de referência *M. luteus* INCQS00009 e INCQS00256 agruparam próximo a *M. yunnanensis*. Contudo, o tamanho do fragmento considerado para construção da árvore filogenética é pequeno (368 pb), talvez com um fragmento maior algumas relações possam ser modificadas na árvore. Assim, não seria correto fazer afirmações baseado nesta filogenia, somente é possível descrever que as espécies *M. luteus* e *M. yunnanensis* são estreitamente relacionadas.

Figura 13 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *groEL* do gênero *Micrococcus* (368 nucleotídeos) utilizando o método de Neighbor-Joining (*p-distance*). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,1% de divergência.



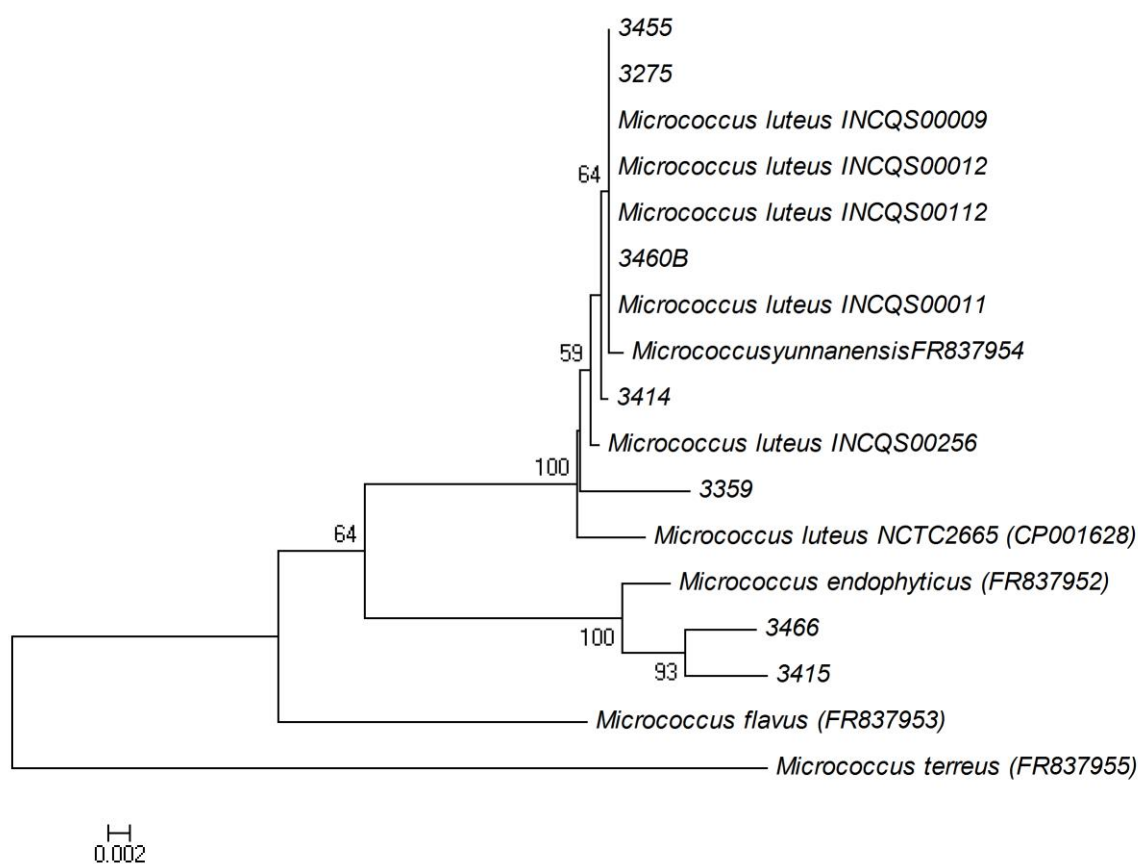
O sequenciamento do *recA* foi empregado afim de separar as espécies *M. luteus* e *M. yunnanensis* e caracterizar as estirpes bacterianas do estudo. Porém, não foi possível realizar a diferenciação com base nos valores de similaridade do gene *recA*. Essas espécies compartilham uma similaridade igual a 98,9%, e as estirpes apresentaram uma similaridade maior que 99% com ambas as espécies (Tabela 7). *M. yunnanensis* e *M. luteus* compartilham uma similaridade acima de 99% na sequência de aminoácidos da proteína *recA*. Assim, não foi possível diferenciar essas espécies através do sequenciamento de cinco genes conservados (16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *groEL* e *recA*).

A análise filogenética baseada nas sequências do gene *recA* mostrou que *M. luteus* e *M. yunnanensis* são muito próximas e que tanto as estirpes do estudo quanto as cepas de referência de *M. luteus* INCQS ficaram mais próximas do *M. yunnanensis* (Figura 14). Todas as filogenias foram contruídas utilizando o método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), o objetivo era avaliar o relacionamento

entre as espécies através da similaridade entre as sequências nucleotídicas. O modelo selecionado foi o *p-distance*, pois a distância entre as sequências foi menor que 0,1 ($p < 0,1$). Por esta razão, nenhum modelo de correção foi empregado.

Os resultados genotípicos demonstram que todos os genes empregados nas análises foram eficientes para identificação de todas as espécies do gênero *Micrococcus* (*M. lylae*, *M. lactis*, *M. cohnii*, *M. terreus*, *M. flavus* e *M. endophyticus*), menos *M. luteus* e *M. yunnanensis*. A espécie *M. antarcticus* foi desconsiderada, a sequência do gene 16S rRNA da cepa tipo de *M. antarcticus* depositada na *Japan Collection of Microorganisms* (JCM) não está de acordo com a sequência depositada no NCBI (informação pessoal).

Figura 14 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *recA* do gênero *Micrococcus* (773 nucleotídeos) utilizando o método de Neighbor-Joining (*p-distance*). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,2% de divergência.



Algumas questões nos levam a questionar se *M. yunnanensis* representa uma espécie diferente de *M. luteus*. A análise filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA demonstrou que a espécie *M. yunnanensis* está relacionada com o biovar 2 de *M. luteus* (Figura 10). Seria interessante sequenciar alguns genes conservados das cepas sugeridas como representante do biovar 2 e 3 para verificar se as análises filogenéticas baseadas nesses outros genes corroborariam os resultados obtidos na filogenia baseada nas sequências do gene 16S rRNA. Além disso, avaliar se os dados moleculares corroboram as diferenças (química e bioquímica) encontradas pelos autores. Os resultados apresentados por Wieser e colaboradores (2002) indicaram que essas cepas pertencem à espécie *M. luteus*, mas apresentam características muito diferentes das encontradas na cepa tipo de *M. luteus* (NCTC2665 ou DSM20030). Este trabalho avaliou nove cepas bacterianas, sendo oito caracterizadas como biovar 2 e uma como biovar 3. O perfil bioquímico das cepas caracterizadas como biovar 2 apresentou inúmeras provas variáveis. Além disso, o perfil da cepa Ballarat (biovar 3) foi baseado em apenas uma cepa. Dessa maneira, somente as provas bioquímicas não podem ser consideradas adequadas para caracterizar esses biovars.

Contudo, também foi utilizada na caracterização dos biovars a espectrometria de infravermelho (FT-IR). Este método é aplicado para espécies relacionadas que apresentam características bioquímicas muito similares. Este método está descrito como uma das metodologias indicadas para descrever uma nova espécie ou gênero da sub-ordem Micrococccinae (SHUMANN et al., 2009). Segundo esta metodologia, os biovars representam grupos bem distintos.

Segundo Zhao e colaboradores (2009), *M. yunnanensis* apresenta um valor de 65.4% DDH com *M. luteus* NCTC 2665 pelo método fluorométrico de microdiluição em placa (*Fluorometric hybridization in microdilution wells*). Porém, por esta metodologia não é possível calcular o ΔT_m e o valor de DDH é muito próximo a 70%. De acordo com Vandamme e colaboradores (1996) para algumas espécies é necessário “relaxar” o valor de 70% DDH. Por serem cepas estreitamente relacionadas seria necessário determinar o ΔT_m para confirmar se *M. yunnanensis* é ou não uma espécie diferente de *M. luteus*. Segundo Wayne e colaboradores (1987), para definição de uma nova espécie bacteriana é necessário determinar o valor de similaridade do DDH e o ΔT_m .

Alguns testes bioquímicos foram realizados com a finalidade de diferenciar *M.*

luteus e *M. yunnanensis*, pois segundo Zhao e colaboradores (2009), a espécie *M. yunnanensis* pode ser claramente distinguida das outras espécies de *Micrococcus* baseados nas características fenotípicas. Desta forma, submetemos a cepa *M. yunnanensis*^T e as estirpes de *Micrococcus* sp selecionadas ao API 50CH e crescimento a 45°C, os resultados foram comparados ao trabalho de descrição da espécie *M. yunnanensis* (ZHAO et al., 2009) (Tabela 8).

O crescimento a 45°C não é uma prova definitiva para diferenciação do *M. yunnanensis* e *M. luteus*, o teste foi repetido 3 vezes e apenas 1 vez foi observado um pequeno crescimento da cepa *M. yunnanensis*^T. O teste API 50CH para as cepas tipo foi realizado em diversas condições a fim de avaliar se a temperatura de incubação ou meio de cultura utilizado poderiam influenciar nos resultados. Os testes foram incubados a 30 e 37°C e realizados a partir da cultura bacteriana em TSA e ágar sangue. Comparando apenas os perfis bioquímicos realizados a partir da cultura em TSA, observou-se que as galerias incubadas a 37°C apresentaram maior número de provas positivas. O teste em TSA foi realizado duas vezes e o número de provas bioquímicas positivas variou entre os dois testes. Com relação ao teste realizado a partir da cultura em ágar sangue, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os perfis bioquímicos deste teste com o realizado a partir da cultura em TSA.

O princípio do API50 CH é o estudo da fermentação dos substratos. Nos trabalhos de descrição das espécies *M. yunnanensis* (ZHAO et al., 2009) e *M. endophyticus* (CHEN et al., 2009). O API 50CH foi utilizado para avaliação do perfil bioquímico dessas espécies e segundo os autores o teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Então, entende-se que o princípio do método foi seguido, ou seja, o teste foi realizado em anaerobiose. Os perfis bioquímicos são referentes aos resultados do teste API 50CH realizado a partir da cultura bacteriana em TSA e incubação a 37°C por 7 dias (Tabela 8).

Algumas provas bioquímicas não tiveram o mesmo resultado do citado no artigo de descrição da espécie. A espécie de *M. yunnanensis* (ZHAO et al., 2009) foi descrita com apenas uma cepa e embora a cepa neótipo de *M. luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872 tenha sido estabelecida com mais de 30 cepas, a caracterização fenotípica não avaliou a fermentação de diversos hidratos de carbono. O gênero *Micrococcus* ainda é pouco estudado, havendo a necessidade de realizar a caracterização fenotípica com um número maior de estirpes bacterianas, uma vez

que muitas espécies foram descritas com uma única cepa.

Assim, não é possível diferenciar bioquimicamente as espécies do gênero *Micrococcus* como havia mencionado Zhao e colaboradores (2009), pois diversas provas bioquímicas foram variáveis. As estirpes 3415 e 3466 identificadas como *M. endophyticus* não apresentaram o mesmo perfil bioquímico que a cepa *M. endophyticus*^T. Dessa forma, não foi observada nenhuma prova bioquímica que pudesse ser utilizada para diferenciar as espécies *M. luteus*, *M. yunnanensis* e *M. endophyticus*.

Dentre as espécies de *Micrococcus*, a maioria destas foi descrita com uma única estirpe, o que dificulta a identificação fenotípica. O grupo dos cocos Gram positivos relacionados ao gênero *Micrococcus* ainda é pouco estudado. Seria necessário utilizar um número maior de estirpes bacterianas para caracterização fenotípica. A estirpe 3275 foi positiva para fermentação da glicose pelo API 50CH e negativa no O/F Glicose. O gênero *Micrococcus* é caracterizado por não ser fermentador da glicose, este resultado pode ser justificado pela utilização do corante na cúpula da galeria API produzindo assim um resultado falso positivo.

Em conclusão, não foi possível definir se *M. yunnanensis* é uma espécie diferente de *M. luteus* ou são apenas muito próximas com as análises baseadas no sequenciamento dos genes conservados (16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *groEL* e *recA*) e em testes bioquímicos e fisiológicos. Se forem realmente espécies diferentes a maioria das estirpes pertencem a essa espécie, e as cepas de referência *M. luteus* INCQS que são cepas ATCC analisadas nesse estudo estão identificadas incorretamente. Assim, as coleções de cultura bacteriana deverão caracterizar novamente todas as cepas identificadas previamente como *M. luteus*. Outra questão a ser considerada, será a transferência horizontal de genes ou recombinação para justificar porque segundo a filogenia do *gyrB* a estirpe 3364 agrupa mais próximo de *M. luteus* e por outros genes com *M. yunnanensis*.

Este estudo demonstrou a necessidade da aplicação de metodologias moleculares na identificação de cocos Gram positivos não fermentadores da glicose provenientes de produtos farmacêuticos estéreis e ambiente controlado. Além disso, as técnicas bioquímicas não são adequadas para identificação ao nível de espécie bacteriana como sugerido pelas Farmacopeias. Embora muitas vezes não seja possível determinar a espécie bacteriana baseado apenas na análise de um gene conservado como o 16S rRNA, este irá fornecer a identificação correta do gênero

bacteriano. Outros genes conservados também são utilizados para auxiliar da identificação ao nível de espécie.

Tabela 8

Caracterização fenotípica pelo API 50CH das estirpes de *Micrococcus* sp

Característica	1*	2*	3*	1	3275	3359	3364	3414	3415	3455	3466
Fermentação de:											
1. Glicerol	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Eritritol	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
3. D-Arabinose	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4. L-Arabinose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. D-Ribose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6. D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7. L-Xilose	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
8. D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9. Metil- β D-	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilopiranosido											
10. D-Galactose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
11. D-Glicose	NI	NI	NI	+	+	-	-	-	-	-	-
12. D-Frutose	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13. D-Manose	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
14. L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15. L- Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16. Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17. Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18. D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19. D-Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20. Metil α -D-	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
Manopiranosído											
21. Metil α -D-	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucopiranosído											
22. N-Acetil	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosamina											

Tabela 8 (Cont.)Caracterização fenotípica pelo API 50CH das estirpes de *Micrococcus* sp

Característica	1*	2*	3*	1	3275	3359	3364	3414	3415	3455	3466
23. Amigdalina	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
24. Arbutina	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25. Esculina	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26. D-Maltose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27. D-Celobiose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28. D-Maltose	NI	NI	NI	+	+	-	+	-	-	+	+
29. D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30. D-Melibiose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31. D-Sacarose	NI	NI	NI	+	+	-	+	-	-	+	-
32. D-Trealose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
33. Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34. D-Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35. D-Rafinose	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
36. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37. Glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38. Xilitol	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
39. Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40. D-Turanose	NI	NI	NI	+	+	-	-	-	-	+	-
41. D-Lixose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42. D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43. D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44. L-Fucose	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
45. D-Arabitól	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
46. L-Arabitól	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
47. Gluconato de Potássio	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
48. 2- CetoGluconato de potássio	NI	NI	NI	-	-	-	-	-	-	-	-
49. 5- CetoGluconato de potássio	NI	NI	NI	-	-	+	-	+	-	-	+

1: *M. yunnanensis*^T, 2: *M. endophyticus*^T, 3: *M. luteus*^T.*Dados retirados de Zhao *et al.* (2009).

NI: Não informado

5 CONCLUSÃO

- O Sistema VITEK identificou incorretamente todas as estirpes quanto ao gênero e espécie e portanto não deve ser utilizado na identificação de cocos Gram positivos não fermentadores da glicose.
- O Sistema API STAPH e VITEK 2 identificaram corretamente o gênero bacteriano de 69 e 68% dos cocos Gram positivos não fermentadores da glicose, respectivamente.
- Todos os sistemas de identificação apresentaram limitações.
- O sequenciamento do gene 16S rRNA foi eficiente na determinação do gênero bacteriano para todas as estirpes.
- Os gêneros *Micrococcus*, *Kocuria*, *Dietzia*, *Demetria*, *Janibacter*, *Macrococcus*, *Arthrobacter* e *Brachybacterium* identificados neste estudo demonstram a diversidade microbiana de cocos Gram positivos não fermentadores da glicose encontrada em ambientes controlados.
- Foi possível realizar a identificação ao nível de espécie pelo gene 16S rRNA para *Micrococcus lylae*, *Kocuria marina*, *Kocuria palustris* e *Dietzia cinnemena*.
- Cinco estirpes identificadas neste estudo como *Arthrobacter sp.*, *Brachybacterium sp.*, *Demetria sp.*, e *Janibacter sp.* representam uma possível espécie nova pela análise do gene 16S rRNA .
- Todas as espécies de *Micrococcus* podem ser diferenciadas pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *groEL* e *recA*, com exceção *M. yunnanensis* e *M. luteus*.

REFERÊNCIAS

ABBY, S. & DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends in Microbiology**. v. 15, n. 3, p. 135-141, 2007.

ADANG, R. P. et al. Pneumonia due to *Micrococcus* spp. in a patient with acute myeloid leukaemia. **Leukemia**. v. 6, n.3, p. 224-226, 1992.

ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. **Trends in Microbiology**. v. 17, n. 1, p. 37-45, 2008.

ADISSI, K. H. Isoladores na Indústria Farmacêutica. **Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**. Ed. 9, p.4-6, 2002.

ANVISA. **Vigilância Sanitária no Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em 17 de fevereiro de 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 14644-4**: Salas limpas e ambientes controlados associados - Parte 4 Projeto, construção e partida. 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 14644-7**. Salas limpas e ambientes controlados associados - Parte 7 Dispositivos de separação (compartimentos de ar limpo, gloveboxes, estirperes, miniambientes). 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 14644-1**: Salas limpas e ambientes controlados associados - Parte 1 Classificação da limpeza do ar. 2005.

BACOT, C. M. & REEVES, R. H. Novel tRNA gene organization in the 16S-23S intergenic spacer of the *Streptococcus pneumoniae* rRNA gene cluster. **Journal of Bacteriology**. v. 173, n. 13, p. 4234-4236, 1991.

BAIO, P. V.P. **Identificação Bioquímica e Caracterização Molecular de Bactérias Corineformes e Nocardiformes de origem ambiental**. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2007.

BANNERMAN, T. L. & PEACOCK, S. J. **Staphylococcus, Micrococcus and Other Catalase-Positive Cocci**. In: MURRAY P. et al. Manual de Microbiologia Clínica. 10 Ed. Vol. 1. USA: ASM Press, 2011.

BEMER-MELCHIOR, P. et al. Bacteremia due to *Dietzia maris* in an immunocompromised patient. **Clinical Infectious Diseases**. v. 29, n. 5, p. 1338-1340, 1999.

BEN-AMI, R. et al. Erroneous reporting of coagulase-negative Staphylococci as *Kocuria* spp. by the Vitek 2 system. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n.3, p. 1448-50, 2005.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 8 Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA. New York: Springer, 1974.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. **Gram-positive Bacteria other than Actinomycetes**. 1 Ed. Vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA. New York: Springer Verlag, 1986.

BioMerieux API®. Disponível em < http://www.biomerieux-usa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPageopen=USA_PRD_LST&doc=USA_PRD_LST_G_PRD_USA_5&crptprm=ZmlsdGVyPQ== > Acesso em 10 de janeiro de 2013.

Biomerieux VITEK®. Disponível em < <http://www.biomerieux.com.br/> HYPERLINK "http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPagedoc=BRZ_CLN_PRD_G_PRD_CLN_8"servlet/srt/bio/brazil/dynPagedoc=BRZ_CLN_PRD_G_PRD_CLN_8HYPERLINK "<http://www.biomerieux.com.br/>" > Acesso em 10 de janeiro de 2013. BIOMERIEUX. **Manual VITEK 2: Informação dos produtos dos sistemas VITEK® 2 Systems**, 2013.

BIZZINI, A. et al. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 5, p. 1549-1554, 2010.

BLENNOW, O. et al. Pneumonia and Bacteremia Due to *Kytococcus schroeteri*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 2, p. 522–524, 2012.

BOSSHARD, P. P. et al. 16S rRNA Gene Sequencing versus the API 20 NE System

and the VITEK 2 ID-GNB Card for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 1359–1366, 2006.

BOSSHARD, P. P. et al. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 5, p. 2065–2073, 2004.

BOUDEWIJNS, M. & VANDEVEN, J. Vitek 2 Automated Identification System and *Kocuria kristinae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 11, p. 5832, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 49 de 23 de novembro de 2010. Dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, constituída de Volume 1 - Métodos Gerais e textos e Volume 2 - Monografias. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 11 de novembro de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº37 de 6 de julho de 2009. Dispõe sobre a admissibilidade de códigos farmacêuticos estrangeiros como referência no controle de qualidade de insumos e produtos farmacêuticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 08 de julho de 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 19 de abril de 2010. Seção 1, p.97.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RDC nº 17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 19 de abril de 2010. Seção 1, p. 94.

BRASIL. Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e da outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, DF, 21 de dezembro de 1973.

BRASIL. Lei Nº 6.360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e da outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 24 de setembro de 1976.

BRASIL. Lei N° 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o sistema nacional de vigilância sanitária, cria a agência nacional de vigilância sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 27 de janeiro de 1999.

BRASIL. Lei N°8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 20 de setembro de 1990.

BREWSTER, J. & COWIE, B. Qualitative aspects of microbial DNA duplexes. **Carnegie Institution of Washington**. 1967.

BUCK, J. D. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 992-993, 1982.

BUGNO, A. **Esterilidade: Validação de Metodologia e propostas de Otimização de Resultados**. Dissertação de Mestrado. 171 folhas. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001

CASE, R. J. et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 1, p. 278-288, 2007.

CATANBO, M.; DEGRAVE, W.; MIRANDA, A. B. Análise Comparativa de genomas procarióticos. **Biociência**. N. 37, p. 20-29, 2007.

CHATZIGEORGIOU, K. S. et al. Identification of staphylococci by Phoenix: validation of a new protocol and comparison with Vitek 2. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 68, n.4, p.375-81, 2010.

CHEN, H. H. et al. *Micrococcus endophyticus* sp. nov., isolated from surface-sterilized *Aquilaria sinensis* roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, n.5, p.1070-1075, 2009.

CHUN, J.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n.5, p. 2202-2208, 1999.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004.

COHN, F. Untersuchungen uber Bakterien. **Beitr. Biol. Pflanz.** v. 1, p. 127-244, 1872.

COLLA, L. M. & COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor Revista de Ciências exatas e engenharia**. v. 13, p. 85-103, 2003.

COLLINS, M. D.; BROWN, J.; JONE, D. *Brachybacterium faecium* gen. nov a Coryneform Bacterium from Poultry Deep Litter. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 38, n. 1, p. 45-48, 1988.

COLWELL R. R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**. v. 104, n. 1, p.410-433, 1970.

CONGEEVARAMA, S. et al. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. **Journal of Hazardous Materials**. v. 146, n. 1-2 , p. 270–277, 2007.

CORD-RUWISCH, R.; KLEINITZ, W.; WIDDEL, F. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. **Journal of Petroleum Technology**. v. 1, p. 97– 106, 1987.

CRESPIM, E. **Detecção e quantificação de bacterias degradadoras de hidrocarbonetos em estirpes de petroleo utilizando primers grupo-especificos**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, São Paulo, 2008.

CROWLEY, E. et al. Evaluation of the VITEK 2 Gram Positive (GP) Microbial Identification Test Card: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**. v.95, n.5, p. 1425-1432, 2012.

CUNDELL, A. M. Microbial Identification Strategies in the Pharmaceutical Industry. **Technology Application**. v. 60, n. 2, p.111-123, 2006.
de Resultados. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2001.

DELMAS, J. et al. Evaluation of the Vitek 2 System with a Variety of *Staphylococcus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 1, p. 311–313, 2008.

DRANCOURT, M.; BERGER, P.; RAOULT, D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 5, p. 2197-2202, 2004.

DRANCOURT, M & RAOULT, D. *rpoB* gene Sequence-Based identification of *Staphylococcus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n.4, p. 1333-1338, 2002.

EDUARDO, M. B. D. & MIRANDA, I. C. S. **Vigilância Sanitária**. São Paulo, Editora Fundação Peirópolis, 1998. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_cidadania_volume08.pdf > Acesso em 05 de novembro de 2012.

EIGNER, U. et al. Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and Phoenix systems. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 8, p. 3829-3834, 2005.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 7 ed. Strasbourg: Council Of Europe, 2007.

EUZÉBY, J. P., List of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN). Disponível em < <http://www.bacterio.cict.fr/> > Acesso em: 08 de fevereiro de 2013.
FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.42, n. 1, p. 166–170, 1992.

FUNKE, G. & FUNKE-KISSELING, P. Performance of the New VITEK 2 GP Card for Identification of Medically Relevant Gram-Positive Cocci in a Routine Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n.1, p. 84–88, 2005.

GACO, P. R. et al. Relapsing bacteraemia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with a Perm-Cath catheter. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 12, n.11, p. 2428-2429, 1997.

GAHRN-HANSEN, B. et al. Evaluation of a conventional routine method for

identification of clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. Comparison with API-Staph and API-Staph-Ident. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section B: Microbiology & Immunology**. v. 95, n. 5, p. 283-92, 1987.

GEVERS, D. et al. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**. v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005.

GEVERS, D. et al. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 29, n. 361, p. 1911–1916, 2006.

GHERARDI, G. et al. Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 72, n. 1, p. 20 – 31, 2012.

GODA, S. K. et al. Screening for and isolation and identification of malathion-degrading bacteria: cloning and sequencing a gene that potentially encodes the malathion-degrading enzyme, carboxylestrase in soil bacteria. **Biodegradation**. v. 21, n.6, p. 903-913, 2010.

GORIS, J. et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, n. 1, p. 81-9, 2007.

GREENBLATT, C. L. et al. *Micrococcus luteus* – Survival in Amber. **Microbial Ecology**. v. 48, n. 1, p. 120-127, 2004.

GROTH, I. et al. *Demetria terragena* gen. nov., sp. nov., a New Genus of Actinomycetes Isolated from Compost Soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 47, n.4, p.1129-1133, 1997.

GUHA A. et al. Possible involvement of plasmids in degradation of malathion and chlorpyrifos by *Micrococcus* sp. **Folia Microbiologica**. v.42, n.6, p.574-6, 1997.

GUO, Y. et al. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v. 58, p.149–159, 2008.

GÜRTLER, V. & MAYALL, B. C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 51, n.1, p. 3-16, 2001.

HAMOUDI , A. C.; MARCON, M. J, CANNON, H. J. Evaluation of rapid identification of gram-positive cocci in positive blood cultures by use of the AutoMicrobic system Gram-Positive Identification Card. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 20, n. 2, p. 171-174, 1984.

HANAGE, W. P.; FRASER, C.; SPRATT, B. G. Sequences, sequence clusters and bacterial species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B.** v. 29, n. 361, p. 1917–1927, 2006.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology.** v. 5, n. 10, p. 245-249, 1998.

HARDIE, J. M. & WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement.** v. 83, p. 1-11, 1997.

HEIKENS, E., FLEER, A., PAAUW, A., FLORIJN, A., FLUIT, A. C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 43, n. 5, p. 2286-2290, 2005.

HERNANDO, G. C. et al. Isolation of *Alloiococcus otitidis* from the External Ear in Children. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.** v. 18, n. 1, p. 67-70, 1999.

HILL, J. E. et al. cpnDB: A Chaperonin Sequence Database. **Genome Research.** v.14, n. 8, p. 1669-1675, 2004.

HIRATA, Y. et al. Comparative analysis of *Micrococcus luteus* isolates from blood cultures of patients with pulmonary hypertension receiving epoprostenol continuous infusion. **Journal of Infection and Chemotherapy.** v.15, n. 6, p. 424-5, 2009.

HOSSAIN, M. T. et al. Application of groEL gene for the species-specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR. **Letters in Applied Microbiology**. v.54, n.1, p. 67-72, 2012.

HUNG W. C, et al. Use of groESL as a target for identification of *Abiotrophia*, *Granulicatella*, and *Gemella* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n.10, p. 3532-3538, 2010.

JAPANESE PHARMACOPOEIA. 15 Ed. Japão, Yakuji Nippo LTD., 2006.

JAYARAO, B. M. et I. Comparative evaluation of Vitek gram-positive identification system and API Rapid Strep system for identification of *Streptococcus* species of bovine origin. **Veterinary Microbiology**. v. 26, n. 3, p. 301-308, 1991.

JIMENEZ, L. Microbial Diversity in Pharmaceutical Product Recalls and Environments. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**. v. 61, n. 5, p. 383-399, 2007.

JOHNSON, J. L. Similarity analysis of rRNAs. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. Página 691.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *rpoB* Gene Sequencing for Identification of *Corynebacterium* Species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 9, p. 3925-3931, 2004.

KIM, M. et al. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative *Staphylococci*. **BMC Microbiology**. v. 8, n. 233, p. 1-7, 2008.

KLENK, H.-P. & GÖKER, M. En route to a genomebased classification of Archaea and Bacteria? **Systematic Applied Microbiology**. v. 33, p. 175–182, 2010.

KLOOS, W. E.; TORNABENE, T. G.; SCHLEIFER, K. H. Isolation and Characterization of *Micrococci* From Human Skin, Including Two New Species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 24, n.1, p. 79:101, 1974.

KOCH, C.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDTI, E. Reclassification of *Micrococcus*

agilis (Ali-Cohen 1889) to the Genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and Emendation of the Genus *Arthrobacter*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 45, n.4, p. 837-839, 1995.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 6 Ed. USA: Guanabara Koogan, 2010.

KONSTANTINIDIS, K. T. & TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current Opinion in Microbiology**. v. 10, n. 5, p. 504-509, 2007.

KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. In press. Genomic evaluations and improvements on single and multi locus sequence typing methods for studying intra-species diversity. **Applied and Environmental Microbiology**. 2007.

KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. The bacterial species definition in the genomic era. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 361, n.1475, p. 1929-1940, 2006.

KRIPPNER, E. Classificação de Áreas Limpas. **Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**. Ed. 44, p.42-45, p. 2010.

KUNIN, V. et al. The net of life: Reconstructing the microbial phylogenetic network. **Genome Research**. v. 15, n. 7, p. 954-959, 2005.

LA DUC, M. T. et al. Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Tolerating the Extreme Conditions of Clean Room Environments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 8, p. 2600-2611, 2007.

LA SCOLA, B. et al. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 3, p. 827-832, 2006.

LAWSON, P. A. et al. *Aerococcus sanguicola* sp. nov., isolated from a human clinical source. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, n. 2, p. 475-479, 2001.

LE BRUN, C. et al. *Kytococcus schroeteri* Endocarditis. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 1, p. 179–180, 2005.

LEVCHENKO, L. A. et al. Participation of biological membranes in colloidal gold transformation by *Micrococcus luteus* cells. **Membrane Cell Biology**. v. 11, n. 1, p. 131-135, 1997.

LEY, B. E. et al. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. **European Journal Clinical Microbiology Infections and Diseases**.17(4):247-53, 1998.

LI, X. et al. Application of gyrB in the identification of closely related bacteria-- a review. **Wei Sheng Wu Xue Bao**. v. 48, n. 5, p. 701-706, 2008.

LIU, H. et al. Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp.nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 50, n. 2, p. 715–719, 2000.

LIU, X-Y et al. *Micrococcus flavus* sp. nov., isolated from activated sludge in a bioreactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, n. 1, p. 66–69, 2007.

LOUBINOUX, J. et al. Bacteremia Caused by an Undescribed Species of *Janibacter*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 7, p. 3564–3566, 2005.

LUGUORI, A. P. et al. Diversity of 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Reveals Phylogenetic Relationships in *Burkholderia pseudomallei* and Its Near-Neighbors. **Applied Environmental Microbiology**. v. 76, n. 10, p. 3071–3081, 2010.

LUND, P. A. Multiple chaperonins in bacteria why somany? **FEMS Microbiolgy**. v.33, p. 785–800, 2009.

MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.

Proceedings of the National Academy of Sciences. v. 95, n.6, p. 3140-3145, 1998.

MANUAL DIFICO. **Meios de cultivo desidratados e reativos para microbiologia.** 10ed. 1984.

MARPLES, R. R. & RICHARDSON, J. F. Evaluation of a micromethod gallery (API Staph) for the identification of *staphylococci* and micrococci. **Journal of Clinical Pathology.** v. 35. n.6, p. 650–656, 1982.

MARTIN, K.; SHUMANN, P.; RAINEY, F. A.; SCHETZE, B; GROTH, I. *Janibacter limosus* gen. nov., a New Actinomycete with *meso*–Diaminopimelic Acid in the Cell Wall. **International Journal of Systematic Bacteriology.** v. 47, n.2, p. 529-534, 1997.

MARTINÉZ-BERMUDÉZ, A. et al. Tipos de contaminantes microbianos de matérias primas farmacêuticas. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.** v. 33, p. 153-157, 1991.

MELLMAN, A. et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of non fermenting bacteria. **Journal Clinical Microbiology.** v. 46, n. 6, p. 1946–1954, 2008.

MESQUITA, L. M. S. et al. **Avaliação da Biossorção de cádmio por *Micrococcus luteus*.** In: Simpósio Nacional de Fermentações, 2000, Rio de Janeiro.

MIGNARD, S & FLANDROIS, J. P. 16S rRNA Sequencing in Routine Bacterial Identification: A 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods.** v. 67, n. 3, p. 574–581, 2006.

MILTADOUS, G. & ELISAF, M. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. **Journal of Medical Case Reports.** v.29, n.5, p. 251, 2011.

MING MAN, S. et al. The Internal Transcribed Spacer Region, a New Tool for Use in Species Differentiation and Delineation of Systematic Relationships within the *Campylobacter* Genus. **PLOS ONE.** v. 6, n. 12, p. e29323, 2011.

MOISSL, C. et al. Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 61, n. 3, p. 509-21, 2007.

MOLLET, C. M.; DRANCOUT, M.; RAOULT, D. *rpoB* gene sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Mol. Microbiol.** v. 26, p. 1005-1011, 1997.

MOORE, E. R. et al. Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. **Research in Microbiology**. v.161, n. 6 , p. 430-8, 2010.

MUKAMOLOVA, G. V., et al. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. **Molecular Microbiology**. v. 46, n.3, p. 611-621, 2002.

MURRAY, P. et al. **Manual de Microbiologia Clínica**. 10 Ed. Vol. 1. USA: ASM Press, 2011.

NAGARKAR, P. P. et al. Oligophilic Bacteria as Tools To Monitor Aseptic Pharmaceutical Production Units. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 3, p. 1371–1374, 2001.

NAHRSTEDT, H.; SCHRODER, C.; MEINHARDT, F. Evidence for two *recA* genes mediating DNA repair in *Bacillus megaterium*. **Microbiology**. v. 151, n. 3, p. 775–787, 2005.

OSORIO, C. R., et al. E. Variation in 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions in *Photobacterium damsela*: a Mosaic-Like Structure. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 2, p. 636–645, 2005.

LOUDIZ, R.J. et al. *Micrococcus*-Associated Central Venous Catheter Infection in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. **Chest**. v. 126, n. 1, p. 90-94, 2004.

PACHECO, F. L. & PINTO, T. J. The bacterial diversity of pharmaceutical clean rooms analyzed by the Fatty Acid methyl ester technique. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**. v. 64, n. 2, p. 156-66, 2010.

PALYS, T.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 47, n. 4, p. 1145–1156, 1997.

PAYNE, G. W. et al. Development of a *recA* Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 7, p. 3917–3927, 2005.

PECES, R. et al. Relapsing bacteraemia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with Perm-Cath catheter. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**. v. 12, n.11 ,p. 2428–2429, 1997.

PETTI, C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clinical Infectious Diseases**. v. 15, n. 44, p. 1108-1114, 2007.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

POWERS, E. M. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.10, p. 3756-3758, 1995.

PRAKASHI, O. et al. Polyphasic approach of bacterial classification - An overview of recent advances. **Indian Journal Microbiology**. v. 47, n. 2, p. 98–108, 2007.

PUYEN, Z. M et al. Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus*. **Bioresource Technological**. v. 126, p. 233-237, 2012.

RAINEY, F. A. et al. *Dietzia*, a New Genus Including *Dietzia maris* comb. nov., Formerly *Rhodococcus maris*. . **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 45, n.10, p. 32-36, 1995.

RAJENDHRAN, J. & GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiological Research**. v. 166, n.2, p. 99-110, 2010.

REFSAHL, K. & ANDERSEN, B. M. Clinically significant coagulase-negative staphylococci: identification and resistance patterns. **Journal Hospital Infection**. v. 22, n. 1, p.19-31, 1992.

REITH, F. et al. The geomicrobiology of gold. **International Society for Microbial Ecology**. v. 1, n. 7, p. 567-84, 2007.

RENESTO, P. et al. Use of *rpoB* Gene Analysis for Detection and Identification of *Bartonella* Species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 2, p. 430-437, 2001.

RICHERT, K.; BRAMBILLA, A.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *ppk* and 16SrRNA genes. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 30, n. 2, p. 102–108, 2007.

RIESER, G.; SCHERER, S.; WENNING, M. *Micrococcus cohnii* sp. nov., isolated from the air in a medical practice **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 63, n. 1, p. 80-85, 2012.

ROCHA, C. L. **Análise das identificações realizadas no Setor de Identificação Bacteriana do DM/INCQS/FIOCRUZ no período de 1997 a 2004**. Monografia. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2006.

RODRIGUES, T. B. **Diversidade Metagenômica Microbiana de Biomas Terrestres e Marinhos**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2011.

ROSSELLO-MORA, R. & AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology**. v. 25, n. 1, p. 39–67, 2001.

ROSSELLÓ-MORA, R. Updating prokaryotic taxonomy. **Journal of Bacteriology**. v. 187, n. 18, p. 6255-6257, 2005.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v.4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SATOMI, M.; LA DUC, M. T.; VENKATESWARAN, K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, n. 8, p. 1735-1740, 2006.

SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 32, n. 8, p. 533-542, 2009.

SHUMANN, P. et al. Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder Micrococccineae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, n. 7, p. 1823-1849, 2009.

SEIFERT, H.; KALTHEUNER, M.; PERDREAU-REMINGTON, F. *Micrococcus luteus* endocarditis: case report and review of the literature. **Zentralbl Bakteriol**. v.282, n. 4, p.431-435,1995.

SHIN, K. S, HONG, S. B, SON, B. R. A Case of Catheter-Related Bacteremia by *Arthrobacter woluwensis*. **The Korean Journal of Laboratory Medicine**. v. 26, n. 6, p. 103-106, 2006.

SILVA, M. C. P. **Interação entre *Methylobacterium extorquens* e cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*)**. Genética e melhoramento de plantas. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: Freeman, 1973.

SOOD, S. et al. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian Journal of Medical Research**. v. 128, n. 2, p. 111-121, 2008.

SOUZA, M. O. **Caracterização fenotípica e molecular de *Bacillus sp.* e gêneros relacionados provenientes de análises de produtos farmacêuticos**. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2011.

SPANU, T. et al. Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of Staphylococci from bloodstream infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n.9, p. 4259-4263, 2003.

STACKEBRANDT E. & GOEBEL B. M. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 44, v. 4 p.846–849,1994.

STACKEBRANDT E.; KOCH C.; GVOZIAK O.; SCHUMANN P. Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. Nov., *Nesterenkonia* gen. Nov., *Kytococcus* gen. Nov., *Dermacoccus* gen. Nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. Emend. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.45, n. 4, p. 682-692, 1995.

STACKEBRANDT, E. Molecular taxonomic parameters. **Microbiology Australia**. v. 32, n. 2, p. 59-61, 2011. Disponível em: <
http://journals.cambridge.com.au/microbiology_australia/Past_Issues/Read_Article?id=257&i=31> Acesso em: 15 de dezembro de 2012.

STACKEBRANDT, E. & EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**. v. 33, n. 4, p. 152-155, 2006.

STALEY, J. T. Universal species concept: pipe dream or a step toward unifying biology? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 36, n. 11, p. 1331-1336, 2009.

STEINGRUBE, V. A. et al. PCR Amplification and Restriction Endonuclease Analysis of a 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene Sequence for Taxonomic Separation of Rapidly Growing Mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, n. 1, p. 149–153, 1995.

STEVENSON, L. G. et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 10, p. 3482–3486, 2010.

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

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

SZCZERBA, I. Gram-positive cocci as an opportunistic infection factor. **Pol Merkur Lekarski**. v. 18, n. 106, p. 462-4, 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THE UNITED STATE PHARMACOPEIA 35.National Formulary 30. Rockville: U.S.

Pharmacopeia, 2012.

THOMPSON, C. C. **Taxonomia Genômica de Vibrios**. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2009.

TINDALL, B. J et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, n. 1, p. 249-66, 2010.

URWIN, R & MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**. v. 11, n. 10, p. 479-87, 2003.

USÓ, J. et al. Endocarditis due to *Micrococcus luteus*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v.21, n. , p. 116-7, 2003.

VALDIVIA-ARENAS, M. A. Bloodstream Infections Due to *Micrococcus* spp and Intravenous Epoprostenol. **Infection Control Hospital Epidemiology**. v. 30, n. 12, p. 1237-1237,2009.

VANDAMME P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**. v. 60, n. 2, p.407- 438, 1996.

VASCONCELLOS, S. P. **Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, São Paulo, 2006.

VOLESKY, B & CHONG, H. K. Evaluation of the Cd, Cu, and Zn Biosorption in Two-Metal Systems Using an Algal Biosorbent. **Biotechnology Progress**. v. 11, n. 1, p. 39–44, 1995.

VON EIFF, C. et al. *Micrococcus luteus* as a cause of recurrent bacteremia. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 15, n. 8, p. 711-713, 1996.

VOS M. A species concept for bacteria based on adaptive divergence. **Trends Microbiology**. v. 19, n. 1, p. 1-7, 2011.

WALLET, F. et al. Performances of VITEK 2 Colorimetric Cards for Identification of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 9, p. 4402–4406, 2005.

WATTS, J. L. et al. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms

isolated from bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**. v. 83, n. 10, p. 2373-2379, 2000.

WAYNE, L. G. et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 37, n. 4, p. 463-464, 1987.

WENG, F. Y. et al. Application of *recA* and *rpoB* sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species. **Journal of Applied Microbiology**. v. 107, n. 2, p. 452-64, 2009.

WIESER, M. et al. Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 52, p. 629–637, 2002.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**. v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOESE, C. R.; KANDLERT, O.; WHEELIS, A. L. Evolution Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities**. 2012. Disponível em <http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/env_monitoring/en/index.htm> Acesso em 15 de janeiro de 2013.

WU, G-f. & LIU, X-h. Characterization of predominant bacteria isolates from clean rooms in a pharmaceutical production unit. **Journal of Zhejiang University Science B**. v. 8, n. 9, p. 666–672, 2007.

YAP, R. L. & MERMEL, L. A. *Micrococcus* Infection in Patients Receiving Epoprostenol by Continuous Infusion. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**. v. 22, n.11, p. 704-5, 2003.

YOUNG, M. et al. Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living actinobacterium. **Journal of Bacteriology**. v. 192, n. 3, p. 841-860, 2010.

ZHANG, J-Y. et al. *Agrococcus terreus* sp. nov. and *Micrococcus terreus* sp. nov., isolated from forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, n. 8, p. 1897–1903, 2010.

ZHAO, G. Z. et al. *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, n.10, p. 2383-2387, 2009.