

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

Luciane Martins Medeiros

**CRIAÇÃO DA BACTERIOTECA DE BIOMANGUINHOS, CARACTERIZAÇÃO DE  
ESTIRPES BACTERIANAS E DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA  
INTEGRADO DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E DE  
RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINACAO**

Rio de Janeiro

2015

Luciane Martins Medeiros

**CRIAÇÃO DA BACTERIOTECA DE BIOMANGUINHOS, CARACTERIZAÇÃO DE  
ESTIRPES BACTERIANAS E DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA  
INTEGRADO DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E DE  
RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINACAO**

Tese 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 Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Manuela da Silva  
Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2015

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

Medeiros, Luciane Martins

Criação da Bacterioteca de Biomanguinhos, caracterização de estirpes bacterianas e desenvolvimento de um sistema integrado de identificação de micro-organismos e de rastreamento de fontes de contaminação / Luciane Martins Medeiros. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2015.

261 f., il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2015.

Orientadoras: Manuela da Silva, Verônica Viana Vieira

1. Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz. 2. Controle de Qualidade. 3. Área Controlada. 4. Preservação Biológica. I. Título

Bio Manguinhos' Bacterioteca creation, characterization of bacterial strains and development of an integrated system for the identification of microorganisms and tracing sources of contamination

Luciane Martins Medeiros

**CRIAÇÃO DA BACTERIOTECA DE BIOMANGUINHOS, CARACTERIZAÇÃO  
DE ESTIRPES BACTERIANAS E DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA  
INTEGRADO DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E DE  
RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO**

Tese 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 Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovada em 30 / 04 / 2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/Fiocruz

---

Cledir Santos (Doutor)  
Universidad de la Frontera/ Chile

---

Raphael Hirata Junior (Doutor)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Manuela da Silva (Doutora) – Orientadora  
Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referências

---

Verônica Viana Vieira (Doutora) – Orientadora  
Instituto Oswaldo Cruz

Aos meus meninos, João Guilherme e Pedro Henrique

## AGRADECIMENTOS

“Um galo sozinho não tece uma manhã: ele precisará sempre de outros galos. De um que apanhe esse grito que ele e o lance a outro; de um outro galo que apanhe o grito de um galo antes e o lance a outro; e de outros galos que com muitos outros galos se cruzem os fios de sol de seus gritos de galo, para que a manhã, desde uma teia tênue, se vá tecendo, entre todos os galos.”

João Cabral de Melo Neto

(Trecho do poema “Tecendo a manhã”)

Ter desenvolvido este trabalho foi uma experiência intensa, gratificante e dolorosa, que só foi possível graças à ajuda de muitas pessoas. A palavra “agradecimento” foi a tônica da minha caminhada acadêmica (assim como profissional e pessoal) e por isso considero esta uma das partes mais importantes do presente trabalho. Por apresentar escrita livre de formato, talvez seja a que mais me represente.

Inicialmente, gostaria de agradecer ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS): sempre digo que a minha formação é em “controle de qualidade de produtos” e foi nesta instituição que tive os ensinamentos mais sólidos nesta área, no Setor de Microbiologia de Alimentos. Gostaria de agradecer a todos os amigos e professores que tive neste local, em especial à Carla Rosas, Valéria Medeiros, Regina Branquinho, Fátima e minha eterna mestra Márcia Warnken (que sempre foi generosa comigo, compartilhando seu enorme conhecimento e me incentivando). Tudo o que aprendi nesse setor foi de extrema valia e consegui transpor com facilidade para outros produtos.

Ainda no INCQS, agradeço à Pós-Graduação desta unidade, tanto no passado, quanto no presente. Por ter realizado meu mestrado também neste programa, agradeço às ex-coordenadoras e doutoras Maria Helena Simões e Tereza Santos, e à minha ex-colega de mestrado e doutora Gina Peres, por terem me acompanhado em toda as etapas da minha vida acadêmica, seja no mestrado, seja no doutorado. Obrigada por todas as correções, conselhos, ajudas, participações em bancas e

ensinamentos. Obrigada por serem firmes comigo, me ajustando e me “domando”, e tudo isso sem nunca perderem a ternura. Agradeço à atual coordenadora, Katia Christina, pelas mesmas razões. Obrigada pela paciência com todas as situações que precisei da ajuda de vocês e pela humanidade em entenderem minhas limitações e angústias.

Agradeço à unidade da Fiocruz em que desenvolvi a maior parte deste trabalho e que aprendi a amar: Bio-Manguinhos (carinhosamente chamada de Bio). Apesar da minha formação profissional ter sido realizada em outras unidades da Fiocruz (ENSP, INCQS e IOC), quando ingressei como servidora nesta instituição fui alocada em Bio e posso assegurar que um mundo novo se abriu para mim. Após o choque inicial (eu queria ir para o INCQS), fui conhecendo as atividades, a infraestrutura e os funcionários e aprendi não somente uma enorme quantidade de assuntos técnicos, mas também lições de vida. Gostaria de agradecer ao sr. Artur Couto, diretor de Bio-Manguinhos, aos vice-diretores e demais conselheiros por permitirem a realização deste trabalho. Agradeço aos meus colegas do Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA), em especial à chefe deste departamento, sra. Darcy Akemi Hokama, por todo apoio e confiança que depositou em mim e neste trabalho. Agradeço às chefias do LACOM (Igor e Carina) e dos demais laboratórios (Cláudia, Cristine e Luiz Alberto) e às seções de apoio (em especial, SEMEC e SEPRM), assim como a todos os funcionários da Seção de Esterilidade, Processo e Insumos, minha seção de trabalho. Agradeço ainda às doutoras Érica Louro da Fonseca, Katherine Antunes e Jaline Silvério pelas contribuições realizadas, pelas correções e ajustes sugeridos e pela gentileza da ajuda. Agradeço às demais seções do LACOM e também ao LAFIQ, por toda ajuda e amizade.

Ao longo desses anos em Bio-Manguinhos, pude contar com a ajuda de muitas pessoas, sendo esta oferecida de maneira formal ou como uma boa conversa. Agradeço toda a informação oferecida, pois foi fundamental para o meu crescimento profissional e o entendimento de como uma indústria biofarmacêutica funciona. Agradeço aos funcionários da Garantia da Qualidade (em especial, da DIDOC), aos funcionários do DEVIR, aos funcionários do LAMEV. Obrigada, Cíntia Cardoso, Ester de Figueiredo, Leila Lahas, Maria Betania Marchetti, Victor Ferreira, Priscila

Martins, Bárbara Scangarelli, Renata, Leonardo, Márcio e dra. Wania Renata dos Santos: aprendi muito com vocês!

Na busca por alternativas para o método de identificação, pude entrar em contato com a equipe de funcionários da empresa DiagPrime que me auxiliaram muito no entendimento do funcionamento dos softwares dos sistemas de identificação e na resolução de problemas associados a estes. Nelinho e Veronica, sou muito grata por todo apoio! Muito obrigada!

Gostaria de agradecer também às instituições de fomento (FIOTEC e CNPq) por custear os projetos associados a esta tese. Tive a oportunidade de realizar o doutorado-sanduíche (pelo programa Ciências sem Fronteiras/CNPq) no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, em Braga, Portugal. Agradeço ao meus dois orientadores na UMinho, prof.dr. Nelson Lima e dr. Cledir Santos, da Micoteca da Universidade do Minho. Obrigada por me receberem e me fazerem exercitar o pensar sobre ciência. Agradeço todas as conversas e a paciência em organizar minha linha de raciocínio. Agradeço também aos meus amigos da MUM: Nicole, André, Lúcia, Juliana, Francisco e minhas “personal colegas” Fabiana e Marta. Obrigada a todos os companheiros de Departamento e da UMinho.

Em Braga, passei por momentos felizes e tristes. Mas em todos eles pude contar com amigos de todas as partes do mundo, que formaram a família mais excêntrica do planeta. Obrigada, Manoela, Maria Carolina, Verônica, Sofia, Eva, Maikon, Brenno, Fran, Taiza, Humberto, André, Ibraim, Jei, Luis, Cesar, Gabriela, Dani, Josi, Patrícia, Sara, Marlene, Lina, Abril, Aloia, José e todos os amigos que fiz. Vocês estarão para sempre no meu coração.

Gostaria de agradecer ao Programa de Vocação Científica (PROVOC) por me permitir conviver com três meninas adoráveis: Lorena, Deborah e Poliana. Obrigada a vocês, meninas, por me ajudarem e por me ensinarem também.

Agradeço aos meus pais – Pedro e Linda – por me apoiarem sempre. Mesmo com tantas dificuldades na nossa família, vocês sempre estiveram comigo, me dando

força até quando eu achava que não teria mais. Sou grata a vocês por tudo o que sou e espero poder um dia retribuir todo o bem que vocês me fazem. Agradeço também aos meus irmãos (José Luiz e Lucia) e à Denise, minha cunhada que considero minha irmã. Agradeço à minha (enorme) família de Santa Catarina. Obrigada pelo apoio e pela ajuda nos momentos mais difíceis. O amor de vocês sempre me faz ressurgir das cinzas.

Existe a família consanguínea e a família que formamos com o coração. Gostaria de agradecer ao meu companheiro e melhor amigo, Miguel Teixeira, por permitir que este trabalho fosse realizado. Ele é seu também. Foram muitos problemas que enfrentamos nesses últimos anos e, em todos eles, você estava ao meu lado, me apoiando e me ajudando. Espero poder te ajudar a realizar os seus sonhos também. Obrigada aos meus dois meninos, João Guilherme e Pedro Henrique, por serem o ar que eu respiro. A força do amor de vocês me faz viver e lutar. Agradeço também ao sr. Manuel Teixeira, d. Maria Virgínia, Sofia e Jorge por todo carinho e apoio.

Preciso agradecer – e muito – às minhas orientadoras e amigas, Verônica Vieira e Manuela da Silva. Foram quatro anos intensos, com muitos problemas, e mesmo eu sendo “um fio desencapado, uma força da natureza”, vocês acreditaram e, mais importante, não desistiram de mim. Tenho uma admiração imensa por vocês e peço desculpas se não fui uma aluna fácil. Eu tenho muito respeito e consideração com vocês, e agora também uma dívida de gratidão. Muito obrigada!

Preciso agradecer a duas chefes que acreditaram em mim, desde o início: Lilia Seródio e Josiane Mattoso. Enquanto outras chefias não enxergavam seus funcionários nem os desafios de Bio, vocês me apoiaram sempre e permitiram que eu desenvolvesse esse trabalho, ajudando na parte de insumos, aquisição de equipamentos, contratando funcionários, entre outras coisas. Vocês me ensinaram muitas coisas e compartilhamos tantos momentos que, por essas e por outras razões, vocês serão sempre as minhas líderes. Obrigada!

Mas o meu agradecimento mais especial vai para um grupo que, sem ele, não haveria este trabalho: à equipe de identificação de micro-organismos que se formou ao longo desses quatro anos. Adriana Frazão, Fernanda Ventura, Cristhiane

Falavina, Lygia Braga, Joyce Modesto, Luciana Veloso e Silvia Ferreira, nunca terei palavras suficientes para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim e por este trabalho. Se hoje ele é uma realidade, foi graças ao apoio de vocês. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos e por depositar tanta confiança em mim. Vocês são as melhores amigas e profissionais que eu poderia ter ao lado!

“Transportai um punhado de terra todos os dias  
e fareis uma montanha.”

*Confúcio*

## RESUMO

A correta identificação de micro-organismos isolados em áreas classificadas é uma exigência da Anvisa e de organismos internacionais, que auxilia no rastreamento das possíveis origens de contaminação dos processos e produtos. Entretanto, os bancos de dados (BD) utilizados nos métodos de identificação quase nunca contemplam a diversidade autóctone de cada unidade de produção farmacêutica. O presente trabalho teve como objetivos propor modificações na rotina de identificação de micro-organismos pelo Controle de Qualidade (CQ) de Bio-Manguinhos por meio do estudo da diversidade bacteriana (com a construção de uma Bacterioteca), da avaliação de quatro metodologias de identificação (BBL Crystal, VITEK 2 Compact, VITEK MS RUO e MicroSEQ) e da construção de um BD *in house* para identificação por MALDI-TOF MS. Assim como propor o uso da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e do banco de dados da Bacterioteca para investigação de origem de contaminação. Os resultados do presente trabalho permitiram a elaboração de diversos documentos (instruções de trabalho, relatórios, catálogo de identificação, entre outros), a construção da Bacterioteca de Bio-Manguinhos, a avaliação da microbiota autóctone por local de produção e pelo processo de produção de um ingrediente farmacêutico ativo, o uso de estirpes autóctones como padrões secundários, a mudança do método de identificação do CQ de Bio-Manguinhos, a expansão do BD do VITEK MS RUO com estirpes autóctones, a verificação da relação clonal entre estirpes num evento de contaminação e a elaboração de um sistema exclusivo de identificação e de rastreamento de fontes de contaminação. Em conclusão, a avaliação e a incorporação de metodologias à rotina do CQ de Bio-Manguinhos foram realizadas com êxito e contribuíram para a melhoria dos resultados de identificação de contaminantes, assim como a construção de um catálogo de identificação e de um banco de dados *in house*. Além disso, o uso da técnica de PFGE em conjunto com a Bacterioteca e seu BD foram empregados com sucesso na investigação de um desvio da qualidade. Por fim, o sistema integrado de identificação de micro-organismos e de investigação de origem de contaminação foi avaliado e considerado viável, podendo ser implementado em outras unidades farmacêuticas.

Palavras-chave: MALDI-TOF MS; coleção de culturas; controle de qualidade; áreas controladas; identificação microbiana.

## ABSTRACT

The correct identification of microorganisms isolated in cleanroom is a requirement of ANVISA and international organizations, which assist on tracking possible sources of process and products' contamination. However, the database (DB) used on the identification methods rarely consider the native diversity of each pharmaceutical manufacturing unit. This thesis aims to propose changes in the routine of microorganism identification, by Bio-Manguinhos' Quality Control (QC), by studying the bacterial diversity (with the development of a bacterioteca), the evaluation of four methodologies of identification (BBL Crystal, VITEK 2 Compact, VITEK MS RUO and MicroSEQ) and an "in house" DB for identification by MALDI-TOF MS, as well as propose the use of pulsed field gel electrophoresis technique (PFGE) and the Bacterioteca's data base for the contamination's source research. The results of this thesis allowed the elaboration of various documents (work instructions, reports, identification catalog, etc), the development of Bio-Manguinhos' Bacterioteca, the evaluation of native microbial for a production place and process of an active pharmaceutical ingredient, the use of native strains as secondary standards, the change of identification method of Bio-Manguinhos' QC, the expansion of VITEK MS RUO DB with native strains, the verification of clonal relation between strains in a contamination event and the development of an unique system of identification and tracking of contamination sources. In conclusion, the evaluation and the incorporation of methodologies to Bio-Manguinhos' QC routine were successful and contributed to the improvement of contaminants' identification results, as well as the development of an identification catalog and an "in house" database. Also, the use of PFGE technique with the Bacterioteca and its DB were successfully employed in the quality deviation research. Finally, the integrated microorganisms identification system and the contamination source research were evaluated and considered feasible, and can be implemented in other pharmaceutical units.

Keywords: MALDI-TOF MS; culture collection; quality control; cleanroom; microbial identification.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Resultado positivo para Teste do KOH a 3%, com a formação de fio viscoso .....	44
Figura 2 - Resultado negativo para Teste do KOH a 3%, com ausência de fio viscoso .....	44
Figura 3 - Esquema sequencial referente aos procedimentos empregados na identificação de bactérias isoladas pelo Controle de Qualidade .....	45
Figura 4 - Esquema ilustrando as etapas da técnica de PFGE .....	52
Figura 5 - Esquema ilustrando etapas para o preparo de lotes de trabalho de cepas autóctones a serem utilizadas como padrões secundários pelo Controle de Qualidade .....	54
Figura 6- Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero <i>Streptomyces</i> .....	820
Figura 7- Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero <i>Streptomyces</i> .....	82
Figura 8 - Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero <i>Microbacterium</i> .....	84
Figura 9 - Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero <i>Arthrobacter</i> .....	87
Figura 10 - Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e continuação da Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero <i>Arthrobacter</i> .	88
Figura 11 - Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero <i>Corynebacterium</i> .....	92
Figura 12 - Dendrograma do espécime do gênero <i>Arthrobacter</i> .....	97
Figura 13 - Dendrograma de um espécime do gênero <i>Paenibacillus</i> .....	98
Figura 14 - Dendrograma de um espécime do gênero <i>Corynebacterium</i> .....	99
Figura 15 - Dendrograma do espécime do gênero <i>Streptomyces</i> .....	100
Figura 16 - Dendrograma do espécime do gênero <i>Microbacterium</i> .....	101

Figura 17- Organização das pastas do gênero <i>Streptomyces</i> no BD/SARAMIS, com detalhamento dos perfis de espectros (ER e SS) contidos na pasta 'Autóctone B1047' .....	104
Figura 18- Diagrama SuperSpectra <i>Streptomyces</i> sp. B1047.....	106
Figura 19- Picos de massas para SuperSpectra <i>Streptomyces</i> sp. B1047 (parte I)	107
Figura 20- Picos de massas para SuperSpectra <i>Streptomyces</i> sp. B1047 (parte II) .....	108
Figura 21 - Organização das pastas do gênero <i>Microbacterium</i> no BD/SARAMIS, com detalhamento dos perfis de espectros (ER e SS) contidos na pasta 'Autóctone B704' .....	110
Figura 22 - Diagrama SuperSpectra <i>Microbacterium</i> sp. B704 .....	112
Figura 23 - Picos de massas para SuperSpectra <i>Microbacterium</i> sp. B704 .....	113
Figura 24 - Comparação do custo dos insumos por amostra (valores obtidos em 2012) .....	116
Figura 25 - Comparação do tempo de obtenção de resultados.....	117
Figura 26 - Distribuição dos gêneros bacterianos dos estirpes da Bacterioteca, no período de 2010 a 2014 (N=5.842) .....	121
Figura 27 - Distribuição dos grupos bacterianos (Gram) da Bacterioteca no período de 2010 a 2014 .....	124
Figura 28 - Gêneros identificados entre os cocos Gram positivos (2010-2014).....	125
Figura 29 - Gêneros identificados entre as estirpes Gram negativas (2010-2014) .	127
Figura 30 - Gêneros identificados entre os bastonetes Gram positivo não formadores de esporos ( 2010-2014) .....	129
.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 31 - Gêneros identificados entre os bastonetes Gram positivo formadores de esporos (2010-2014) .....	131
Figura 32 - Distribuição dos gêneros identificados a partir de amostras de IFA-A (2010 a 2013).....	175
Figura 33 - Gel de PFGE com 11 amostras investigadas. ....	184
Figura 34 - Fluxograma do Sistema Integrado de Identificação de Micro-organismos e Investigação de Origem de Contaminação.....	188

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado do teste de KOH a 3% em culturas com cinco períodos de incubação distintos (N=204).....	60
Tabela 2 - Distribuição dos estirpes (N=52) identificados pelo kit MicroSeq.....	63
Tabela 3 - Resultados do VITEK MS RUO para 369 estirpes autóctones de Bio-Manguinhos (período de janeiro a dezembro de 2013).....	66
Tabela 4 - Resultados do VITEK MS RUO para 506 estirpes autóctones de Bio-Manguinhos (período de janeiro a maio de 2014).....	68
Tabela 5 - Comparação da performance das três metodologias BBL Crystal, VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO na identificação de cepas identificadas pelo kit MicroSeq (N=52).....	74
Tabela 6- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero <i>Paenibacillus</i> .....	81
Tabela 7- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero <i>Streptomyces</i> .....	83
Tabela 8- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero <i>Microbacterium</i> .....	85
Tabela 9- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero <i>Arthrobacter</i> .....	90
Tabela 10- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero <i>Corynebacterium</i> .....	93
Tabela 11 – 54 gêneros (6%) da Bacterioteca que não foram discriminados na Figura 26.....	122
Tabela 12 - Quantitativo de lotes de meio de cultura avaliados com uso de padrões autóctones, no período de 2010 a 2014.....	136
Tabela 13 - Distribuição entre as Áreas e a Bacterioteca.....	137
Tabela 14 - Gêneros das estirpes identificadas: Bacterioteca X Área 1.....	141
Tabela 15 - Estirpes bacterianas (N=1337) a partir de IFA-A, de 2010 a 2013.....	172
Tabela 16 - Número de amostras de IFA-A analisadas e resultados inconclusivos na identificação de contaminantes (2010 a 2013).....	174
Tabela 17 - Principais gêneros identificados (2010 a 2013) a partir de IFA-A.....	176

Tabela 18 - Resultados da identificação de estirpes isoladas no ano de 2013 de diversas fontes na Área 1 .....	178
Tabela 19 - Resultados dos gêneros <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus</i> e <i>Escherichia</i> no ano de 2013 na Área 1 .....	180
Tabela 20 - Estirpes selecionados para a investigação do desvio de qualidade.....	183

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos bacterianos ao Gram e faixa de turvação da suspensão correspondente .....	46
Quadro 2 - Tipo de cartão do VITEK 2 Compact de acordo com o resultado do Gram .....	47
Quadro 3 - Condições de tempo, temperatura e número de ciclos utilizadas na reação de amplificação .....	50
Quadro 4 - Condições de tempo, temperatura e número de ciclos utilizadas na reação de sequenciamento .....	51
Quadro 5 - Resultado do teste de KOH a 3% em culturas de 24 horas (n=94).....	59
Quadro 6 - Comparação da performance das três metodologias BBL Crystal, VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO na identificação de cepas pertencentes a Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS .....	71
Quadro 7- Cepas bacterianas candidatas a serem utilizadas como padrões autóctones.....	134
Quadro 8 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 1 (2010 a 2014) .....	140
Quadro 9 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 1 (2010 a 2014).....	143
Quadro 10 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimento de monitoramento de águas (WFI e PW) na área 1 (2010 a 2014).....	144
Quadro 11 – Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 1 .....	146
Quadro 12 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 2 (2010 a 2014) .....	149
Quadro 13 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 2 (2010 a 2014).....	150
Quadro 14 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento de águas na área 2 (2010 a 2014) .....	151

Quadro 15 – Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 2.....	152
Quadro 16 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 3 (2010 a 2014) .....	154
Quadro 17 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 3 (2010 a 2014).....	155
Quadro 18 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento das águas na área 3 (2010 a 2014).....	1556
Quadro 19 – Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 3.....	157
Quadro 20 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 4 (2010 a 2014) .....	158
Quadro 21 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 4 (2010 a 2014).....	160
Quadro 22 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento de águas na área 4 (2010 a 2014) .....	162
Quadro 23 - Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 4 (2010 a 2014).....	1664
Quadro 24 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 5 (2010 a 2014) .....	166
Quadro 25 – Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 5 (2010 a 2014).....	167
Quadro 26 – Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento de águas na área 5 (2010 a 2014) .....	168
Quadro 27 – Estirpes isoladas a partir de amostras..... do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 5 .....	169 169
Quadro 28 – Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 6 (2010 a 2014).....	170
Quadro 29 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 6 (2010 a 2014) .....	171

Quadro 30 - Relação entre estirpe e perfil apresentado.....	184
---	-----

## LISTA DE SIGLAS

µL – microlitro

min – minuto

mL – mililitro

rpm – rotação por minuto

s – segundo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS – Agar Sangue de Carneiro a 5%

ATCC – American Type Culture Collection

BD/BACTERIOTECA – Banco de dados da bacterioteca de Bio-Manguinhos

BD/SARAMIS – Banco de dados do software SARAMIS

BGN – Bastonete Gram negativo

BGP – Bastonete Gram positivo

BPF – Boas práticas de fabricação

CCMA – Colecao de Culturas de Micro-organismos Autoctones

CHCA - ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico

DEQUA – Departamento de Controle de Qualidade

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EP – European Pharmacopeia

FDA – Food and Drug Administration

GBRCN – Global Biological Resource Center Network

GN – Gram negativo

GP – Gram positivo

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INHEM – Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología

LACOM – Laboratório de Controle Microbiológico

MALDI-TOF MS – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry

OCDE – Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Agar padrão para contagem

PCR – Reação em cadeia polimerase PMA – Programa de Monitoramento Ambiental

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RODAC – Recovered Organism Detection and Counting

SARAMIS – Spectral Archive and Microbial Identification System

SEPIN – Seção de Esterilidade, Processos e Insumos

TSA – Agar triptona de soja

UFC – Unidade formadora de colônia

UI – Unidade Internacional

USP – United States Pharmacopeia

WFCC – World Federation Culture Collection

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS DE SAÚDE .....	23
1.2 PRODUÇÃO DE IMUNOBIOLOGICOS POR BIO-MANGUINHOS.....	24
1.3 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO NA INDÚSTRIA DE IMUNOBIOLOGICOS .....	25
1.4 IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES MICROBIANOS .....	27
1.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE IMUNOBIOLOGICOS .....	28
1.6 USO DE COLEÇÕES DE CULTIVO E O ESTUDO DA DIVERSIDADE .....	34
1.7 RELEVÂNCIA E PERSPECTIVAS .....	36
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	38
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	40
3.1 OBTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS .....	40
3.2 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS DA COLEÇÃO DE CULTURAS (BACTERIOTECA) .....	40
3.3 REISOLAMENTO .....	41
3.4 CARACTERIZACAO MORFOLÓGICA DAS ESTIRPES.....	41
3.4.1 Coloração de Gram .....	41
3.4.2 Teste de KOH a 3% .....	43
3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES.....	45
3.5.1 Identificação pelo Kit BBL Crystal®.....	46
3.5.2 Identificação pelo sistema VITEK 2 Compact®.....	46
3.5.3 Identificação pelo sistema VITEK MS RUO®.....	47
3.5.4 Identificação pelo kit MicroSEQ® 500 .....	48
3.6 PRESERVAÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS DA COLEÇÃO DE CULTURAS (BACTERIOTECA).....	51
3.7 ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTACAO DO GENOMA DE ESTIRPES UTILIZANDO ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE) .....	52

3.8 SELEÇÃO DE ESTIRPES DA BACTERIOTECA PARA O PREPARO DOS LOTES DE TRABALHO (PADRÕES SECUNDÁRIOS) E IMPLANTAÇÃO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DOS MEIOS DE CULTIVO.....	53
3.9 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES (PREVIAMENTE IDENTIFICADAS PELO MICROSEQ) PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF/MS E CRIAÇÃO DE UM BANCO DE ESPECTROS PRÓPRIO COM O USO DE ESTIRPES AUTÓCTONES.....	55
3.10 CONSTRUÇÃO DE CATÁLOGO DE IDENTIFICAÇÃO.....	56
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
4.1 MELHORIA NO PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NA SEPIN.....	58
4.1.1 Uso do sistema VITEK MS RUO na identificação de estirpes isoladas na rotina da SEPIN.....	66
4.1.2 Comparação das três metodologias BBL Crystal, VITEK 2 Compact, VITEK MS RUO utilizando cepas de referência da Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS).....	70
4.1.3 Comparação das três metodologias BBL Crystal, VITEK 2 Compact, VITEK MS RUO utilizando cepas autóctones identificadas pelo kit MicroSEQ® 500 .....	73
4.1.4 Análise do BD/SARAMIS para avaliação dos resultados de ausência de identificação obtidos pelo VITEK MS RUO .....	77
4.1.5 Construção de SuperSpectras e incorporação ao BD do SARAMIS .....	102
4.1.6 Elaboração de Documentos Técnicos .....	114
4.1.7 Melhorias quanto ao Custo/Tempo/Precisão associadas: cálculo do valor por amostra .....	115
4.2 BACTERIOTECA E BANCO DE DADOS.....	118
4.2.1 Uso de padrões autóctones: procedimentos e aplicações .....	134
4.2.2 Mapeamento da distribuição das bactérias isoladas nos ambientes de produção (monitoramento ambiental/água) por área: gêneros em cada área de produção de Bio-Manguinhos, no período de 2010 a 2014.....	136
4.2.3 Mapeamento da distribuição nos processos produtivos: gêneros identificados no processo de produção do Insumo Farmacêutico Ativo na área 1 (IFA-A), no período de 2010 a 2013 .....	171
4.3 RASTREAMENTO DE CONTAMINANTES.....	181
4.3.1 Uso do Banco de Dados e da Bacterioteca.....	182

4.3.2 Uso da técnica do PFGE .....	183
4.4 CONSTRUÇÃO DE CATÁLOGO DE IDENTIFICAÇÃO.....	185
4.5 PROPOSTA DE SISTEMA EXCLUSIVO DE IDENTIFICAÇÃO E DE RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO:.....	186
4.5.1 Fluxograma proposto.....	187
4.5.2 Sequenciamento de cepas de difícil identificação .....	190
4.5.3 Construção de uma Base de Dados de espectros própria .....	190
4.5.4 Fotodocumentação e inserção no Catálogo de Identificação .....	191
4.5.5 Preservação das cepas em coleção de cultivos.....	191
4.5.6 Uso do Banco de Dados, da Bacterioteca e do PFGE na investigação de fontes de contaminação .....	191
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>193</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>194</b>
<b>APÊNDICE A – Modelo de ficha para catálogo de identificação .....</b>	<b>206</b>
<b>APÊNDICE B – Instrução de trabalho (IT) nº4989 “Técnica do KOH para diferenciação entre bactérias Gram negativo e Gram positivo .....</b>	<b>208</b>
<b>APÊNDICE C – Instrução de Trabalho (IT) nº 7673 “Uso do aparelho para coloração de Gram SLIDEINK HEMOGRAM” .....</b>	<b>212</b>
<b>APÊNDICE D – Instrução de Trabalho (IT) nº 7672 “Identificação de isolados bacterianos a partir do sistema VITEK 2 Compact” .....</b>	<b>216</b>
<b>APÊNDICE C – Instrução de Trabalho (IT) nº 7673 “Uso do aparelho para coloração de Gram SLIDEINK HEMOGRAM” .....</b>	<b>219</b>
<b>APÊNDICE D – Instrução de Trabalho (IT) nº 7672 “Identificação de isolados bacterianos a partir do sistema VITEK 2 Compact” .....</b>	<b>223</b>
<b>APÊNDICE E – Protocolo e relatório de validação para o sistema VITEK 2 Compact.....</b>	<b>228</b>
<b>APÊNDICE F – Instrução de Trabalho (IT) nº 9046 “Identificação de bactérias e de fungos através do sistema VITEK MS (BioMérieux)” .....</b>	<b>243</b>
<b>APÊNDICE G – Instrução de Trabalho (IT) nº 9083 “Identificação de bactérias e de fungos isolados na rotina a partir do kit MICROSEQ (Life Technologies)” .....</b>	<b>250</b>
<b>APÊNDICE H – Relatório de investigação de Fontes de Contaminação utilizando o Banco de Dados, a Bacterioteca e atécnica de PFGE.....</b>	<b>256</b>
<b>APÊNDICE I – Relatório cepas autóctones .....</b>	<b>257</b>
<b>APÊNDICE J – Ficha catálogo <i>Micrococcus luteus</i> .....</b>	<b>267</b>

<b>APÊNDICE K – Ficha catálogo <i>Streptomyces</i> spp.</b> .....	<b>269</b>
<b>APÊNDICE L – Instrução de Trabalho (IT) n° 9081 para investigação de origens de contaminação utilizando a técnica de PFGE</b> .....	<b>271</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS DE SAÚDE

A obtenção de produtos de saúde que apresentem qualidade e segurança associadas é uma preocupação não só da Vigilância Sanitária, mas de diversos setores da sociedade. Com a constante industrialização e a incorporação de tecnologias ao processo produtivo, a necessidade de programas e políticas de garantia e controle da qualidade se mostraram imperiosas. A definição de parâmetros e limites auxilia a avaliação da qualidade associada ao produto final, não sendo suficiente, no entanto, para garantir/avaliar a eficiência e a segurança de toda cadeia produtiva (PINTO *et al.*, 2010).

O conjunto de ações regulatórias denominadas Boas Práticas de Fabricação (BPF), juntamente com o controle estatístico, a engenharia e as ferramentas de qualidade, permitiu a elaboração do conceito de Controle Total de Qualidade (ISHIKAWA, 1985), onde cada etapa e/ou segmento do processo de fabricação deve ser otimizado e monitorado para a obtenção de um produto adequado. Este conceito de qualidade foi inicialmente idealizado para a indústria automobilística. Entretanto, se estendeu para diversas áreas, dentre elas a indústria farmacêutica.

Para auxiliar a implantação dos conceitos de qualidade na rotina de produção e de gestão de produtos farmacêuticos, diversos guias e normas foram elaborados, cada um com critérios e especificações determinados pelo país de origem. Esta pluralidade de níveis de exigência e de metodologias analíticas ocasionou entraves ao comércio internacional, sendo necessária a harmonização destas normas, em especial as farmacopeias. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é o órgão responsável pela elaboração de normas e regulamentos relacionados à indústria farmacêutica. Como outras agências reguladoras, a Anvisa é uma forma mais técnica e menos política de administração pública. Esta agência, sendo uma autarquia

sob regime especial, possui autonomia jurídica (competência regulatória) e poderes de intervenção do domínio econômico (poder de polícia) (CARVALHO *et al.*, 2004). A Vigilância Sanitária é uma das áreas do Sistema Único de Saúde (SUS) e tem suas ações definidas pelos artigos 15 a 18 da Lei 8080/90. O artigo sexto da mesma lei define a Vigilância Sanitária como “conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde...” (BRASIL, 1990). A atuação da Vigilância Sanitária, em geral, consiste em zelar pela saúde e melhorar a qualidade de vida da população como um todo.

## 1.2 PRODUÇÃO DE IMUNOBIOLOGICOS POR BIO-MANGUINHOS

Dentre as diversas ações do Estado para promover a saúde pública da população brasileira, uma das mais estratégicas é a de produção nacional de medicamentos e imunobiológicos. A Fundação Oswaldo Cruz, através do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), garante a autossuficiência, por exemplo, das vacinas essenciais para o calendário básico de imunização do Ministério da Saúde. O número de vacinas entregues cresce anualmente e, em 2013, foram produzidos mais de 92 milhões de doses. Além das vacinas, foram também produzidos mais de seis milhões de reações para kits de diagnóstico e mais de nove milhões de frascos de biofármacos. Esta produção permite o acesso universal da população à prevenção por imunização e a redução de gastos do Ministério da Saúde (Bio-Manguinhos, 2014).

Assim como todas as indústrias farmacêuticas no Brasil, Bio-Manguinhos também deve ter suas ações balizadas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa nº 17, publicada em 16 de abril de 2010. Esta RDC dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos e estabelece os requisitos mínimos a serem adotados na sua produção.

Pela administração em vias parenterais, os produtos injetáveis (como vacinas e biofármacos produzidos em Bio-Manguinhos) não podem apresentar

vírus, micoplasmas e outras bactérias indesejáveis (WHO, 2012; WHO, 2011). Dessa forma, estes produtos devem ser produzidos em ambientes onde a construção, a instalação e a operação garantam condições ambientais que diminuam a introdução, a geração e a retenção de contaminação no seu interior, sendo estes ambientes denominados “áreas controladas” ou “salas limpas” (BRASIL, 2010). De acordo com a criticidade da etapa de produção envolvida, as áreas controladas são classificadas em diferentes graus (A, B, C e D) e podem apresentar ou não microbiota associada, e que deverão ser monitoradas constantemente (BRASIL, 2010). Em áreas grau A, ocorrem as etapas produtivas de alto risco de contaminação do produto. Estas áreas são circundadas por áreas grau B (em produções de alto risco de contaminação do produto) ou por graus C e D (áreas menos críticas, áreas onde não há exposição do produto ou áreas cujas etapas ocorrem em isolador). Todos os riscos associados ao processo devem ser conhecidos e minimizados.

### 1.3 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO NA INDÚSTRIA DE IMUNOBIOLOGICOS

Dentre os riscos associados ao processo de produção de medicamentos e imunobiológicos, a contaminação microbiana se apresenta como um perigo em potencial, principalmente nos casos em que o micro-organismo contaminante altera a qualidade do produto e/ou afete a segurança do paciente (COUTO, 2011, AMARAL, 2004, BRASIL, 2010).

Os contaminantes microbianos podem apresentar diversas origens, sendo encontrados em matérias-primas, equipamentos, ambientes, água, operadores e recipientes de embalagem. Dessa forma, há a necessidade do estabelecimento de critérios e limites microbiológicos para a detecção e identificação destes contaminantes a partir de diferentes fontes, onde o Controle Microbiológico desempenha um papel crítico.

A determinação de limites de alerta e de ação mais rigorosos que o limite preconizado pelos regulamentos e normativas representa uma política interna preventiva na detecção de níveis microbianos inadequados e que

apresentem risco de interferência na qualidade do produto (BRASIL, 2010, BRASIL, 2013). Alguns ambientes de produção, como o de produtos parenterais, apresentam áreas que devem ser controladas, com intuito de minimizar o risco de contaminação. Estes ambientes apresentam controle de condições físicas – como pressão das salas, temperatura, umidade – como também de aspectos microbiológicos. Para este último, as unidades de produção devem elaborar um programa de monitoramento ambiental, onde sejam discriminados os locais e a frequência de amostragem, o mapa das instalações que serão monitoradas e as ações que serão realizadas em caso de níveis de alerta e de ação, para que não se ultrapasse os limites preconizados nos regulamentos (BRASIL, 2010, COBO *et al.*, 2006).

A elaboração e a perfeita implantação de um Programa de Monitoramento Ambiental também colaboram com a avaliação dos processos produtivos (BRASIL, 2013). O Programa de Monitoramento Ambiental de Bio-Manguinhos foi elaborado para estabelecer a sistemática das operações de monitoramento ambiental das áreas limpas (monitoramento do ar), dos operadores e das superfícies limpas onde são desenvolvidas atividades de produção e de controle de produtos estéreis, com o objetivo de atender as exigências da Anvisa e da Organização Mundial da Saúde (OMS) para estes produtos. Este programa define níveis intermediários (de alerta e de ação) entre os resultados “satisfatório” e “insatisfatório” para avaliação da qualidade do ambiente de produção. O intuito da utilização destes níveis intermediários é a prevenção de resultados que ultrapassem o nível considerado “insatisfatório” (limite preconizado pela Legislação vigente) constando como um maior risco associado ao lote produzido. Quando os níveis de alerta ou de ação são atingidos, o Programa de Monitoramento Ambiental (PMA) orienta que sejam adotadas medidas de ação e de investigação, para que o risco de contaminação microbiana seja controlado. Ademais, estabelece também critérios de liberação dos produtos, em respeito à condição ambiental durante sua produção (BRASIL, 2013, XAVIER *et al.*, 2013).

#### 1.4 IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES MICROBIANOS

Os micro-organismos encontrados em ambientes de produção, em ingredientes farmacêuticos, na água para uso farmacêutico e em produtos intermediários e finais devem ser identificados para auxiliar as investigações de contaminações de produtos (WHO, 2011, BRASIL, 2013, BRASIL, 2010). A identificação dos micro-organismos é realizada principalmente se houver um número excedente dos mesmos nos níveis de alerta e de ação para os materiais ou ambientes testados. O conhecimento da microbiota circulante na área industrial é uma importante ferramenta para a elaboração de medidas preventivas e corretivas. No Brasil (e em todo o mundo, de maneira geral), dados referentes à microbiota isolada em áreas de produção e controle são escassos, dificultando o aprofundamento neste assunto (XAVIER *et al.*, 2013, SANDLE, 2011, UTESCHER *et al.*, 2007). Sandle (2011) reuniu os poucos estudos nesta área em uma revisão e encontrou mais de 9.000 micro-organismos isolados em diferentes graus de salas limpas. Na produção de vacinas, Utescher e cols. (2007) encontraram os gêneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus* como os mais incidentes no período estudado. Na determinação da contaminação microbiana de sala limpa em outra unidade de produção, Abreu e cols. (2003) observaram a frequência significativa de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. Pereira (2006) observou a grande incidência de estirpes pertencentes ao gênero *Staphylococcus* em amostras de ar obtidas em áreas classificadas de uma indústria farmacêutica. Wu e Liu (2007) relataram a predominância dos gêneros *Staphylococcus*, *Microbacterium* e *Bacillus* em uma unidade de produção de medicamentos. Nos trabalhos publicados nesta área, os gêneros bacterianos apresentam enorme predominância, quando comparados aos fúngicos.

## 1.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE IMUNOBIOLÓGICOS

A identificação bacteriana geralmente é realizada por metodologia convencional ou por sistemas comerciais semi-automatizados ou automatizados, baseados em reações bioquímicas e outros aspectos fenotípicos (CARROLL; WEINSTEIN, 2007).

Na metodologia convencional, descrita em Compêndios, Manuais e Farmacopeias (USP, 2014, FDA, 2014), a identificação bacteriana é realizada por meio de uma série de avaliações da expressão fenotípica, onde são observados aspectos morfológicos (aspecto da colônia nos meios de cultura e observação de características microscópicas morfo-tintoriais, como na Coloração de Gram) e bioquímicos (avaliação da utilização de substratos para estabelecimento do perfil bioquímico), por meio da inoculação de parte da cultura avaliada em uma extensa bateria de tubos de ensaio contendo meios de cultivo (ágar ou caldo), cujo período de incubação varia de 24 a 96 horas, dependendo do tipo de reação/aspecto avaliado.

Os métodos microbiológicos convencionais, recomendados pelas Farmacopeias, apresentam limitações significativas, como crescimento lento de algumas culturas, variação da resposta biológica microbiana, seletividade da cultura aquém do desejado, laboriosa técnica de análise, entre outras. Dessa forma, o tempo e a eficiência dos processos produtivos ficam comprometidos (PINTO *et al.*, 2010).

O uso de métodos microbiológicos rápidos (sistemas comerciais semi-automatizados ou automatizados) é uma tendência mundial (JIMENEZ, 2001), tendo em vista vantagens como a facilidade de execução e a velocidade na obtenção e resultados. Eigner e cols. (2005) relataram que em laboratórios clínicos e de pesquisa houve correspondência de aproximadamente 95% a 97% entre as identificações realizadas por sistemas comerciais e convencionais. Sendo assim, os sistemas comerciais encontram uma ampla aceitação nos laboratórios clínicos como um método confiável para identificação de bactérias.

Mesmo com a utilização mais frequente de metodologias tradicionais, a indústria de alimentos tem um histórico considerável de utilização de métodos rápidos de identificação microbiana (FUNG, 2002). Vários sistemas comerciais baseados em métodos bioquímicos têm sido utilizados, como API® (BioMérieux), VITEK® (BioMérieux), Biolog® e BBL Crystal® (Becton Dickinson).

A indústria farmacêutica também tem adotado sistemas de identificação automatizados, devido ao aumento da quantidade de testes para identificação como reflexo da maior rigidez nas exigências regulatórias e à necessidade de atualizações de taxonomia e nomenclatura (PINTO *et al.*, 2010). A maioria destes testes, entretanto, exige a realização prévia de um esfregaço do cultivo bacteriano corado pela técnica de Gram, para a escolha do tipo de kit a ser utilizado na identificação, de acordo com as características morfo-tintoriais do micro-organismo a ser analisado. Este pode ser um aspecto desfavorável à identificação, uma vez que micro-organismos ambientais podem se apresentar Gram-variáveis. A técnica do KOH tem sido utilizada como opção ao uso da coloração de Gram ou como teste confirmatório. Esta técnica consiste na adição, em uma lâmina de vidro, de uma gota de solução de KOH a 3% a um cultivo bacteriano. A formação de um “fio viscoso” caracteriza uma cultura de bactéria Gram negativas, enquanto a ausência deste se relaciona à bactérias Gram positivas (BUCK, 1982).

Os métodos de identificação devem ser selecionados de acordo com as exigências que buscam atender (CUNDELL, 2006). Na indústria de alimentos, a identificação de micro-organismos contaminantes geralmente é satisfatória em nível de espécie, podendo ser até em grupos indicadores, como no caso dos coliformes. Entretanto, a diferenciação de estirpes taxonomicamente distintas mas com as mesmas características fisiológicas apresenta limitação com os métodos fenotípicos utilizados na rotina (PAVLOVIC *et al.*, 2013). Com relação à identificação de micro-organismos provenientes de insumos farmacêuticos, produtos intermediários e finais e de áreas limpas, as metodologias convencionais não concluem a identificação de várias espécies bacterianas que podem estar presentes como contaminantes (ROCHA, 2006, BAILO, 2007). Estas espécies muitas vezes são de origem ambiental e, devido à diversidade destas, nem sempre são identificadas por testes convencionais, bem como pelos sistemas comerciais, uma vez que não existem para estes o

perfil metabólico no banco de dados destes sistemas e/ou conjunto de substratos capazes de discriminar as espécies em questão. Alguns estudos (SUTTON; CUNDELL, 2004, CUNDELL, 2006) mostram a demanda da aplicação de metodologias moleculares para que seja realizada uma análise capaz de discriminar as espécies bacterianas, promovendo assim investigações mais eficazes dos contaminantes de produtos e ambientes farmacêuticos, com o objetivo de identificar sua origem e determinar ações preventivas na indústria.

As Farmacopeias Americana (*The United States Pharmacopeia*, ou USP) e Europeia (*European Pharmacopeia*, ou EP) já consideram que métodos alternativos aos convencionais podem ser usados para avaliar a conformidade de produtos com padrões farmacêuticos e devem ser validados. O *Food and Drug Administration* (FDA ) recomenda o uso de métodos genotípicos na investigação e falhas do processamento, devido à maior precisão quando comparados aos métodos bioquímicos e outros fenotípicos (FDA, 2004).

Em relação aos métodos genotípicos, vários pesquisadores sugerem a utilização da análise das sequências do gene 16S rRNA para a identificação bacteriana (DRANCOURT *et al.*, 2000, BOSSHARD *et al.*, 2004, MIGNARD; FLANDROIS, 2006). Esta análise tem sido utilizada por ser universal para bactérias, além de haver disponibilidade de uma grande quantidade de sequências de nucleotídeos deste gene no banco de dados, permitindo assim a comparação das sequências de estirpes desconhecidas. Deste modo, essa tem sido a metodologia de escolha para determinação do gênero bacteriano (CLARRIDGE, 2004, PETTI, 2007), sendo utilizada para a detecção de *Burkholderia cepacia*, um contaminante de matérias-primas e produtos acabados na indústria farmacêutica, apresentando equivalência com os métodos tradicionais de identificação (JIMENEZ *et al.*, 2000). Ademais, essa análise é utilizada também no controle microbiológico de sistemas de águas nas indústrias farmacêutica (KAWAI *et al.*, 2004), petrolífera (BODTKER *et al.*, 2008) e de alimentos (CHAP *et al.*, 2009, ERCOLINI *et al.*, 2009). Um kit comercial de identificação bacteriana rápida baseado na amplificação e no sequenciamento da região do gene 16S rRNA (MicroSeq®, Applied Biosystems) tem sido utilizado tanto na identificação de amostras clínicas

(FONTANA *et al.*, 2005, AROSIO *et al.*, 2008, KIM *et al.*, 2008) quanto na de ambientais (TOKAJIAN; HASHWA, 2004).

Uma alternativa aos métodos genotípicos é a abordagem proteômica, sendo a tecnologia *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS) uma das mais promissoras para a caracterização quimiotaxonômica de micro-organismos. A vantagem mais clara deste método é a velocidade de análise da amostra (LAY JR., 2001), sendo utilizados segundos para o processamento total e a obtenção de resultados. Na indústria farmacêutica e na de alimentos, a avaliação em tempo real (ou a mais rápida possível) ocasiona a diminuição do *holding time* – isto é, o tempo do processo produtivo – de um produto e um maior controle dos riscos associados aos processos produtivos, uma vez que permite ações corretivas imediatas e respalda o processo decisório quanto ao processamento e destino de um lote. A identificação inequívoca de micro-organismos contaminantes permite a prevenção da contaminação recorrente e melhora da higiene associada às plantas produtivas (PAVLOVIC *et al.*, 2013, WHO, 2012, WHO, 2011). Alguns trabalhos já relataram o uso de MALDI-TOF/MS na identificação de patógenos comumente pesquisados no Controle de Qualidade de produtos, como *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. (SPARBIER *et al.*, 2012, DIECKMANN; MALORNY, 2011, BARBUDDHE *et al.*, 2008), assim como sua aplicabilidade na indústria de alimentos, mais especificamente em relação às bactérias ácido-láticas em carne e probióticos em iogurte (ANGELAKIS *et al.*, 2011, NGUYEN *et al.*, 2012).

O pré-requisito dos métodos de identificação abordados – bioquímicos (utilização de substratos), genotípicos e por MALDI-TOF MS – é o crescimento microbiano prévio em uma placa de meio de cultura. Dessa forma, as condições fornecidas em cada cultivo (tipo de meio, tensão de gases, tempo e temperatura de incubação) irão influenciar no metabolismo do organismo cultivado. No caso da análise por MALDI-TOF MS, este é um aspecto crítico na obtenção do resultado. Em uma revisão sobre o uso da técnica de MALDI-TOF MS no estudo de micro-organismos, Lay Jr. relata que alguns pesquisadores podem questionar o conteúdo de informação que pode ser obtido por meio da análise de um perfil de espectros de massas. Entretanto, os dados gerados podem ser considerados, no mínimo, complementares aos

obtidos por meio de outras técnicas de identificação de micro-organismos. Além disso, é uma das poucas abordagens que consegue avaliar, detectar e mensurar modificações (bio)químicas em resposta a estresses ambientais, de tempo de cultivo, de condições nutricionais e tensão de gases, entre outros (LAY JR., 2001). Esta é uma vantagem enorme sobre os métodos genéticos, principalmente sobre a identificação pelo sequenciamento de genes específicos, como o 16S rRNA em bactérias, por exemplo.

Usada na tentativa de identificar bactérias desde os anos 70 (HOLLAND *et al.*, 1996, CLAYDON *et al.*, 1996, ANHALT; FENSELAU, 1975), a espectrometria de massas de biomoléculas tem sido aperfeiçoada (SENG *et al.*, 2009) e atualmente é possível obter não somente o espectro de uma grande biomolécula (como proteínas), mas sim um perfil de espectros de várias moléculas, que pode ser utilizado como um *fingerprinting* do micro-organismo analisado (CARBONNELLE *et al.*, 2011, FENSELAU; DEMIREV, 2001). O uso de uma matriz que permitisse a ionização de proteínas ribossômicas – mais conservadas que as de superfície, por exemplo – permitiu o estabelecimento de perfis de espectros característicos que conduziram à identificação de espécies e subespécies (PAVLOVIC *et al.*, 2013, RYZHOV; FENSELAU, 2001). Muitos trabalhos têm apresentado esta abordagem e o sucesso desta na identificação e na caracterização de bactérias (CARBONNELLI *et al.*, 2011, EL KHECHINE *et al.*, 2011, BIZZINI *et al.*, 2010, LAY JR., 2001), fungos (CASSAGNE *et al.*, 2011, DHIMAN *et al.*, 2011, RODRIGUES *et al.*, 2011, SANTOS *et al.*, 2011) e até de vírus (SUN *et al.*, 2011) na clínica médica e animal. Alguns autores também usaram a técnica de MALDI-TOF MS no estudo de estirpes de origem ambiental (MUNOZ *et al.*, 2011, DIECKMANN *et al.*, 2005).

A técnica de MALDI-TO/MS usada para a identificação de micro-organismos consiste na mistura da cultura a ser identificada com uma matriz polimérica (geralmente CHCA) que absorve luz e permite a ionização das proteínas, por excitação através de um feixe de laser. Em seguida, campos elétricos orientam os íons gerados dentro de um tubo de vácuo, onde ocorre uma separação por massa/carga segundo o tempo de passagem pelo tubo até o detector (Tempo de voo). Cada partícula ionizada gera um pico (ou espectro) e o conjunto de partículas detectadas é convertido em um perfil de espectros.

Por meio de uma base algorítmica, este perfil de espectros é comparado com o perfil de diversas espécies (introduzidas no banco de dados) e interpretado como um resultado de identificação, associado a um nível de confiança. Sendo o proteoma de um organismo resultado do conjunto de proteínas expressas em determinado momento, as condições de cultivo (como tipo de meio de cultura, temperatura e tempo de incubação) devem ser padronizadas, para permitir a reprodutibilidade dos resultados de identificação (PAVLOVIC *et al.*, 2013, RYZHOV; FENSELAU, 2001).

Uma grande desvantagem apontada nesta técnica é o banco de dados (considerado ainda muito limitado) utilizado para a identificação das espécies (PAVLOVIC *et al.*, 2013, CROXATTO *et al.*, 2012, STEENSELS *et al.*, 2011). Em estirpes de origem clínica, este banco de dados está bem consolidado, sendo aperfeiçoado a cada dia, inclusive com a construção de banco de dados complementares (DE CAROLIS *et al.*, 2014, CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL, 2013). Seu uso tem sido considerado como de excelente performance (DENG *et al.*, 2014), inclusive quando comparado aos utilizados rotineiramente na identificação clínica, como o banco de dados dos kits bioquímicos (GUO *et al.*, 2014). Em amostras ambientais, o uso de MALDI-TOF MS pode ser aplicado, mas o banco de dados associado é citado como crítico na identificação dos micro-organismos por vários autores (MUNOZ *et al.*, 2011, WELKER & MOORE, 2011).

A aplicação de métodos analíticos pode ocorrer não só na identificação das estirpes isoladas no controle de qualidade, mas também na investigação das origens de contaminação. De maneira geral, esta investigação é realizada nas indústrias farmacêuticas por profissionais da Garantia da Qualidade, por meio de análise de documentos (como laudos do monitoramento de áreas e de águas, registros de intecorrências nos processos, entre outros).

A caracterização bacteriana molecular é recomendada para a determinação da relação genética das cepas bacterianas para estabelecer um paralelo entre os contaminantes bacterianos provenientes dos produtos fabricados e aqueles encontrados na área de produção ou nas matérias-primas utilizadas, de modo a fornecer evidência de que estes são da mesma fonte (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A Farmacopeia Europeia recomenda a utilização de metodologias moleculares na interpretação do ensaio de

esterilidade (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008). Cundell (2006) também menciona a necessidade da aplicação de metodologias moleculares para auxiliar na investigação da origem dos contaminantes. Este autor recomenda a análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, separados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), como uma das metodologias de tipagem molecular que pode ser utilizada com a finalidade citada.

Para a comparação analítica de micro-organismos envolvidos em um evento de contaminação (um dos desvios da qualidade de um produto e/ou processo), há a necessidade da preservação das estirpes pela indústria farmacêutica, para que as mesmas sejam recuperadas no momento de realização da análise. A construção de coleções de culturas autóctones, obtidas a partir dos ensaios do controle de qualidade e de processo, se apresenta como uma ferramenta de “memória biológica” que pode ser utilizada nas investigações de origem de contaminação por meio de técnicas analíticas.

## 1.6 USO DE COLEÇÕES DE CULTIVO E O ESTUDO DA DIVERSIDADE

Os *guidelines* de BPF do FDA (2004) e, conseqüentemente, a Anvisa, têm recomendado a utilização da microbiota isolada da área de produção para proceder teste de promoção de crescimento nos meios de cultura a serem utilizados nas simulações de processo. As indústrias farmacêuticas necessitam de alguns procedimentos para validar seu processo de enchimento de injetáveis e, portanto, é requerido que sejam realizadas estas simulações (*media fill*), aliadas ao monitoramento ambiental. A escolha do meio de cultura a ser utilizado no *media fill* é um passo importante, pois o mesmo deve suportar o crescimento de uma ampla variedade de micro-organismos. O meio de cultura é desafiado por cepas de referência (geralmente oriundas de coleções como *American Type Culture Collection* - ATCC) e também por padrões secundários, que são as cepas autóctones, também chamadas de *in house*. Para tal, há a necessidade da criação de lotes-semente de cepas autóctones para cada Unidade de Produção.

Na indústria farmacêutica também deve ser considerada a utilização de produtos sanitizantes/desinfetantes em materiais e áreas críticas. Desta forma, a verificação da atividade bactericida desses agentes é indispensável para validar os procedimentos de desinfecção utilizados durante as etapas do processo produtivo. As validações de áreas limpas devem ser realizadas com cepas padrão e também com cepas da microbiota do ambiente (WHO, 2011). Portanto, os métodos para identificação inequívoca dos gêneros bacterianos também se tornam imprescindíveis.

Outra aplicação das cepas autóctones é a de elucidação/investigação de possíveis fontes de contaminação. A comparação detalhada (geralmente genotípica e fenotípica) entre estirpes durante as diferentes etapas de produção, mesmo com intervalo de tempo, pode auxiliar no rastreamento de contaminantes, permitindo a eliminação da causa de contaminação (WHO, 2012).

Apesar da extrema importância que as cepas autóctones têm apresentado dentro dos ambientes industriais, não são encontrados muitos artigos a respeito desta aplicação. Alemán cols. (2004) compararam a performance de cepas selvagens isoladas pelo *Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología* (INHEM – Cuba) de diversas fontes (água para hemodiálise, alimentos, material clínico, água fluvial e água de abastecimento) em relação aos padrões normalmente utilizados (cepas de coleções internacionais, como ATCC) no controle de qualidade dos meios de cultivo utilizados na rotina de análise do Instituto, não observando diferenças nas respostas obtidas entre as estirpes comparadas. Este trabalho foi viabilizado em virtude da manutenção das estirpes autóctones em uma coleção de cultivos própria do INHEM (ALEMÁN *et al.*, 2003).

A proposta da formação de coleções de culturas foi inicialmente apoiada pela necessidade de manutenção das cepas estudadas em um estado fisiológico sem alterações. A conservação de micro-organismos apresenta importância em diversas aplicações, que vão desde o estudo da biodiversidade até o uso biotecnológico. A Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) propôs diretrizes e recomendações para o gerenciamento de centros de recursos biológicos – por meio da elaboração do documento *Best*

*Practice Quidelines for Biological Resource Centres* (OCDE, 2007) – e apoiou a criação da Rede Global de Centros de Recursos Biológicos (GBRCN). As coleções microbiológicas representam uma iniciativa tão importante que foi criada a Federação Mundial de Coleções de Cultura (*World Federation Collection Culture – WFCC*) que busca organizar e centralizar os registros de coleções de cultura em diversos países. Para padronizar a manutenção das coleções foram elaboradas diretrizes básicas no documento *World Federation for Culture Collections Guidelines* que já está na sua 3ª Edição (WFCC, 2010) e a Sociedade Brasileira de Microbiologia elaborou um guia nacional para coleções microbiológicas, harmonizando os princípios estabelecidos por estas duas organizações (SETTE *et al.*, 2007).

## 1.7 RELEVÂNCIA E PERSPECTIVAS

De acordo com o contexto apresentado, a caracterização molecular de bactérias e fungos é indispensável para a conclusão de análises microbiológicas de produtos farmacêuticos e ambientes de produção. Essas novas metodologias permitem a implementação de investigações efetivas da natureza das estirpes na SEPIN/LACOM/DEQUA, segundo exigências normativas e cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF).

As bactérias isoladas de água, monitoramento ambiental, matérias-primas, produtos e insumos oriundas deste trabalho irão constituir uma coleção de bactérias de salas classificadas. Esta Bacterioteca representa uma iniciativa pioneira no Brasil, uma vez que não há registro de outras coleções similares, endossando o papel inovador da Fiocruz na área de Saúde, assim como na de Ciência e Tecnologia.

O uso de métodos rápidos e eficazes, como MALDI-TOF/MS, e a criação de um banco de dados próprio (complementar aos já existentes) com estirpes autóctones terá uma aplicação imediata na rotina de identificação de contaminantes da SEPIN, ajudando na resolução dos atuais problemas relacionados à identificação de bactérias e fungos. Entretanto, a análise correta

e inequívoca dos dados gerados através do uso desta técnica requer um conhecimento sólido em MALDI-TOF e identificações de micro-organismos.

Por fim, a análise destas estirpes permitirá o rastreamento e a determinação de fontes de contaminação de produtos e de pontos do processamento, assim como a obtenção de lotes-semente de cepas autóctones.

## 2 OBJETIVO GERAL

Propor melhorias no processo de identificação de contaminantes da Seção de Esterilidade, Processos e Insumos (SEPIN) – através do estudo da diversidade bacteriana, do desenvolvimento de metodologia de identificação adequada a esta microbiota e da construção de um banco de dados voltado para as necessidades de Bio-Manguinhos – e implementar tais mudanças na rotina.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a efetividade do kit bioquímico utilizado na identificação de contaminantes pela SEPIN (BBL Crystal), quando comparado com os kits VITEK 2 Compact (BioMerieux), MicroSEQ® 500 (Applied Biosystems) e VITEK MS RUO (BioMerieux);
- Estabelecer uma coleção de culturas bacterianas, com as estirpes oriundas de monitoramento ambiental, águas, operadores, matérias-primas, produtos e insumos, envolvidas na produção de imunobiológicos e identificar fenotipicamente as bactérias na rotina da SEPIN/LACOM/DEQUA;
- Determinar a distribuição da população bacteriana circulante nas unidades de produção, assim como estimar a incidência e a prevalência dos gêneros bacterianos envolvidos;
- Criar um banco de dados da coleção de bactérias;
- Obter lotes semente e de trabalho das estirpes na área de produção e implantar a utilização desta microbiota nos testes de promoção de crescimento dos meios de cultivo preparados para *media fill* e teste de esterilidade, segundo recomendação da Anvisa;
- Identificar, por meio da análise das sequências do gene 16S rRNA, uma amostragem de cepas depositadas na bacterioteca (N=52), que

representam contaminantes envolvidos na produção de imunobiológicos, reativos e biofármacos de Bio-Manguinhos, utilizando o kit comercial MicroSEQ® 500 (Applied Biosystems);

- Verificar a possível origem da contaminação dos produtos pelo uso da técnica de PFGE, dando subsídios para a elaboração de medidas corretivas e de melhoria;
- Identificar, através da técnica de MALDI-TOF/MS, as mesmas estirpes bacterianas submetidas ao kit MicroSEQ®500, para posterior comparação de resultados (N=52), utilizando a base de dados SARAMIS (*Spectral ARchive And Microbial Identification System*);
- Criar um Banco de Dados *in house*, a partir dos perfis de espectros de massa das estirpes da Bacterioteca de Bio-Manguinhos identificadas pelo kit MicroSEQ®500;
- Elaborar Instruções de Trabalho referentes as novas técnicas, realizar treinamento da Equipe de Identificação da SEPIN e implementar as melhorias na rotina de identificação.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 OBTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

Neste estudo, foram analisadas estirpes de diversos grupos bacterianos submetidos à caracterização fenotípica pela Seção de Esterilidade, Processos e Insumos (SEPIN) de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.

As estirpes foram oriundas de amostras de monitoramento ambiental, de monitoramentos de águas, de ensaios de validação e de testes de esterilidade, entre outros, no período de janeiro de 2010 a agosto de 2014.

As amostras foram obtidas em placas de Petri com ágar triptona de soja (TSA), em placas RODAC (*Recovered Organism Detection and Counting*), em placas do sistema Milliflex (Merck) com ágar padrão para contagem (PCA) e frascos contendo caldo caseína ou caldo tioglicolato. Todos os meios de cultivo utilizados no presente trabalho eram da marca BioCen e seus lotes foram previamente analisados e liberados pelo controle de qualidade de Bio-Manguinhos, sendo considerados aptos para uso (fertilidade e pureza comprovadas).

#### 3.2 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS DA COLEÇÃO DE CULTURAS (BACTERIOTECA)

A partir de cada amostra recebida pela SEPIN para a identificação de contaminantes, foram selecionadas todas as colônias que apresentasse morfologia de colônia distinta entre si por placa. As estirpes isoladas foram cadastradas em um banco de dados (Programa Excel e arquivo em papel) da bacterioteca, recebendo uma numeração sequencial, precedida da letra “B”. Neste cadastro, dados como lote de produção, data do processo, tipo de

atividade, local, produto envolvido e ponto analisado foram registrados.

### 3.3 REISOLAMENTO

Cada colônia foi reisolada em placas de ágar sangue de carneiro (ASC) a 5% (BioCen) e incubadas em estufa bacteriológica a 30-35°C, no período de 24 horas a 10 dias. Este período variou em função do tempo de crescimento de cada bactéria. As placas foram analisadas diariamente, para verificação do crescimento de colônias bacterianas. Após observação do crescimento, uma colônia isolada de cada placa de ASC foi semeada em uma placa de TSA e incubada em estufa bacteriológica a 30-35°C, no período de 24 horas a 10 dias. A partir do cultivo em TSA, foram realizados os testes de caracterização e/ou identificação das estirpes. Para o presente trabalho, foram isoladas 5.842 bactérias.

### 3.4 CARACTERIZACAO MORFOLÓGICA DAS ESTIRPES

#### 3.4.1 Coloração de Gram

Todas as estirpes isoladas no período de 2010 a 2014 (N=5.842) foram submetidas à Coloração de Gram. O procedimento de preparo de esfregaço em lâmina foi o mesmo para todas as estirpes. O método de coloração, entretanto, foi distinto: em 2010, foi realizado o método manual; e de 2011 a 2014 foi realizada a coloração através do aparelho Slide Ink (marca Hemogram).

#### *3.4.1.1 Preparo dos esfregaços bacterianos em lâmina*

As lâminas foram limpas, desengorduradas e identificadas com lápis dermatográfico. Em seguida, pingou-se um pequeno volume (aproximadamente 0,1 mL de solução salina) sobre a lâmina. Com alça bacteriológica previamente flambada, foi feito um esfregaço com uma pequena quantidade da cultura isolada e deixado sobre bancada para secar. Após secagem, a lâmina foi passada de quatro a seis vezes sobre a chama do bico de Bunsen para que o esfregaço fosse fixado à lâmina.

#### *3.4.1.2 Procedimento de coloração de Gram manual*

Para coloração manual, foi adicionado sobre a lâmina o corante cristal violeta, em volume suficiente para cobrir toda a lâmina, e foi mantido durante um minuto. Em seguida, o cristal violeta foi descartado e a lâmina foi lavada em água corrente. Foi adicionada a solução de iodo-iodetado (Lugol), em volume suficiente para cobrir toda a lâmina, sendo mantida por um minuto. Ao término deste período, a lâmina foi lavada em água corrente. Foi depositado o descolorante álcool-acetona pelo período de 30 segundos, sendo lavada com água corrente ao final deste período. Por último, a lâmina foi coberta pelo corante safranina por 30 segundos e lavada em água corrente.

#### *3.4.1.3 Procedimento de coloração de Gram utilizando o aparelho Slide Ink (Hemogram)*

Para a coloração automática, as lâminas foram posicionadas com a face voltada para o lado esquerdo do operador na espiral de locomoção do equipamento. A mesa de coloração controlou o tempo e a saída dos reagentes

em cada etapa do processo. Após a passagem das lâminas pela mesa de coloração, essas foram armazenadas no depósito do aparelho, onde foram recolhidas ao fim do procedimento.

#### 3.4.1.4 *Leitura das lâminas coradas*

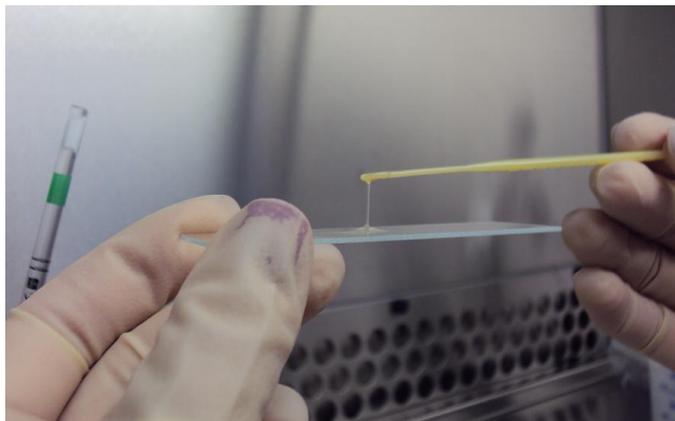
Após secagem das lâminas, foi adicionada uma gota do óleo de imersão (Isofar) e, em seguida, realizada leitura com o auxílio de microscópio óptico na objetiva de 100 (aumento de 1000X), por imersão. Foram observadas as características morfo-tintoriais de cada cultura. As células coradas em roxo foram consideradas como pertencentes ao grupo Gram positivo e as coradas em vermelho, Gram negativo. Nas células onde não houve definição destas colorações (nem roxo, nem vermelho), o resultado foi considerado inconclusivo. Foram observados o formato celular (coco, bastonete e cocobacilo) e o arranjo (pares, tétrades, cachos, cadeias, entre outros).

#### 3.4.2 Teste de KOH a 3%

No período de 2010 a 2012, todas as estirpes foram submetidas ao teste de KOH a 3% para confirmação do resultado do Gram.

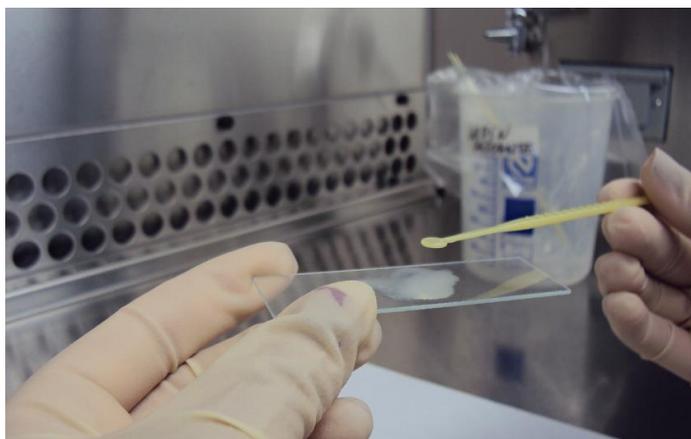
Uma quantidade visível da cultura em placa de TSA foi transferida com a alça bacteriológica previamente flambada para uma lâmina de vidro limpa e seca. Com o auxílio de uma pipeta de um mL estéril, uma gota da solução de hidróxido de potássio (KOH) a 3% foi depositada sobre a lâmina. Movimentos circulares foram realizados para homogeneizar a mistura (cultura/KOH) continuamente, até o período máximo de 60 segundos. Nas lâminas onde foi evidenciada a formação de “fio” viscoso em menos de 60 segundos, a reação foi considerada positiva (KOH positivo) e a bactéria considerada Gram negativa (Figura 1).

Figura 1 - Resultado positivo para Teste do KOH a 3%, com a formação de fio viscoso



Nos casos das estirpes em que não ocorreu a presença de viscosidade (ausência de “fio”) pelo mesmo período, o resultado foi considerado negativo e a bactéria testada, Gram positiva (Figura 2).

Figura 2 - Resultado negativo para Teste do KOH a 3%, com ausência de fio viscoso



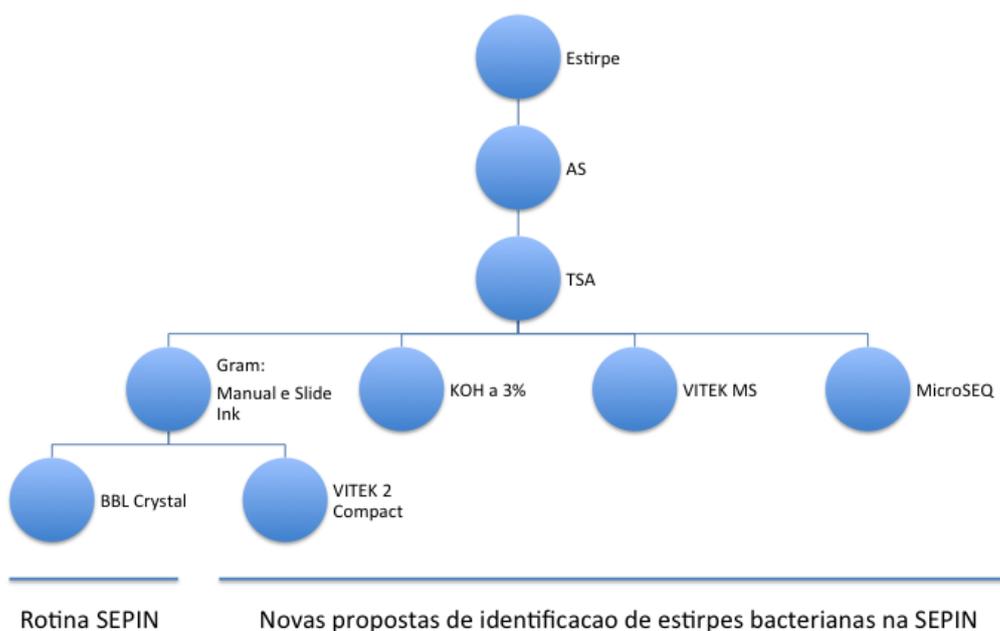
### 3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES

Esta etapa foi realizada na Seção de Esterilidade, Processos e Insumos (SEPIN) de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.

As 5.842 estirpes isoladas e criopreservadas foram submetidas a pelo menos um dos métodos de identificação utilizados no presente trabalho (Figura 3). A identificação bioquímica foi realizada através do kit comercial BBL Crystal®, método fenotípico bioquímico (Becton, Dickinson and Company) de janeiro de 2010 a dezembro de 2011. A partir de janeiro de 2012, pelo kit VITEK 2 Compact, método fenotípico bioquímico (BioMeriéux) e pelos sistemas VITEK 2 Compact e/ou VITEK MS RUO, método fenotípico proteômico (BioMeriéux). Este último sistema foi introduzido a partir de janeiro de 2013.

Foram utilizadas 52 estirpes (identificadas pelo Kit MicroSEQ, método genotípico) para realizar uma comparação entre os três métodos fenotípicos utilizados (BBL Crystal, VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO).

Figura 3 - Esquema sequencial referente aos procedimentos empregados na identificação de bactérias isoladas pelo Controle de Qualidade



### 3.5.1 Identificação pelo Kit BBL Crystal®

A partir do resultado do Gram e do KOH, as culturas foram direcionadas para o kit de identificação correspondente (GN para estirpes Gram negativo e GP para estirpes Gram positivo). Para cada estirpe, foi realizada uma suspensão bacteriana na turvação 0,5 na escala de MacFarland, utilizando o diluente do kit. Esta suspensão foi vertida em uma canaleta e distribuída em 30 poços. Em seguida, foi acoplado o painel do kit correspondente, com os substratos desidratados. Os kits foram incubados em estufa bacteriológica de 30 a 35°C por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura do kit através de leitora e os resultados obtidos foram analisados pelo *software* correspondente (BBL Crystal).

### 4.5.2 Identificação pelo sistema VITEK 2 Compact®

A partir da placa de TSA com a cultura de cada estirpe, foi preparada uma suspensão bacteriana em um tubo de acrílico contendo três mL de solução salina estéril a 0,85% (Air Life™ Sodium Chloride Inhalation Solution – Care Fusion). De acordo com o observado ao Gram para cada estirpe, as suspensões foram preparadas nas faixas preconizadas para cada grupo (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos bacterianos ao Gram e faixa de turvação da suspensão correspondente

<b>Resultado do Gram</b>	<b>Faixa de turvação</b>
Bastonete Gram positivo produtor de esporo (cartão BCL)	1,8 a 2,20
Bastonete ou Coco Gram positivo não produtor de esporo (cartão GP)	0,5 a 0,63
Bastonete ou Coco Gram negativo (cartão GN)	0,5 a 0,63

Cada tubo com a suspensão preparada foi colocado em uma das dez posições disponíveis em um cassete plástico e uma lista foi elaborada, com a posição das estirpes em cada cassete, discriminando o número da estirpe, o número do cassete e o tipo de classificação segundo o Gram. De acordo com a ordem da lista das estirpes, foi colocado o cartão correspondente (BCL, GP ou GN) na posição de cada tubo de acrílico com a suspensão preparada, conforme o Quadro 2. O capilar acoplado ao cartão foi introduzido no tubo de acrílico correspondente.

Quadro 2 - Tipo de cartão do VITEK 2 Compact de acordo com o resultado do Gram

Resultado do Gram	Tipo de cartão VITEK 2
Bastonete Gram positivo produtor de esporo	BCL
Bastonete ou Coco Gram positivo não produtor de esporo	GP
Bastonete ou Coco Gram negativo	GN

Cada cassete preenchido (com os tubos de suspensão e os respectivos cartões) foi introduzido no equipamento (câmara de vácuo e câmara de carregamento) e a partir deste ponto o processamento foi realizado exclusivamente pelo aparelho VITEK 2 Compact. A partir das listas geradas, foi realizado o cadastro das amostras no computador, através do *software* "VITEK 2 SYSTEM". Após o período de incubação (variável para cada estirpe analisado, podendo chegar a 24 horas), os resultados foram obtidos através do mesmo *software*.

### 3.5.3 Identificação pelo sistema VITEK MS RUO®

As estirpes submetidas ao sistema VITEK MS RUO foram cadastradas como amostras no sistema, utilizando o *software* SARAMIS TargetManager

(database version 1.12 e system version 3.5.1.3; 2010).

A partir da placa de TSA com a cultura de cada estirpe, foi transferida uma porção da cultura, com o auxílio de uma alça descartável, para um dos poços (*spot*) de uma lâmina (*slide*) do modelo Flexi-Mass-DS TO-430 (BioMérieux). Foi realizado um esfregão deste cultivo, utilizando toda a área do *spot*. Em seguida, foi aplicada, com auxílio de micropipeta calibrada, um  $\mu\text{L}$  de solução matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (VITEK MS-CHCA, BioMérieux). Nos *spots* da posição G3 e G4 de cada *slide* utilizado, foram realizados esfregaços a partir de cultivos em placas de ASC (35°C, por 24 horas) da cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 (cepa utilizada no controle de qualidade da análise e como calibrador), que também foram cobertos com um  $\mu\text{L}$  de solução matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA).

Após a cristalização da matriz, os *slides* foram introduzidos no equipamento VITEK MS RUO (MALDI-TOF/MS, modelo AXIMA, Kratos/Shimadzu), equipado com um laser de nitrogênio que opera a 337 nanômetros (nm) e utilizando o *software* Launchpad versão 2.9.3, 2011. Os espectros foram adquiridos em modo positivo linear, com uma voltagem de aceleração de + 20 kV, em uma faixa de massas de 2.000 a 20.000 (m/z). Os resultados obtidos foram analisados pelo *software* SARAMIS Premium (Database version 4.10 e System version 4.0.0.4, 2010).

#### 3.5.4 Identificação pelo kit MicroSEQ® 500

Esta etapa foi desenvolvida na Seção de Identificação Bacteriana do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ.

Um total de 52 cepas depositadas na Coleção foram submetidas, além da caracterização fenotípica, à identificação genotípica, utilizando o kit MicroSEQ® 500 (Applied Biosystems). Estas cepas foram selecionadas no ano de 2010, de cinco das principais áreas de produção de Bio-Manguinhos.

#### 3.5.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada com Kit (INVITROGEN ou PrepMan Ultra®) de acordo com as instruções do fabricante.

A partir do cultivo de cada estirpe em placas de TSA, foi transferida uma pequena porção, com uso de alça bacteriológica descartável estéril, para um tubo plástico estéril contendo 100 µL de reagente PrepMan Ultra. Esta suspensão (denominada “DNA BRUTO”) foi colocada no agitador de tubos (Vortex) rapidamente (de 5 a 10 s) e deixada por 10 min a 100 °C em banho seco. Em seguida, foi centrifugada por três minutos a 13.000-14.000 G/temperatura ambiente em mini centrifuga. Foi transferida uma alíquota de 5 µL de cada amostra (sobrenadante) para outro tubo plástico com 495 µL de água estéril (*Nuclease-Free Water*) para obtenção de uma diluição 1:100 (denominado “DNA PRONTO PARA USO”). Os dois frascos de cada amostra foram armazenados em freezer a -20°C, até o momento de uso.

#### 3.5.4.2 Amplificação de regiões específicas pela reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A amplificação da região do DNA referente ao gene 16S rRNA foi realizada com Kit MicroSEQ® 500, de acordo com as instruções do fabricante.

A partir do tubo denominado “DNA PRONTO PARA USO”, foi transferida uma alíquota de 15 µL de cada amostra para um tubo plástico contendo 15 µL do reagente para PCR *MasterMix* (Kit MicroSEQ 500 PCR). O preparo foi realizado na seguinte ordem: CONTROLE NEGATIVO (água isenta de DNA), CONTROLE POSITIVO (fornecido pelo kit MicroSEQ 500, sendo DNA de *E. coli*), AMOSTRAS (na ordem numérica). A mistura foi homogeneizada com uso de micropipeta, obtendo um volume final de 30 µL por amostra. Os tubos foram colocados no aparelho termociclador (Life Technologies) e as condições de reação (Quadro 3) foram inseridas no *software* do aparelho.

Quadro 3 - Condições de tempo, temperatura e número de ciclos utilizadas na reação de amplificação

<b>Pre-desnaturação</b>	95 °C/10 segundos	
<b>Ciclos (30)</b>	<b>Desnaturação</b>	95 °C/30 segundos
	<b>Hibridização</b>	60 °C/30 segundos
	<b>Extensão</b>	72 °C/45 segundos
<b>Extensão final</b>	72 °C/1 minuto	
<b>Término da reação</b>	4 °C/∞	

Ao final da reação, foi realizado o procedimento de purificação do material amplificado (amplicon). Para isso, foram transferidos cinco  $\mu\text{L}$  de cada amostra para dois tubos plásticos contendo dois  $\mu\text{L}$  da enzima EXO-SAP (Exonuclease 1 + Fosfatase Alcalina, Life Technologies) em cada um. Um tubo foi denominado FOWARD (FF) e o outro, REVERSE (R). Para cada tubo, o volume final foi de sete  $\mu\text{L}$ . Os tubos foram colocados em aparelho termociclador a 37 °C por 15 min e depois a 80 °C por mais 15 min para inativar a enzima.

#### 3.5.4.3 Determinação das Sequências Nucleotídicas (Sequenciamento)

A reação de sequenciamento do material amplificado foi realizada com Kit MicroSEQ® 500, de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 13  $\mu\text{L}$  do reagente de sequenciamento FF (do kit MicroSEQ® 500 sequencing) no tubo denominado FF e 13  $\mu\text{L}$  do reagente de sequenciamento R (do kit MicroSEQ® 500 sequencing) no tubo denominado R. Ao final, cada tubo apresentou volume de 20  $\mu\text{L}$  (FF e R). Os tubos foram colocados no aparelho termociclador e as condições de reação (Quadro 4) foram inseridas no *software* do aparelho.

Quadro 4 - Condições de tempo, temperatura e número de ciclos utilizadas na reação de sequenciamento

<b>Pre-desnaturação</b>	96 °C/1 minuto	
<b>Ciclos (25)</b>	<b>Desnaturação</b>	96 °C/10 segundos
	<b>Hibridização</b>	50 °C/5 segundos
	<b>Extensão</b>	60 °C/1 minuto e 15 segundos
<b>Término da reação</b>	4 °C/∞	

Ao final da reação, foi realizado o procedimento de purificação do material sequenciado. Para isso, foram transferidos 20 µL do produto de sequenciamento para tubos contendo a coluna de purificação (“Cartucho para limpeza MICROSEQ ID”, Life Technologies). Os tubos foram centrifugados por cinco min a 3.000 rpm e a coluna (após centrifugação) foi descartada. O volume centrifugado (20 µL) foi transferido para um dos poços de uma placa de 96 poços, observando a ordem de colocada das amostras: Controle Positivo/Controle negativo/Amostras (primeiro o FF e depois o R). Os poços vazios foram preenchidos com água estéril. A placa pronta foi enviada para leitura do sequenciamento no equipamento ABI PRISM 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems-Perkin Elmer Co) pertencente à Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA (PDTIS/FIOCRUZ). As sequências nucleotídicas obtidas foram formatadas no modelo FASTA, editadas e analisadas utilizando os programas CHROMAS, BioEdit, MEGA 4. As sequências foram comparadas àquelas depositadas no banco de sequências GeneBank e Ribosomal DataBase Project (RDP-II).

### 3.6 PRESERVAÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS DA COLEÇÃO DE CULTURAS (BACTERIOTECA)

Cada estirpe cadastrada (N=5.842) foi criopreservada a -80 °C em *skim milk* (Difco) contendo 20% (V/V) de glicerol (SMG). Para isso, foram confeccionadas etiquetas com o número das cepas da Bacterioteca e a data da criopreservação. Foram preparados criotubos estéreis contendo um µL de

SMG, previamente identificados, no dia do procedimento de criopreservação. A partir de cada placa de TSA, foi transferida uma alíquota do crescimento para o criotubo correspondente, com o auxílio de uma alça bacteriológica de platina. Os criotubos foram armazenados em caixas, em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7 ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO GENOMA DE ESTIRPES UTILIZANDO ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

As 11 estirpes selecionadas para avaliação desta técnica como ferramenta de investigação das fontes de contaminação (selecionadas a partir da análise do banco de dados em Excel na investigação de um evento de contaminação) foram semeadas em placas de TSA e incubadas em estufa bacteriológica a  $30-35^{\circ}\text{C}$  por dois dias. A partir de cada placa, uma colônia isolada foi repicada em caldo caseína (BioCen) e incubada a  $30-35^{\circ}\text{C}$  por até 24 horas. O DNA cromossômico foi preparado pela técnica *in situ*, em blocos de agarose (Figura 4).

Figura 4 - Esquema ilustrando as etapas da técnica de PFGE



Uma alíquota de dois mL do crescimento bacteriano em fase exponencial foi centrifugada e as células obtidas foram suspensas em 500 µL de salina estéril. Foi adicionada a suspensão de células, 500 µL de agarose (*low melting*, FMC) a 2% em tampão PIV (NaCl 1M; TRIS-HCl 10mM pH 7,6) a 50 °C. A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos contendo 4 mL de solução de lise (NaCl 1 M; TRIS-HCl 6 mM pH 7,6; EDTA 100 mM pH 8,0; BRIJ-58 0,5 %; desoxicolato 0,2 %; sarcosina 0,5 % e lisozima 1 mg/mL) e incubados a 37 °C. Em seguida, o tampão de lise foi substituído pelo tampão ESP (EDTA 0,5 M pH 8,0; sarcosina 1 %) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (Sigma) e os blocos incubados por 24 horas a 50 °C. Os blocos foram lavados 4 vezes com tampão TE pH 8,0 a 37 °C e então incubados com 30 UI da enzima de restrição *Xba* I durante 24 h a 37 °C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose a 1% preparado em tampão TBE pH 8,3 através da eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, USA). As condições da eletroforese de campo pulsado foram determinadas para o gênero analisado de acordo com o protocolo do PulseNet (RIBOT *et al.*, 2006). O padrão de peso molecular utilizado foi *Lambda ladder* (New England). Após a eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), observados e fotografados no Image Master VDS (Pharmacia Biotech). A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico separados em gel de agarose por eletroforese de campo pulsado foi realizada de acordo as recomendações de Tenover e cols. (1995).

### 3.8 SELEÇÃO DE ESTIRPES DA BACTERIOTECA PARA O PREPARO DOS LOTES DE TRABALHO (PADRÕES SECUNDÁRIOS) E IMPLANTAÇÃO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DOS MEIOS DE CULTIVO

Esta etapa foi realizada na Seção de Esterilidade, Processos e Insumos (SEPIN) de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.

Para a produção de lotes-trabalho de cepas autóctones, foram utilizados os micro-organismos com maior incidência no monitoramento ambiental de Bio-Manguinhos (Figura 5), em acordo com as normas nacionais e internacionais de Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Figura 5 - Esquema ilustrando etapas para o preparo de lotes de trabalho de cepas autóctones a serem utilizadas como padrões secundários pelo Controle de Qualidade



Doze bactérias foram selecionadas da Coleção de Culturas de Bio-Manguinhos, desenvolvida no presente trabalho, como cepas candidatas a serem utilizadas como padrões secundários. As estirpes bacterianas foram caracterizadas fenotipicamente através de observação morfo-tintorial (Gram), teste de KOH e identificadas através do kit comercial BBL Crystal (Becton, Dickinson and Co). Para a identificação genotípica, foi utilizado o kit MicroSEQ® 500 16S rDNA Bacterial Identification (Applied Biosystems).

Foram preparadas suspensões dos micro-organismos candidatos a serem utilizados como padrão secundário ou lotes de trabalho em SMG. Estas suspensões foram distribuídas em 50 alíquotas e então armazenadas à temperatura de -80 °C. O procedimento de preparo de lote de trabalho foi realizado conforme a Instrução de Trabalho da SEPIN.

As estirpes candidatas foram testadas previamente nos meios de cultivos usualmente utilizados por Bio-Manguinhos no monitoramento ambiental e na simulação de envase, antes de serem introduzidas na rotina da promoção de crescimento (teste que consiste na avaliação da viabilidade dos meios de cultivo). O crescimento microbiano foi considerado satisfatório quando foi observada a turvação dos meios desafiados, assim como o crescimento dentro da faixa preconizada (10 a 100 UFC). As estirpes autóctones consideradas aptas foram inseridas no teste de promoção de crescimento em meios de cultura líquidos utilizados em simulações de envase (*media fill*), no teste de esterilidade bacteriana e nos meios sólidos utilizados nas atividades de monitoramento e de identificação de contaminantes.

### 3.9 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES (PREVIAMENTE IDENTIFICADAS PELO MICROSEQ) PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF/MS E CRIAÇÃO DE UM BANCO DE ESPECTROS PRÓPRIO COM O USO DE ESTIRPES AUTÓCTONES

Esta etapa foi desenvolvida na Universidade do Minho, em Portugal, e na SEPIN/Bio-Manguinhos.

Foram analisadas as 52 cepas bacterianas autóctones previamente identificadas pelo kit MicroSEQ® 500 para a construção do banco de dados (BD) *in house* e as estirpes bacterianas na rotina de identificação de contaminantes da SEPIN durante os anos de 2013 e 2014 que foram submetidas a identificação pelo VITEK MS RUO.

As estirpes da rotina (de 2013 e 2014) foram submetidas a identificação pelo VITEK MS RUO e as que apresentaram resultado inconclusivo ou com um baixo nível de confiança tiveram seus perfis de espectros analisados e armazenados na base de dados, na pasta “Não identificados”.

Para a construção dos SuperSpectras (modelos de perfis de espectros, utilizados como referências de identificação por comparação) autóctones, foram utilizados os perfis de espectros de massa obtidos a partir da cada estirpe identificado pelo MicroSEQ 500 (N=52). Para a obtenção destes perfis,

cada estirpe foi semeada em placas de TSA e ASC, sendo as placas incubadas em estufa bacteriológica a 30-35 °C. Cada estirpe foi submetida a análise pelo VITEK MS RUO em oito replicatas (por placa) e em sete períodos de cultivo distintos (24h, 48h, 72h, 5 dias, 7 dias, 8 dias e 10 dias), de forma a obter uma maior variação do perfil de espectros. Dessa forma, cada estirpe apresentou um total de 112 perfis de espectros, que foram triados para a confecção de um dendrograma que norteou a proposta de um espectro de referência para cada estirpe. A partir do dendrograma gerado, foram descartados os perfis de espectros que se encontravam isolados dos demais (considerados *outliers*) e os restantes foram utilizados para a seleção dos principais espectros de massa (“picos”), de acordo com a frequência de detecção. Cada SuperSpectra gerado foi avaliado através da comparação com todo o BD do software SARAMIS (associado ao Sistema VITEK MS RUO e responsável por todas as inferências e comparações) e, caso conforme, foi inserido no Arquivo “Tree do BD/SARAMIS. A estirpe foi novamente submetida ao VITEK MS RUO, para verificação da identificação pelo recém-inserido espectro de referência. Este procedimento foi uma adaptação do preconizado pelo documento *Operating Instructions* (Anagnostec, 2008), com base nos conhecimentos adquiridos com os técnicos da BioMerieux e com os pesquisadores da UMinho.

### 3.10 CONSTRUÇÃO DE CATÁLOGO DE IDENTIFICAÇÃO

Com intuito de registrar a diversidade bacteriana identificada na SEPIN, foi construído um modelo de catálogo (APÊNDICE A), em formato de fichas em tamanho A4, com as seguintes informações: gênero ou espécie, estirpe que foi utilizada na construção da ficha, fotos das culturas em placas de ASC (em um ou dois tempos de cultivo diferentes), descrição da colônia em ASC, fotos das culturas em placas de TSA (em um ou dois tempos de cultivo diferentes), descrição da colônia em TSA, foto da lâmina de Gram, descrição de aspectos morfo-tintoriais ao Gram, resultados bioquímicos pelo VITEK 2 Compact (perfil bioquímico), resultados proteômicos pelo VITEK MS RUO (perfil de espectros de massa), resultados genotípicos pelo MicroSEQ® (sequência no formato

FASTA) e outros dados que possam interessar (locais e fontes de isolamento em Bio-Manguinhos e fontes descritas na literatura, entre outros). Foram utilizadas duas estirpes para a construção de exemplos de fichas do Catálogo.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MELHORIA NO PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NA SEPIN

A identificação de micro-organismos na SEPIN era realizada através do kit bioquímico BBL Crystal (Becton, Dickinson and Co). Este kit apresentava um painel com 29 substratos e um controle positivo para bactérias Gram negativas (kit GN) e outro painel (com o mesmo número de substratos e controle) para Gram positivas (kit GP). Um grande percentual dos resultados obtidos através deste kit era inconclusivo para a identificação: aproximadamente 40% do total de estirpes submetidas a identificação bioquímica (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>). Ademais, a observação das características morfotintoriais das estirpes analisadas também era objeto de grande incerteza na classificação do tipo de parede celular, dificultando a escolha do kit bioquímico (GP ou GN).

A primeira melhoria sugerida para auxiliar a identificação foi a introdução da técnica de hidróxido de potássio a 3% (Teste do KOH), cujo objetivo era dar suporte ao resultado da Coloração de Gram na divisão das bactérias em Gram positiva e Gram negativa (teste confirmatório do Gram).

Esta técnica foi avaliada através da comparação de resultados de 94 cepas (50 Gram positivas e 44 Gram negativas), isoladas na rotina de identificação da SEPIN no ano de 2010 e previamente submetidas ao kit BBL Crystal e a coloração de Gram. Todos os cultivos (tempo de incubação de 24 horas) apresentaram resultados satisfatórios e condizentes com o esperado (Quadro 5).

Quadro 5 - Resultado do teste de KOH a 3% em culturas de 24 horas (n=94)

	<b>Gêneros</b>	<b>Resultado apresentado</b>	<b>Resultado esperado</b>
<b>Gram positivo (n=50)</b>	<i>Staphylococcus</i> spp.; <i>Micrococcus</i> spp.; <i>Kytococcus</i> spp.; <i>Bacillus</i> spp.	Negativo (100%)	Negativo
<b>Gram negativo (n=44)</b>	<i>Acinetobacter</i> spp.; <i>Brevundimonas</i> spp.; <i>Pseudomonas</i> spp.	Positivo (100%)	Positivo

Pelo fato da SEPIN receber placas oriundas do monitoramento ambiental como amostras para a identificação e por estas placas apresentarem cultivos de sete a oito dias, foi proposto um outro estudo para avaliar a variação do resultado do teste de KOH em função do tempo de cultivo (24 h, 48 h, 7 dias, 8 dias e 10 dias), com outras estirpes isoladas em 2010 e identificadas pelo BBL Crystal. Neste novo estudo, envolvendo 204 estirpes (183 caracterizados como Gram positivas e 21 como Gram negativas, pela Coloração de Gram), todas as 183 estirpes caracterizadas como Gram positivas apresentaram resultados negativos para KOH (resultado de acordo com o esperado para este tipo de parede celular) durante todos os cinco tempos de cultivo avaliados (Tabela 1). Das 21 estirpes Gram negativas, uma apresentou resultado diferente do esperado (em todos os tempos avaliados) e outras duas apresentaram resultado positivo para KOH somente nos últimos segundos do teste.

Tabela 1 - Resultado do teste de KOH a 3% em culturas com cinco períodos de incubação distintos (N=204)

Gram	Gênero	Total	24h	48h	7 dias	8 dias	10 dias	Total concordância
BGN (N=21)	<i>Acinetobacter</i>	4	4 P	4 P	4 P	4 P	4 P	100%
	<i>Brevundimonas</i>	4	4 P	4 P	4 P	4 P	4 P	100%
	<i>Burkholderia</i>	1	1 P	1 P	1 P	1 P	1 P	100%
	<i>Providencia</i>	1	1 P	1 P	1 P	1 P	1 P	100%
	<i>Pseudomonas</i>	10	9 P/ 1 N	90%				
	<i>Stenotrophomonas</i>	1	1 P	1 P	1 P	1 P	1 P	100%
BGP (N=12)	<i>Bacillus</i>	3	3 N	3 N	3 N	3 N	3 N	100%
	<i>Brevibacillus</i>	3	3 N	3 N	3 N	3 N	3 N	100%
	<i>Corynebacterium</i>	3	3 N	3 N	3 N	3 N	3 N	100%
	<i>Gardnerella</i>	1	1 N	1 N	1 N	1 N	1 N	100%
	<i>Leifsonia</i>	2	2 N	2 N	2 N	2 N	2 N	100%
CGP (n=171)	<i>Kocuria</i>	2	2 N	2 N	2 N	2 N	2 N	100%
	<i>Kytococcus</i>	11	11 N	100%				
	<i>Micrococcus</i>	65	65 N	100%				
	<i>Rhodococcus</i>	1	1 N	1 N	1 N	1 N	1 N	100%
	<i>Staphylococcus</i>	83	83 N	100%				
	<i>Streptococcus</i>	9	9 N	9 N	9 N	9 N	9 N	100%

P = Resultado positivo para o teste de KOH; N = Resultado negativo para o teste de KOH; n = número de estirpes; BGN = Bastonetes Gram negativos; BGP = Bastonetes Gram positivos; CGP = Cocos Gram positivos

Com base nessas evidências, a técnica do KOH foi introduzida na rotina de identificação da SEPIN, e foi confeccionada uma instrução de trabalho (IT) para a mesma (APÊNDICE B). Foi ministrado treinamento nesta técnica a toda equipe envolvida na identificação, concluindo sua implementação na rotina da SEPIN.

Durante o período de 2010 a 2012, foi realizado o teste de KOH em todas as bactérias submetidas a identificação (incluindo os dois estudos previamente mencionados). Para cocos Gram positivos (CGP), grande maioria da microbiota isolada em Bio-Manguinhos, os resultados deste teste eram condizentes ao preconizado. Este grupo, entretanto, não apresentava dúvidas no resultado da coloração de Gram: em todas as lâminas observadas, a

presença de células bem roxas (coloração esperada para este grupo) foi evidenciada. Dessa forma, a confirmação do resultado do Gram pela técnica de KOH se mostrava desnecessária, sendo abolida para estirpes que fossem caracterizadas como CGP ao Gram. A grande necessidade da confirmação do resultado do Gram era para alguns bastonetes isolados na rotina, que apresentavam coloração lilás (diferente do vermelho ou do roxo esperados), ou que apresentavam na mesma lâmina células coradas de vermelho e de roxo, sendo considerados Gram variáveis. Como o kit bioquímico utilizado na identificação exigia esta classificação prévia, o teste de KOH foi usado somente para confirmar o resultado do Gram em estirpes que apresentassem formato de bastonete. Para uma parte dos bastonetes analisados, entretanto, foi observada inconsistência nos resultados apresentados, como a variação de resposta pela mesma estirpe (ora positivo, ora negativo) e o resultado equivocado (resultado oposto ao esperado para o tipo de parede celular). Dessa forma, a confirmação do resultado do Gram pelo teste de KOH foi abolida em 2012, por não conseguir auxiliar na elucidação destes casos.

A segunda melhoria proposta foi a padronização da confecção de lâminas submetidas a coloração de Gram, através da introdução do aparelho corador de lâminas Slide Ink (marca Hemogram). Este aparelho foi introduzido em 2011 na SEPIN e permitiu a automatização do processo de coloração, eliminando variações de resultados (decorrentes de diferenças de tempo de exposição e de volume dos reagentes do Gram utilizados), diminuindo gastos (menor volume utilizado por lâmina) e aumentando a capacidade de processamento de amostras (maior número de lâminas produzidas em menos tempo). Foi confeccionada uma IT para o processamento das lâminas (APÊNDICE C) e toda a equipe de identificação foi treinada, permitindo a implementação deste procedimento na rotina da SEPIN.

Outra melhoria foi a substituição do kit bioquímico BBL Crystal pelo sistema bioquímico VITEK 2 Compact (BioMerieux), que permitiu: a) maior discriminação entre as estirpes submetidas a identificação pelo aumento do número de substratos avaliados (painéis contendo acima de 50 provas) e pelo maior número de kits específicos para cada grupo (três cartões, sendo GN para bactérias Gram negativas; GP para cocos e bastonetes Gram positivas não formadores de esporos; e BCL para bastonetes Gram positivos formadores de

esporos), b) padronização dos inóculos (uso de densímetro para avaliação das faixas de turvação das suspensões); c) automatização do processo (inoculação dos cartões e leituras automáticas e em diversas vezes durante o tempo de incubação no próprio aparelho) e d) utilização de banco de dados mais atualizado. Uma outra vantagem foi a diminuição do custo por amostra: em 2012, o novo sistema, adquirido através de comodato, permitiu a realização do ensaio de identificação bioquímica por R\$ 37,00, enquanto uma identificação pelo kit BBL Crystal custava R\$ 42,00. Foi elaborada uma IT para este processo de identificação (APÊNDICE D) e a equipe recebeu treinamento. Este sistema foi qualificado (instalação, operação e desempenho) e validado (APÊNDICE E), estando esta atividade totalmente implementada na rotina da SEPIN. Apesar de todas as vantagens apresentadas, esse kit bioquímico (assim como todos os outros similares) depende do resultado da coloração de Gram, que continuou sendo um gargalo na identificação correta dos estirpes, uma vez que espécimes Gram variável estavam presentes na microbiota de Bio-Manguinhos. Outra desvantagem é que este kit (e todos os outros métodos de identificação fenotípicos) está associado a um banco de dados relativamente limitado. Dessa forma, alguns resultados permaneceram inconclusivos, com a ausência de identificação para estirpes cujo perfil bioquímico apresentado no ensaio não estava contemplado na base de dados do VITEK 2 Compact.

Para tentar resolver o problema das estirpes para as quais o resultado do Gram foi inconclusivo ou gerou algum tipo de dúvida, foi proposta mais uma melhoria: o uso de um kit molecular de identificação microbiana (MicroSEQ® 500, Applied Biosystems). Este kit, por realizar a amplificação e o sequenciamento de regiões conservadas e de importância taxonômica, foi proposto de forma a permitir a identificação inequívoca dos estirpes, independente do resultado apresentado na coloração de Gram. O MicroSEQ® apresenta três opções: o MicroSEQ® 500, MicroSEQ® Full gene e MicroSEQ® Fungal. Os dois primeiros são destinados à identificação de bactérias, sendo que o MicroSEQ® 500 utiliza somente o primeiro terço do gene 16S rRNA (aproximadamente 500 pares de base, considerada a porção mais variável) e o MicroSEQ® Full gene utiliza o gene inteiro (aproximadamente 1.500 pares de

base). O terceiro kit (MicroSEQ® Fungal) é destinado à identificação de fungos, tanto filamentosos quanto leveduriformes.

Foram identificadas 52 bactérias isoladas na rotina da SEPIN pelo kit MicroSEQ® 500. Como somente o primeiro terço do gene 16S rRNA foi utilizado para a identificação, os resultados foram tratados somente em nível de gênero. Os resultados dos gêneros bacterianos identificados estão ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos estirpes (N=52) identificados pelo kit MicroSeq

<b>Gênero</b>	<b>Número de estirpes</b>
<i>Acinetobacter</i>	4
<i>Arthrobacter</i>	1
<i>Bacillus</i>	4
<i>Corynebacterium</i>	2
<i>Enhydrobacter</i>	2
<i>Microbacterium</i>	1
<i>Micrococcus</i>	15
<i>Moraxella</i>	2
<i>Paenibacillus</i>	2
<i>Providencia</i>	1
<i>Staphylococcus</i>	16
<i>Streptomyces</i>	1
<i>Terribacillus</i>	1
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>

Foram identificados 13 gêneros distintos (Tabela 2) e, para todas as 52 estirpes submetidas a identificação, o kit foi considerado satisfatório (conseguiu concluir a identificação). As estirpes selecionadas para esta avaliação foram escolhidas com base na morfologia colonial e microscópica. Estes critérios foram estabelecidos de forma a tentar verificar a identidade inequívoca da microbiota mais frequente assim como a adequação do kit as culturas que apresentavam identificação inconclusiva. Na observação das colônias frequentemente isoladas na SEPIN, há predominância das de coloração branca e de amarela, e 35 culturas apresentando colônias com esta cor foram escolhidas. Para representação das estirpes de identificação inconclusiva,

foram escolhidas 17 culturas que apresentavam colônias de aspecto singular (características incomuns, como crescimento fastidioso, coloração laranja ou marrom, etc) ou alguma particularidade ao Gram (coloração inconclusiva, morfologia celular ou arranjo incomuns). Como o kit apresenta o mesmo tratamento para todas as amostras, havia dúvida quanto a capacidade em extrair, amplificar e sequenciar o material genético das culturas tidas como inconclusivas. Esta incerteza era devido a algumas culturas apresentarem colônias com certa rigidez e também forte aderência ao meio de cultivo, sugerindo a presença de uma parede celular de difícil ruptura. Entretanto, o kit foi considerado robusto por apresentar êxito nas três etapas (extração, amplificação e sequenciamento) e conseguir concluir a identificação das estirpes analisadas. Mesmo com a variedade de gêneros submetidos ao kit, o material genético foi extraído e amplificado em todas as estirpes submetidas, diferente do que ocorre geralmente nos diversos protocolos de PCR, quando as alterações das condições de reação (como temperatura e tempo de cada etapa) geralmente são necessárias para a adequação a cada tipo bacteriano analisado. Weber e cols. (2006) reportaram o uso do sistema MicroSEQ na identificação de estirpes ambientais, isoladas no CQ da indústria farmacêutica, e utilizaram como exemplo dois gêneros – um bacteriano e um fúngico – de difícil identificação fenotípica convencional (*Methylobacterium* e *Fusarium*). Estes autores utilizaram mais de 40 estirpes ambientais de *Methylobacterium* spp. identificadas previamente por métodos fenotípicos convencionais e obtiveram a identificação de todas as bactérias em nível de espécie, sendo o primeiro relato de identificação deste gênero em estirpes ambientais da indústria farmacêutica utilizando a análise comparativa de sequências do gene 16S rRNA.

As informações referentes a estas estirpes foram armazenadas e as estirpes foram utilizadas como padrões autóctones para o controle de qualidade de Bio-Manguinhos.

Um aspecto a ressaltar é que o uso de kits comerciais pode ser uma estratégia interessante ao controle de qualidade, uma vez que são padronizados e geralmente associados a procedimentos validáveis (condição diferente da apresentada em protocolos de pesquisa), sendo um ponto favorável na adequação às boas práticas de fabricação. Outra vantagem que

esta proposta de identificação apresentava era a possibilidade de identificação de estirpes fúngicas, até então não realizada pela SEPIN, pela inexistência de metodologia implementada para tal. As desvantagens apresentadas eram o alto custo dos insumos e a necessidade de uma área adequada aos procedimentos de amplificação de DNA. Essas duas desvantagens tornariam o uso do kit MicroSEQ® na rotina de identificação da SEPIN totalmente inviável, em função do grande número de identificações realizadas pela Seção, aproximadamente 350 por mês: como o histórico da Seção apontava um alto número de estirpes não identificados (40%, isto é, por volta de 140 cepas ao mês), seria interessante o armazenamento destas informações de identificação em um banco de dados, de forma que esta porcentagem de resultados inconclusivos diminuísse em função da retenção da informação. O grande desafio seria a utilização de uma metodologia que conseguisse ser realizada independente do resultado do Gram, que identificasse fungos e bactérias e que conseguisse concluir a identificação com um custo sustentável. Pensando nestes aspectos, foi proposta a quinta melhoria na identificação de micro-organismos: o uso da metodologia de MALDI-TOF, através do sistema VITEK MS RUO (BioMérieux), cuja fragilidade apontada para este sistema – o banco de dados associado – seria sanada pela construção de um Banco de Dados *in house* através das informações fornecidas na identificação pelo kit MicroSEQ®. Através de um contrato de aluguel (contemplando aquisição de insumos e manutenção preventiva/corretiva), o sistema VITEK MS RUO foi introduzido na SEPIN em 2012, para avaliação da adequação às necessidades da SEPIN. As Instruções de Trabalho para a identificação pelo MicroSEQ® e pelo VITEK MS RUO foram elaboradas e aprovadas para a rotina da SEPIN (APÊNDICES F e G).

Nos escassos trabalhos acerca de identificação de estirpes ambientais isoladas pelo controle de qualidade da indústria farmacêutica, não há relatos sobre resultados inconclusivos nem sobre falhas na identificação (MARTÍN *et al.*, 2012, PONCE *et al.*, 2011, UTESCHER *et al.*, 2007). Muito provável que isto ocorra para não expor a fragilidade dos sistemas de identificação utilizados nem para explicitar o desacordo com o preconizado por normativas e regulamentos técnicos, nos quais a identificação de espécies é exigida.

#### 4.1.1 Uso do sistema VITEK MS RUO na identificação de estirpes isoladas na rotina da SEPIN

Durante janeiro a dezembro de 2013, foram submetidas à identificação pelo sistema VITEK MS RUO 369 estirpes bacterianas isoladas na rotina do controle de qualidade de Bio-Manguinhos (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados do VITEK MS RUO para 369 estirpes autóctones de Bio-Manguinhos (período de janeiro a dezembro de 2013)

<b>Resultado VITEK MS RUO (gênero)</b>	<b>Número de estirpes</b>
Não identificado	41
<i>Acinetobacter</i>	1
<i>Bacillus</i>	10
<i>Burkholderia</i>	14
<i>Comamonas</i>	2
<i>Cupriavidus</i>	1
<i>Delftia</i>	2
<i>Enterococcus</i>	31
<i>Escherichia</i>	6
<i>Kocuria</i>	1
<i>Kytococcus</i>	1
<i>Micrococcus</i>	17
<i>Moraxella</i>	2
<i>Paenibacillus</i>	24
<i>Propionibacterium</i>	2
<i>Proteus</i>	7
<i>Pseudomonas</i>	153
<i>Ralstonia</i>	9
<i>Serratia</i>	2
<i>Stenotrophomonas</i>	5
<i>Staphylococcus</i>	38
<b>TOTAL</b>	<b>369</b>

No ano de 2013, a partir de 328 bactérias, foram identificados 20 gêneros utilizando o VITEK MS RUO. O banco de dados utilizado para a

identificação foi o do *software* SARAMIS, associado ao sistema VITEK MS RUO. Não há trabalhos sobre identificação de estirpes isoladas em indústrias farmacêuticas utilizando este sistema. Do total de bactérias avaliadas por este método neste ano (N=369), 41 (11,11%) não foram identificadas, sendo 30 caracterizadas ao Gram como bastonetes Gram positivos (BGP), oito como cocos Gram positivos (CGP) e três como bastonetes Gram negativos (BGN). A baixa porcentagem de ausência de identificação (11,11%) foi um resultado animador quando comparado ao histórico da SEPIN quando era utilizado o kit BBL Crystal, estimada em aproximadamente 40%, de acordo com resultados observados nos laudos analíticos da Seção (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>).

No ano de 2014, durante o período de janeiro a maio de 2014, foram submetidas à identificação pelo sistema VITEK MS RUO, 506 estirpes bacterianas isoladas na rotina do controle de qualidade microbiológico de Bio-Manguinhos (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do VITEK MS RUO para 506 estirpes autóctones de Bio-Manguinhos (período de janeiro a maio de 2014)

<b>Resultado VITEK MS RUO (gênero)</b>	<b>Número de estirpes</b>
Não identificado	156
<i>Acinetobacter</i>	29
<i>Arthrobacter</i>	1
<i>Bacillus</i>	13
<i>Brachybacterium</i>	6
<i>Brevundimonas</i>	3
<i>Burkholderia</i>	29
<i>Comamonas</i>	2
<i>Cronobacter</i>	1
<i>Cupriavidus</i>	10
<i>Delftia</i>	2
<i>Dermobacter</i>	1
<i>Enterobacter</i>	4
<i>Enterococcus</i>	5
<i>Escherichia</i>	3
<i>Herbaspirillum</i>	1
<i>Klebsiella</i>	6
<i>Kocuria</i>	7
<i>Kytococcus</i>	5
<i>Methylobacterium</i>	1
<i>Microbacterium</i>	6
<i>Micrococcus</i>	24
<i>Moraxella</i>	5
<i>Ochrobactrum</i>	1
<i>Paenibacillus</i>	11
<i>Propionibacterium</i>	2
<i>Proteus</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	24
<i>Ralstonia</i>	22
<i>Serratia</i>	3
<i>Sphingobacterium</i>	7
<i>Sphingomonas</i>	2
<i>Stenotrophomonas</i>	16
<i>Staphylococcus</i>	95
<i>Streptococcus</i>	1
<i>Variovorax</i>	1
<b>TOTAL</b>	<b>506</b>

Em 2014, foram identificados 35 gêneros distintos, a partir de 350 culturas (69,17%). Das 506 estirpes submetidas, 156 (30,83%) não foram identificadas pelo VITEK MS RUO. Na avaliação dos aspectos morfo-tintoriais das culturas não identificadas, foi observado que a maioria (98 culturas, representando 62,82% dos resultados não identificados) apresentava-se como

bastonetes e cocobacilos Gram positivos. Este resultado foi similar ao obtido na avaliação das 369 estirpes isoladas em 2013, quando 30 (73, 17%) das 41 culturas não identificadas – isto é, a maioria – se apresentavam como BGP. A partir desta observação, presumiu-se que a análise pelo MALDI-TOF MS não seria uma boa ferramenta de identificação para este grupo morfo-tintorial bacteriano. Entretanto, Navas e cols. (2014) realizaram um estudo com 206 estirpes clínicas de Bastonetes Gram positivos para avaliar a performance do sistema VITEK MS para este grupo e encontraram quase 85% de concordância de resultados com os métodos de referência (bioquímica ou sequenciamento dos genes 16S rRNA e rpoB). Os 15,1% restantes foram resultados equivocados (7,3%) e não identificados (7,8%). Outro estudo conduzido por Rychert e cols. (2013) também apontou para alta performance de identificação através do sistema VITEK MS para bactérias Gram positivas de origem clínica, em geral. Não foram encontrados trabalhos similares com estirpes isoladas a partir do controle de qualidade na indústria farmacêutica. Essa ausência de informação sobre a performance do VITEK MS em micro-organismos nesse tipo de ambiente dificulta a análise e a interpretação dos resultados obtidos no presente estudo.

Os bastonetes Gram negativos não identificados pelo VITEK MS RUO em 2014 na SEPIN foram representados por 43 estirpes (27,56% do total não identificado). Em relação ao total de estirpes Gram negativas testadas (195), 152 (77,95%) foram identificadas pelo VITEK MS RUO. A alta performance de identificação de bastonetes Gram negativos de origem clínica pelo VITEK MS foi relatada por diversos autores, sendo em geral acima de 90% (MANJI *et al.*, 2014, RICHTER *et al.*, 2013, MARKO *et al.*, 2012).

Em relação às culturas não identificadas no presente estudo, 14 (8,98%) eram cocos Gram positivos. Das 151 estirpes classificadas como CGP, 137 (90,73%) foram identificadas pelo VITEK MS RUO. Este resultado se aproxima um pouco mais dos relatados em trabalhos com estirpes de origem clínica (DEAK *et al.*, 2015, GUO *et al.*, 2014, DUBOIS *et al.*, 2013), utilizando o mesmo sistema.

A identificação de estirpes ambientais é um problema enfrentado em diversas indústrias. De certa forma, este percentual mais baixo de identificações já era um resultado esperado, ao contrário dos excelentes

rendimentos de identificação observados em estirpes de origem clínica (GUO *et al.*, 2014, VAN VEEN *et al.*, 2010, BLONDIAUX *et al.*, 2010, DUPONT *et al.*, 2010).

Em amostras ambientais – como as estirpes obtidas no monitoramento ambiental ou como contaminante de algum produto, por exemplo – a realidade é bem distinta das encontradas na clínica: além das variações oriundas do estresse ambiental, a diversidade microbiana dentro de áreas controladas e de produção ainda não é muito descrita, ocasionando uma grande lacuna entre o estirpe e o identificado. Ademais, cada unidade de produção apresenta uma microbiota autóctone associada, não sendo às vezes possível a comparação entre áreas diferentes (MUNOZ *et al.*, 2011, WELKER; MOORE, 2011).

Entretanto, este primeiro registro da performance do sistema VITEK MS RUO na identificação de estirpes isoladas a partir do controle de qualidade industrial reforçou a necessidade do aperfeiçoamento dos sistemas de identificação para esta proposta, a partir da obtenção de elevada porcentagem (acima de 30%) de resultados inconclusivos obtidos com uma técnica de uso tão satisfatório no diagnóstico microbiológico clínico. Muitas dúvidas surgiram em relação ao porquê da não identificação destas estirpes. Como estas eram oriundas da rotina e não identificadas previamente, seria necessário avaliar a performance do VITEK MS RUO (e de outras metodologias de identificação) com o uso de cepas de identificação conhecidas: dessa forma, o banco de dados associado ao sistema VITEK MS RUO poderia ser avaliado.

#### 4.1.2 Comparação das três metodologias BBL Crystal, VITEK 2 Compact, VITEK MS RUO utilizando cepas de referência da Coleção de Microorganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS)

Foram submetidas 19 cepas bacterianas oriundas da CMRVS aos três sistemas de identificação (BBL Crystal, VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO), conforme o Quadro 6.

Quadro 6 - Comparação da performance das três metodologias BBL Crystal, VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO na identificação de cepas pertencentes a Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS

<b>Cepa/Método</b>	<b>BBL Crystal</b>	<b>VITEK 2 Compact</b>	<b>Identificação VITEK MS RUO (MALDI-TOF)</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 00025 ATCC 15442	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (99,9%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (CT) 00103 ATCC 13637	Não identificado	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99,9%)
<i>Pseudomonas putida</i> ( <i>Pseudomonas ovalis</i> ) 00113 ATCC 15175	Não identificado	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (82,0%)
<i>Paenibacillus polymixa</i> (CT) 00203 LFB/NCTC 10337	Não identificado	<i>Paenibacillus polymixa</i>	Não identificado
<i>Hafnia alvei</i> ( <i>Paracolobactrum aerogenoides</i> ) 00120 ATCC 11604	Não identificado	Baixa discriminação	<i>Hafnia alvei</i> (99,9%)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ( <i>Arthrobacter carbazolum</i> ) 00520 ATCC 31258	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (90,2%)
<i>Morganella morganii</i> 00082 ATCC 8019	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii</i> (92,9%)
<i>Staphylococcus hominis</i> 00359 ATCC 27844	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> (99,9%)
<i>Rhodococcus equi</i> (CT) 00323 CCT 0541	Não identificado	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i> (77,2%)
<i>Brevundimonas diminuta</i> (CT) 00070 ATCC 11568	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i> (99,9%)
<i>Raoultella planticola</i> 00090 ATCC 8329	Não identificado	Não identificado	Não identificado
<i>Streptococcus agalactiae</i> (CT) 00128 ATCC 13813	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (99,9%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 00233 ATCC 15305	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (99,2%)

Continuação Quadro 6 - Comparação da performance das três metodologias BBL Crystal, VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO na identificação de cepas pertencentes a Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS

Cepa/Método	BBL Crystal	VITEK 2 Compact	Identificação VITEK MS RUO (MALDI-TOF)
<i>Staphylococcus simulans</i> 00254 ATCC 27851	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i> (99,2%)
<i>Staphylococcus warneri</i> 00243 ATCC 10209	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus warneri</i> (99,9%)
<i>Aeromonas</i> sp 00290 ATCC 35941	Não identificado	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas</i> sp. (95,2%)
<i>Acinetobacter baumannii</i> ( <i>Bacterium anitratum</i> ) (CT) 00143 ATCC 19606	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> (99,9%)
<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i> (CT) 00382 ATCC 10700	Não identificado	Não identificado	<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i> (77,0%)
<i>Bacillus cereus</i> 00003 ATCC 11778	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> group	<i>Bacillus cereus</i> (99,9%)

O sistema VITEK MS RUO se mostrou promissor, ao identificar 17 (89,48%) das 19 cepas submetidas (Quadro 6), quando comparado ao método considerado oficial de identificação da SEPIN (BBL Crystal, que identificou somente 11 cepas, isto é, 57,90%) e ao VITEK 2 Compact (que identificou 16 cepas, ou 84,21%).

A comparação da performance do VITEK MS RUO com o VITEK 2 na identificação de estirpes de origem clínica foi realizada por Guo e cols. (2014) e apresentou 92,59% de concordância de resultados entre os dois métodos, utilizando um número considerável de cepas (1.025, sendo 1.020 bactérias e 5 fungos). O percentual de concordância entre os resultados desses dois métodos com as 19 cepas avaliadas no presente trabalho foi mais baixo (78,95%, com 15 resultados em concordância). Essa diferença pode ser atribuída a escolha das estirpes testadas: os patógenos comumente identificados na rotina clínica foram utilizados na construção da base de dados dos sistemas de identificação, sendo então identificados com precisão (GIO *et*

*al.*, 2014). Dessa forma, espécimes clínicos provavelmente apresentarão uma cobertura maior esperada, na avaliação da amplitude da base de dados, quando comparados a cepas não patogênicas ou não clínicas.

Por apresentar grande incidência de isolamento em áreas controladas (SHEBARA *et al.*, 2010, PEREIRA, 2009, UTESCHER *et al.*, 2007), o gênero *Staphylococcus* foi representado por quatro espécies (*S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. simulans*) e todas foram identificadas a contento pelos três métodos testados. Shebara e cols. (2010) também observaram correlação para 43 estirpes do gênero *Staphylococcus* entre os resultados obtidos por um método bioquímico (o kit API, da BioMerieux) e os obtidos pela amplificação e sequenciamento do gene *gap*, embora o método genotípico (a PCR, do gene *gap*, para amplificação e sequenciamento) tenha apresentado precisão superior de confiança de resultados.

Entretanto, o grande desafio seria identificar a microbiota autóctone de Bio-Manguinhos e então foi realizada uma segunda avaliação, com as 52 estirpes bacterianas autóctones identificadas pelo MicroSEQ® 500.

#### 4.1.3 Comparação das três metodologias BBL Crystal, VITEK 2 Compact, VITEK MS RUO utilizando cepas autóctones identificadas pelo kit MicroSEQ® 500

Os resultados da comparação da performance dos três métodos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação da performance das três metodologias BBL Crystal, VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO na identificação de cepas identificadas pelo kit MicroSeq (N=52)

Gênero	Número de resultados em concordância		
	BBL Crystal	VITEK 2 Compact	VITEK MS RUO
<i>Acinetobacter</i> (4)	1 (25%)	1 (25%)	4 (100%)
<i>Arthrobacter</i> (1)	Não identificado	Não identificado	Não identificado
<i>Bacillus</i> (4)	2 (50%)	4 (100%)	4 (100%)
<i>Corynebacterium</i> (2)	Não identificado	Não identificado	Não identificado
<i>Enhydrobacter</i> (2)	Não identificado	Não identificado	Não identificado
<i>Microbacterium</i> (1)	Não identificado	Não identificado	Não identificado
<i>Micrococcus</i> (15)	10 (66,67%)	13 (86,67%)	10 (66,67%)
<i>Moraxella</i> (2)	Não identificado	Não identificado	2 (100%)
<i>Paenibacillus</i> (2)	Não identificado	Não identificado	Não identificado
<i>Providencia</i> (1)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<i>Staphylococcus</i> (16)	11 (68,75%)	14 (87,5%)	15 (93,75%)
<i>Streptomyces</i> (1)	Não identificado	Não identificado	Não identificado
<i>Terribacillus</i> (1)	Não identificado	Não identificado	Não identificado

Das 52 estirpes submetidas aos três métodos, 36 (69,23%) foram identificadas pelo VITEK MS RUO, 33 (63,46%) pelo VITEK 2 Compact e 25 (48,08%) pelo BBL Crystal (Tabela 5). Assim como na comparação utilizando cepas de referência do presente trabalho, o kit de identificação BBL Crystal, até então utilizado pela SEPIN na identificação de bactérias isoladas a partir do controle de qualidade, apresentou a pior performance. Este resultado sugere a total inadequação deste kit para a identificação inequívoca da microbiota de Bio-Manguinhos, levando também ao questionamento dos resultados com baixa porcentagem de confiança e aqueles que possam estar equivocados, ou seja, a identificação de gênero e/ou espécie errados (dados não apresentados).

O sistema VITEK MS RUO apresentou a melhor performance na identificação das estirpes testadas, exceto para o gênero *Micrococcus*, para o qual o sistema VITEK 2 Compact conseguiu identificar 13 das 15 estirpes avaliadas deste gênero (Tabela 5). Para este gênero, o sistema VITEK MS RUO apresentou resultado de performance de identificação (66,67%, identificando 10 das 15 estirpes avaliadas) em proporção semelhante ao resultado apresentado por Deak e cols. (2015), que identificou duas das três

estirpes (66,6%) de *Micrococcus* spp. avaliadas pelo mesmo sistema. Outros dois trabalhos relataram resultados excelentes de identificação para este gênero, utilizando estirpes clínicas no VITEK MS RUO. Richert e cols. (2013) relataram identificação correta de 33 (94%) das 35 estirpes analisadas, enquanto Dubois e cols. (2012) analisaram uma estirpe de *Micrococcus* sp., que foi identificada corretamente. Na avaliação do banco de dados do SARAMIS (BD/SARAMIS), foi verificado que o arquivo referente ao gênero *Micrococcus* apresentava somente uma espécie (*M. luteus*), enquanto este gênero tem 10 espécies descritas. Essa ausência de representação da diversidade conhecida do gênero *Micrococcus* no BD/SARAMIS (pois somente 10% do total de espécies se encontra caracterizado) pode justificar a não identificação de cinco das 15 estirpes avaliadas neste estudo.

Os resultados de identificação, obtidos para as 16 estirpes do gênero *Staphylococcus* spp. (Tabela 5) avaliadas no presente trabalho, foram de 93,75% (15 identificadas), muito próximos ao relatado por Dubois e cols. (2012) e ao encontrado por Richert e cols. (2013), que também utilizaram o VITEK MS RUO para identificação de estirpes clínicas. Outros dois trabalhos realizados utilizando o VITEK MS RUO apresentaram 100% de identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. avaliadas (DEAK *et al.*, 2015, GUO *et al.*, 2014), sendo todas as estirpes de origem clínica. Outros sistemas de identificação baseados na metodologia de MALDI-TOF MS (como o Microflex/Biotyper da Bruker Daltonics e o Voyager/DataExplorer da Applied Biosystems) também apresentaram excelentes performances na identificação de espécimes deste gênero, tanto de origem clínica (RODRIGUEZ-SANCHEZ *et al.*, 2014, LEE *et al.*, 2013, TEKIPPE; BURNHAM, 2013) como de ambiental (BOHME *et al.*, 2013). O BD/SARAMIS apresenta 48 pastas alocadas no arquivo do gênero *Staphylococcus*, sendo 29 de espécies, 16 de subespécies e três pastas com resultados comuns a duas ou mais espécies deste gênero. Estas 29 espécies representam 60,42% do total descrito para este gênero, com 48 espécies relatadas (EUZEBY, 1997, LPSN BACTERIO.NET, 2014). Contudo, o arquivo do gênero *Staphylococcus* no BD/SARAMIS apresenta 957 perfis de espectros, sendo 280 SS. As pastas deste arquivo apresentam, no mínimo, 30 perfis de espectros cada uma. Isso confere ao gênero *Staphylococcus* uma boa

diversidade de perfis proteômicos armazenada e utilizada para a identificação neste BD.

As 10 estirpes pertencentes aos gêneros *Acinetobacter* (4), *Bacillus* (4), *Providencia* (1) e *Moraxella* (2) foram identificadas pelo sistema SARAMIS (Tabela 5), representando uma performance ideal de identificação (100%) e apresentando resultado em acordo com os aqueles apresentados em outros trabalhos com estirpes de origem clínica, utilizando o mesmo sistema (MANJI *et al.*, 2014, RICHTER *et al.*, 2013, DUBOIS *et al.*, 2012). Assim como o gênero *Staphylococcus*, o gênero *Acinetobacter* se encontra bem caracterizado no BD/SARAMIS: 971 perfis de espectros, alocados em 19 pastas, sendo 13 de espécies, uma “spp”, quatro de estirpes não caracterizadas e uma entre espécies. Embora este gênero apresente 34 espécies descritas, as 13 contidas no BD/SARAMIS permitiram a identificação das estirpes autóctones testadas. Os gêneros *Moraxella* e *Providencia* apresentaram representação semelhante no BD/SARAMIS: 107 e 160 perfis de espectros, respectivamente. Ademais, ao considerarmos as espécies descritas para cada um destes gêneros, também apresentam representatividade similar no BD/SARAMIS, sendo 43% para *Moraxella* (seis pastas de espécies no BD e 14 espécies descritas) e 44,44% para *Providencia* (quatro pastas de espécies no BD e nove descritas).

Este foi um resultado animador, principalmente pelas identificações de estirpes do gênero *Bacillus*, onde os quatro espécimes deste gênero foram identificados com sucesso pelo VITEK MS RUO (Tabela 5), ao contrário do encontrado na avaliação anterior das estirpes de BGP autóctones da rotina (Tabelas 3 e 4). O gênero *Bacillus* apresenta 487 perfis de espectros no BD/SARAMIS, dividido em 27 pastas, sendo 22 espécies, uma “spp” e quatro entre espécies. Muito provável que a variedade proteômica apresentada pelas estirpes autóctones esteja contida no BD/SARAMIS, uma vez que este gênero apresenta 204 espécies descritas e as 22 pastas alocadas no BD representam somente 10,78% desta diversidade.

Contudo, mesmo com esses bons resultados, um número elevado de estirpes não identificadas (aproximadamente 30%) foi observado também nesta avaliação (Tabela 5), semelhante ao observado na análise das 506 estirpes da rotina em 2014, de identificação desconhecida (Tabela 4). Em uma revisão sobre uso do MALDI-TOF MS na sistemática bacteriana, Welker e Moore

(2011) destacaram sua limitada capacidade de identificação de estirpes de origem ambiental em decorrência de sua baixa representatividade nas bases de dados de espectros de massa. Entretanto, estes mesmos autores afirmam a equivalência ou superioridade da resolução taxonômica do MALDI-TOS MS em relação ao sequenciamento do gene 16S rRNA, sendo o sucesso do uso desta metodologia analítica dependente da expansão das suas bases de dados disponíveis.

Como o VITEK MS RUO era o único dos três sistemas a permitir a construção de um Banco de Dados (BD) complementar (*in house*), foi realizada uma análise do BD do SARAMIS para avaliação dos gêneros não identificados e verificação da possibilidade de inserção de novos gêneros e/ou novos espectros de referência.

#### 4.1.4 Análise do BD/SARAMIS para avaliação dos resultados de ausência de identificação obtidos pelo VITEK MS RUO

O BD/SARAMIS se encontra organizado em arquivos, obedecendo a organização filogenética das espécies. Estes arquivos apresentam perfis de espectros de massa que são utilizados como modelos de comparação para o perfil de espectros apresentado pela amostra analisada. Estes perfis arquivados podem ser de dois tipos: espectro de referência (ER) ou SuperSpectra (SS). O ER é um perfil de espectros adquirido por meio de análise da estirpe pelo VITEK MS RUO que é arquivado em uma das pastas do BD/SARAMIS por ser considerado representativo da espécie ou gênero analisado. O SS é um perfil de espectros obtido por meio do software SARAMIS e de cálculos específicos, onde diversos ER obtidos em diversas condições ambientais são utilizados para calcular os espectros de massa mais frequentes para representar uma espécie ou gênero.

Das 19 cepas de referência submetidas à identificação pelo VITEK MS RUO (Quadro 6), duas não foram identificadas pelo BD/SARAMIS: *Raoultella planticola* e *Paenibacillus polymixa*. Na avaliação deste banco de dados,

entretanto, estas duas espécies foram encontradas em arquivos contendo perfis de espectros de massa. O arquivo do gênero *Raoultella* apresentava 109 perfis de espectros, sendo 99 ER e 10 SS. Estes perfis de espectros estavam subdivididos em quatro pastas, sendo três de espécies e uma “spp”, além de dois SS representantes de gênero. A pasta da espécie *Raoultella planticola* estava presente e apresentava 18 ER. Curiosamente, esta estirpe não foi identificada pelo VITEK MS RUO, nem mesmo seu gênero. Uma possível explicação para este resultado é que os 18 ER associados a esta espécie no BD/SARAMIS (ou os 109 perfis de espectros da pasta do gênero *Raoultella*) não representem a diversidade proteômica desta espécie ou que o preparo da amostra não tenha sido adequado. O mesmo raciocínio foi utilizado para avaliar a falha na identificação da cepa *Paenibacillus polymixa*. Como duas estirpes autóctones de *Paenibacillus*, identificadas pelo MicroSEQ, também não foram identificadas pelo VITEK MS RUO, o arquivo referente a este gênero foi analisado com maior detalhamento, no texto adiante.

Dos sete gêneros avaliados que não foram identificados pelo BD do SARAMIS (Tabela 5), dois gêneros (*Enhydrobacter* e *Terribacillus*) não foram encontrados no BD/SARAMIS. Esta ausência de um SuperSpectra e de espectros de referência no banco de dados justifica a não identificação das estirpes testadas. Ademais, o fato destas estirpes não terem sido identificadas como pertencentes a outro gênero/espécie (resultado equivocado) representa um achado favorável.

As sete estirpes pertencentes aos gêneros *Paenibacillus* (2), *Streptomyces* (1), *Microbacterium* (1), *Arthrobacter* (1) e *Corynebacterium* (2) não apresentaram similaridade suficiente para serem identificadas, apesar de haver espécies representativas destes gêneros no BD/SARAMIS (Figuras 6 a 11).

Para tentar entender a não identificação destes cinco gêneros, foram avaliados os arquivos de cada gênero em relação ao número de espectros de referência e/ou SuperSpectras contidos e o número de espécies inseridas. Nesta análise, foi realizado um contraponto com o número de espécies descritas (de cada gênero), com o intuito de avaliar a representatividade do BD em relação aos gêneros relacionados e todas as suas espécies.

Os arquivos do BD/SARAMIS referentes aos cinco gêneros estão apresentados nas Figuras 6 a 11 e o conteúdo dos arquivos (espécies, espectros de referência e SuperSpectras) se encontram nas Tabelas 6 a 10.

Figura 6 - Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero *Paenibacillus*

The screenshot displays the SARAMIS Premium software interface. The left pane shows a taxonomic tree with the following structure:

- all
  - Prokarya
    - Bacteria
      - Phylum BXIII Firmicutes
        - Class III Bacili
          - Order I Bacillales
            - Family V Paenibacillaceae
              - Paenibacillus**
                - alvei
                - amylolyticus
                - durus
                - glucanolyticus
                - larvae
                - lautus
                - macerans
                - pabuli
                - peoriae
                - polymyxa
                - spp
                - thiaminolyticus
                - turicensis
                - validus

The right pane shows a folder view of the reference spectra for the genus *Paenibacillus*, including folders for each species and two 'superspectr...' folders. Below this is a table of the spectra data:

Nr	Selection	Name	Category	Number of peaks	Active	Sample	Strain	Typ	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Kingdom	Domain
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0018_	Sp.	91	<input type="checkbox"/>	DSM 15	DSM	0	maceran	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0018_	Sp.	87	<input type="checkbox"/>	DSM 37	DSM	0	polymyx	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0018_	Sp.	105	<input type="checkbox"/>	DSM 37	DSM	0	polymyx	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0018_	Sp.	81	<input type="checkbox"/>	FAIV		0	polymyx	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0018_	Sp.	86	<input type="checkbox"/>	FAIV		0	polymyx	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0147_	Sp.	91	<input type="checkbox"/>	S21		0	spp	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0147_	Sp.	97	<input type="checkbox"/>	S21		0	spp	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0153_	Sp.	97	<input type="checkbox"/>	S21		0	spp	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0153_	Sp.	99	<input type="checkbox"/>	S21		0	spp	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	LSMG_000_0072_	Sp.	93	<input type="checkbox"/>	715380		0	turicensi	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	LSMG_000_0072_	Sp.	112	<input type="checkbox"/>	715380		0	turicensi	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	LSMG_000_0075_	Sp.	120	<input type="checkbox"/>	715380		0	turicensi	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	LSMG_000_0075_	Sp.	109	<input type="checkbox"/>	715380		0	turicensi	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
14	<input type="checkbox"/>	superspectrum_Pa	SSp.	44	<input checked="" type="checkbox"/>				peoriae	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
14	<input type="checkbox"/>	superspectrum_Pa	SSp.	38	<input checked="" type="checkbox"/>					Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
14	<input type="checkbox"/>	superspectrum_Pa	SSp.	46	<input checked="" type="checkbox"/>					Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
14	<input type="checkbox"/>	superspectrum_Pa	SSp.	57	<input checked="" type="checkbox"/>				validus	Paenib	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary

At the bottom of the interface, there is a status bar with the text 'spectra and superspectra in Genus: 'Paenibacillus'', a tolerance dropdown set to '0.08', and buttons for 'Select All', 'Unselect all', 'Identify', 'Taxonomy', 'Superspectrum', 'Activate superspectra', 'Delete', and 'Move To'. The Windows taskbar at the bottom shows the time as 09:03 on 12.02.2015.

Tabela 6- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero *Paenibacillus*

<b>Gênero <i>Paenibacillus</i> (BD/SARAMIS, versão Database 4.10 )</b>	
<b>Nome da Pasta (Espécie)</b>	<b>Número de ER e SS</b>
<i>P. alvei</i>	7 ER
<i>P. amylolyticus</i>	6 ER
<i>P. durus</i>	8 ER
<i>P. glucanolyticus</i>	10 ER
<i>P. larvae</i>	2 ER
<i>P. lautus</i>	11 ER
<i>P. macerans</i>	14 ER
<i>P. pabuli</i>	16 ER
<i>P. peoriae</i>	1 SS + 12 ER
<i>P. polymyxa</i>	10 ER
<i>P. thiaminolyticus</i>	9 ER
<i>P. turicensis</i>	4 ER
<i>P. validus</i>	1 SS + 15 ER
Spp.	15 ER
SuperSpectra de gênero	2 SS
<b>TOTAL</b>	<b>4 SS + 139 ER</b>

ER=Espectros de Referência; SS=SuperSpectras; P= *Paenibacillus*

As duas estirpes autóctones de *Paenibacillus* spp. não apresentaram similaridade com nenhum dos 143 perfis de espectros (ER ou SS) presentes na pasta deste gênero no BD/SARAMIS (Tabela 6), não sendo identificadas por este sistema.

Atualmente, o gênero *Paenibacillus* apresenta 156 espécies descritas (EUZEBY, 1997, LPSN BACTERIO.NET, 2014). Dessa forma, as 13 espécies encontradas no BD/SARAMIS representam somente 8,33% do total para este gênero, refletindo uma baixa representatividade das espécies descritas. Com isso, a probabilidade de um resultado apresentar alta similaridade com algum perfil de espectro contido no BD, necessária para a identificação da estirpe, se torna muito baixa.

Figura 7- Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero *Streptomyces*

The screenshot displays the SARAMIS Premium software interface. On the left, a taxonomic tree shows the classification of *Streptomyces* species. On the right, a table lists the spectra and superspectra for this genus, including columns for selection status, name, category, number of peaks, active status, sample, strain, type, species, genus, family, order, class, phylum, kingdom, and domain. Below the table, there are controls for tolerance (0.08) and buttons for 'Select All', 'Unselect all', 'Identify', 'Taxonomy', 'Superspectrum', 'Activate superspectra', 'Delete', and 'Move To'.

Nr	Selection	Name	Category	Number of peaks	Active	Sample	Strain	Typ	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Kingdom	Domain
12	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_ Sp.	Sp.	108	<input type="checkbox"/>	B1047-1			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_ Sp.	Sp.	93	<input type="checkbox"/>	B1047-a			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
14	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0888_ Sp.	Sp.	125	<input type="checkbox"/>	19_05	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
15	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0888_ Sp.	Sp.	149	<input type="checkbox"/>	19_06	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
16	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0981_ Sp.	Sp.	143	<input type="checkbox"/>	019_05	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
17	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0981_ Sp.	Sp.	148	<input type="checkbox"/>	019_06	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
18	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_1066_ Sp.	Sp.	116	<input type="checkbox"/>	CCUG 1	CCUG 0		griseus s	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
19	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_1066_ Sp.	Sp.	104	<input type="checkbox"/>	CCUG 1	CCUG 0		griseus s	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
20	<input type="checkbox"/>	ANAS_000_1072_ Sp.	Sp.	143	<input type="checkbox"/>	VM 588	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
21	<input type="checkbox"/>	ANAS_000_1072_ Sp.	Sp.	114	<input type="checkbox"/>	VM 588	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
22	<input type="checkbox"/>	ANAS_000_1074_ Sp.	Sp.	111	<input type="checkbox"/>	VM 588	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
23	<input type="checkbox"/>	ANAS_000_1152_ Sp.	Sp.	127	<input type="checkbox"/>	VM 588	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
24	<input type="checkbox"/>	ANAS_000_1152_ Sp.	Sp.	82	<input type="checkbox"/>	VM 588	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
25	<input type="checkbox"/>	ANAS_000_1161_ Sp.	Sp.	87	<input type="checkbox"/>	VM 588	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
26	<input type="checkbox"/>	ANAS_000_1162_ Sp.	Sp.	102	<input type="checkbox"/>	VM 588	0		spp	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
27	<input type="checkbox"/>	superspectrum_St	SSp.	41	<input checked="" type="checkbox"/>				Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
28	<input type="checkbox"/>	superspectrum_St	SSp.	44	<input checked="" type="checkbox"/>				griseus s	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary

Tabela 7- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero *Streptomyces*

<b>Gênero <i>Streptomyces</i> (BD/SARAMIS, versão Database 4.10)</b>	
<b>Nome da Pasta (Espécie)</b>	<b>Número de ER e SS</b>
<i>S. griseus</i> ssp. <i>griseus</i>	1 SS + 2 ER
Spp.	11 ER
<b>TOTAL</b>	<b>1 SS + 13 ER</b>

ER=Espectros de Referência; SS=SuperSpectras; S= *Streptomyces*

No caso da estirpe autóctone de *Streptomyces* spp., a não identificação pelo BD/SARAMIS provavelmente ocorreu pela baixíssima diversidade representada (somente uma espécie) e pelo pequeno número de perfis (14) de espectros (SS e ER) presentes (Tabela 7). A taxonomia de *Streptomyces* é ainda muito complexa e vem sendo avaliada por metodologias moleculares (BAIO, 2007). Atualmente, aproximadamente 663 espécies foram descritas como pertencentes a este gênero (EUZEBY, 1997; LPSN BACTERIO.NET, 2014). Assim sendo, o BD apresenta 0,15% de representatividade deste gênero: a possibilidade de identificação é praticamente nula.

Figura 8 - Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero *Microbacterium*

The screenshot displays the SARAMIS Premium software interface. On the left, a taxonomic tree shows the classification of *Microbacterium* species. The main window shows a grid of folders representing reference spectra for various *Microbacterium* species. Below the grid is a table listing the spectra with their respective details.

Nº	Selection	Name	Category	Number of peaks	Active	Sample	Strain	Typ	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Kingdom	Domain
11	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0139_	Sp.	94	<input type="checkbox"/>	S8	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
11	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0139_	Sp.	113	<input type="checkbox"/>	S8	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
11	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0147_	Sp.	83	<input type="checkbox"/>	S26	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0147_	Sp.	82	<input type="checkbox"/>	S26	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0147_	Sp.	96	<input type="checkbox"/>	S28	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0147_	Sp.	85	<input type="checkbox"/>	S28	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0153_	Sp.	136	<input type="checkbox"/>	S8	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0153_	Sp.	132	<input type="checkbox"/>	S8	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0153_	Sp.	93	<input type="checkbox"/>	S26	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0153_	Sp.	89	<input type="checkbox"/>	S26	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0153_	Sp.	87	<input type="checkbox"/>	S28	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	KLBS_000_0153_	Sp.	98	<input type="checkbox"/>	S28	0	spp	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
12	<input type="checkbox"/>	MLDU_002_0645_	Sp.	83	<input type="checkbox"/>	VALI16	0	paraoxy	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
13	<input type="checkbox"/>	MLDU_002_0645_	Sp.	113	<input type="checkbox"/>	VALI16	0	paraoxy	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
13	<input type="checkbox"/>	superspectrum_Mi	SSp.	38	<input checked="" type="checkbox"/>			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
13	<input type="checkbox"/>	superspectrum_Mi	SSp.	27	<input checked="" type="checkbox"/>				Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	
13	<input type="checkbox"/>	superspectrum_Mi	SSp.	44	<input checked="" type="checkbox"/>				Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary	

At the bottom of the window, there is a status bar showing "133 results" and a taskbar with the system clock at 09:06 on 12.02.2015.

Tabela 8- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero *Microbacterium*

<b>Gênero <i>Microbacterium</i> (BD/SARAMIS, versão Database 4.10)</b>	
<b>Nome da Pasta (Espécie)</b>	<b>Número de ER e SS</b>
<i>M. aerolatum</i>	3 ER
<i>M. arborescens</i>	5 ER
<i>M. aurum</i>	1 ER
<i>M. destranolyticum</i>	1 ER
<i>M. flavescens</i>	1 ER
<i>M. hydrocarbonoxydans</i>	4 ER
<i>M. keratonolyticum</i>	2 ER
<i>M. ketosireducens</i>	4 ER
<i>M. koreense</i>	4 ER
<i>M. laevaniformans</i>	2 ER
<i>M. luteolum</i>	1 ER
<i>M. natoriense</i>	2 ER
<i>M. oleivorans</i>	4 ER
<i>M. paraoxydans</i>	2 ER
<i>M. phyllosphaerae</i>	4 ER
<i>M. schleiferi</i>	3 ER
<i>M. testaceum</i>	2 ER
<i>M. thalassium</i>	3 ER
spp.	36 ER
SuperSpectra de gênero	2 SS
<b>TOTAL</b>	<b>2SS + 84 ER</b>

ER=Espectros de Referência; SS=SuperSpectras; M= *Microbacterium*

O arquivo do BD/SARAMIS referente ao gênero *Microbacterium* (Figura 8) apresentou dois SS representantes de gênero, 18 pastas de espécies e uma pasta spp., contendo somente 86 perfis de espectros para realizar a identificação deste gênero (Tabela 8). A maioria das pastas das espécies apresenta de um a quatro ER, sendo este número provavelmente muito baixo

para representar a variação fenotípica dentro de cada espécie. Este número de ER se apresenta muito inferior aos apresentados em pastas de espécies do género *Staphylococcus*, por exemplo, nas quais se pode observar algumas dezenas de ER. Além disso, das 88 espécies descritas de *Microbacterium*, o BD/SARAMIS representa apenas 20,45% destas (EUZEBY, 1997, LPSN BACTERIO.NET, 2014). Estes dois aspectos justificariam a ausência de identificação da estirpe autóctone pelo VITEK MS.

Figura 9 - Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero *Arthrobacter*

The screenshot displays the SARAMIS Premium software interface. On the left, a taxonomic tree shows the classification of *Arthrobacter* species. The main area shows a grid of folders representing reference spectra for various *Arthrobacter* species. At the bottom, a table lists 17 spectra for the genus *Arthrobacter*.

Nr	Selection	Name	Category	Number of peaks	Active	Sample	Strain	Typ	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Kingdom	Domain
1	<input type="checkbox"/>	ANAC_001_0172_	Sp.	203	<input type="checkbox"/>	SO_003		0	russicus	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
2	<input type="checkbox"/>	ANAC_001_0172_	Sp.	219	<input type="checkbox"/>	SO_003		0	russicus	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
3	<input type="checkbox"/>	ANAG_011_7908	Sp.	88	<input type="checkbox"/>	032892		0	spp	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
4	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_11_2	Sp.	121	<input type="checkbox"/>		DSM	0	agilis	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
5	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_11_2	Sp.	103	<input type="checkbox"/>		DSM	0	cummin	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
6	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_11_2	Sp.	125	<input type="checkbox"/>		DSM	0	nitroguaj	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
7	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_11_2	Sp.	124	<input type="checkbox"/>		DSM	0	nitroguaj	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
8	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_0	Sp.	128	<input type="checkbox"/>		DSM	0	agilis	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
9	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_0	Sp.	99	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	cummin	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
10	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_0	Sp.	111	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	albus	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
11	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	124	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	mysoren	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
12	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	116	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	nicotian	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	123	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	methylot	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
14	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	116	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	methylot	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
15	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	86	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	albus	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
16	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	107	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	nicotian	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
17	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	114	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	nicotian	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary

spectra and superspectra in Genus: 'Arthrobacter'

Tolerance: 0.08

Select All Unselect all Identify Taxonomy Superspectrum Activate superspectra Delete Move To

Figura 10 - Arquivo do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e continuação da Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero *Arthrobacter*

The screenshot displays the SARAMIS Premium software interface. The main window shows a tree view of reference spectra for the genus *Arthrobacter*. The tree is organized into folders, with the following species listed: citreus, creatinolyticus, crystallopetes, cumminsi, flavus, gandavensis, gangotriensis, globiformis, histidinovorans, ilicis, kerguelensis, luteolus, methylophus, monumenti, mysorens, nasiphocae, nicotianae, nicotinovorans, nitroguaicolus, oxydans, panetis, pascens, pigmenti, polychromogena, protophomiae, psychrolactophilus, psychrophenicus, ramosus, rhombi, roseus, ruscicus, scleromae, spp, stackebrandti, sulfonivorans, sulfureus, tecti, tumbae, uratoxydans, ureafaciens, and woluwensis.

Below the tree view, a table displays the search results for the genus *Arthrobacter*. The table has the following columns: Nr, Selection, Name, Category, Number of peaks, Active, Sample, Strain, Typ, Species, Genus, Family, Order, Class, Phylum, Kingdom, and Domain. The results are as follows:

Nr	Selection	Name	Category	Number of peaks	Active	Sample	Strain	Typ	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Kingdom	Domain
1	<input type="checkbox"/>	ANAC_001_0172_	Sp.	203	<input type="checkbox"/>	SO_003		0	ruscicus	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
2	<input type="checkbox"/>	ANAC_001_0172_	Sp.	219	<input type="checkbox"/>	SO_003		0	ruscicus	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
3	<input type="checkbox"/>	ANAG_011_7908	Sp.	88	<input type="checkbox"/>	032882		0	spp	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
4	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_11_2	Sp.	121	<input type="checkbox"/>		DSM	0	agilis	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
5	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_11_2	Sp.	103	<input type="checkbox"/>		DSM	0	cummin	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
6	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_11_2	Sp.	125	<input type="checkbox"/>		DSM	0	nitrogua	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
7	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_11_2	Sp.	124	<input type="checkbox"/>		DSM	0	nitrogua	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
8	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_0	Sp.	128	<input type="checkbox"/>		DSM	0	agilis	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
9	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_0	Sp.	99	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	cummin	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
10	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_0	Sp.	111	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	albus	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
11	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	124	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	mysoren	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
12	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	116	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	nicotian	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	123	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	methylo	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
14	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	116	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	methylo	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
15	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	86	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	albus	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
16	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	107	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	nicotian	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
17	<input type="checkbox"/>	DSMZ_2005_12_1	Sp.	114	<input type="checkbox"/>	max 130	DSM	0	nicotian	Arthrob	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary

The interface also shows a tolerance of 0.08 and buttons for Select All, Unselect all, Identify, Taxonomy, Superspectrum, Activate superspectra, Delete, and Move To. The status bar at the bottom indicates 133 results and the date 12.02.2015.

No arquivo referente ao gênero *Arthrobacter*, foram observados dois SS de gênero, 49 pastas de espécies e uma pasta “spp.” (Figuras 9 e 10). Em relação aos outros gêneros avaliados, *Arthrobacter* spp. apresentou o maior número de espécies caracterizadas no BD/SARAMIS. Como este gênero apresenta 74 espécies descritas (EUZEBY, 1997, LPSN BACTERIO.NET, 2014), o sistema proposto contempla 66,22% da diversidade conhecida. Entretanto, o número de perfis de espectros contido em cada pasta de espécie se mostra ínfimo (de dois a quatro, na maioria dos arquivos) quando comparado a espécies de outros gêneros (como os gêneros *Staphylococcus* e *Acinetobacter*, com um total de 957 e 971 perfis de espectros inseridos, respectivamente, dos quais as pastas das espécies apresentam, em média, um mínimo de 30 perfis de espectros por pasta). O mesmo se aplica ao total de 133 (SS + ER) referências de identificação associada ao gênero *Arthrobacter* (Tabela 9), ocasionando o mesmo problema já citado para outros gêneros: a ausência de identificação de estirpes.

Tabela 9- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero *Arthrobacter*

<b>Gênero <i>Arthrobacter</i> (BD/SARAMIS, versão Database 4.10)</b>			
<b>Nome da Pasta (Espécie)</b>	<b>Número de ER e SS</b>	<b>Nome da Pasta (Espécie)</b>	<b>Número de ER e SS</b>
<i>A. agilis</i>	2 ER	<i>A. nicotianae</i>	4 ER
<i>A. albus</i>	2 ER	<i>A. nicotinovorans</i>	2 ER
<i>A. ardleyensis</i>	2 ER	<i>A. nitroguajacolicus</i>	2 ER
<i>A. arilaitensis</i>	2 ER	<i>A. oxydans</i>	2 ER
<i>A. atrocyaneus</i>	2 ER	<i>A. parietalis</i>	2 ER
<i>A. aurescens</i>	2 ER	<i>A. pascens</i>	2 ER
<i>A. bergerei</i>	2 ER	<i>A. pigmenti</i>	2 ER
<i>A. castelli</i>	2 ER	<i>A. polychromogenes</i>	2 ER
<i>A. chlorophenolicus</i>	2 ER	<i>A. protophormiae</i>	2 ER
<i>A. citreus</i>	2 ER	<i>A. psychrolactophilus</i>	2 ER
<i>A. creatinolyticus</i>	2 ER	<i>A. psychrophenolicus</i>	2 ER
<i>A. crystallopoietes</i>	2 ER	<i>A. ramosus</i>	2 ER
<i>A. cumminsii</i>	2 SS + 16 ER	<i>A. rhombi</i>	2 ER
<i>A. flavus</i>	2 ER	<i>A. roseus</i>	2 ER
<i>A. gandavensis</i>	2 ER	<i>A. russicus</i>	4 ER
<i>A. gangotriensis</i>	2 ER	<i>A. scleromae</i>	2 ER
<i>A. globiformis</i>	2 ER	<i>A. stackebrandtii</i>	2 ER
<i>A. histidinolovorans</i>	2 ER	<i>A. sulfonivorans</i>	2 ER
<i>A. ilicis</i>	2 ER	<i>A. sulfureus</i>	2 ER
<i>A. kerguelensis</i>	2 ER	<i>A. tecti</i>	2 ER
<i>A. luteolus</i>	2 ER	<i>A. tumbae</i>	2 ER
<i>A. methylotrophus</i>	2 ER	<i>A. uratoxydans</i>	2 ER
<i>A. monumenti</i>	6 ER	<i>A. ureafaciens</i>	2 ER
<i>A. mysorens</i>	2 ER	<i>A. woluwensis</i>	2 ER
<i>A. nasiphocae</i>	2 ER	spp.	9 ER
SuperSpectra de gênero		2 SS	
<b>Total</b>		<b>4 SS +129 ER</b>	

ER=Espectros de Referência; SS=SuperSpectras; A = *Arthrobacter*

O arquivo do gênero *Corynebacterium* no BD/SARAMIS apresentou 27 pastas (Figura 11), sendo 23 de espécies, uma “spp.” e três entre espécies. Destes cinco gêneros avaliados, o BD/SARAMIS apresentou maior quantidade de perfis de espectro no gênero *Corynebacterium*, num total de 392 (SS + ER) referências de identificação (Tabela 10). Ademais, o número de SuperSpectras dentro deste gênero (45 SS) foi bem superior aos observados nos outros quatro gêneros avaliados.

Figura 11 - Árvore do BD/SARAMIS (versão Database 4.10) e a Pasta de Espectros de Referência e/ou SuperSpectra para o gênero *Corynebacterium*

The screenshot displays the SARAMIS Premium software interface. On the left, a taxonomic tree shows the hierarchy from Prokarya to the genus *Corynebacterium*. The right pane shows a file explorer view of the 'superspectra' folder, containing subfolders for various *Corynebacterium* species and a 'superspectra' folder. Below the file explorer is a table listing the contents of the 'superspectra' folder.

Nº	Selection	Name	Category	Number of peaks	Active	Sample	Strain	Typ	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Kingdom	Domain
37	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	29	<input checked="" type="checkbox"/>				pseudod	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
37	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	34	<input checked="" type="checkbox"/>				pseudod	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
37	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	37	<input checked="" type="checkbox"/>				pseudod	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
37	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	17	<input checked="" type="checkbox"/>				pseudot	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	14	<input checked="" type="checkbox"/>				pseudot	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	14	<input checked="" type="checkbox"/>				renale	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	40	<input checked="" type="checkbox"/>				Coryne	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	41	<input checked="" type="checkbox"/>				Coryne	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	39	<input checked="" type="checkbox"/>				striatum	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	37	<input checked="" type="checkbox"/>				striatum	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	18	<input checked="" type="checkbox"/>				striatum	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	51	<input checked="" type="checkbox"/>				striatum	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	58	<input checked="" type="checkbox"/>				ulcerans	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
38	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	51	<input checked="" type="checkbox"/>				ulcerans	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
39	<input type="checkbox"/>	superspectrum_C	SSp.	42	<input checked="" type="checkbox"/>				urealytic	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
39	<input type="checkbox"/>	TUEB_000_0061_	Sp.	87	<input type="checkbox"/>	DSM 43	ATCC 0		diphtheri	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
39	<input type="checkbox"/>	TUEB_000_0061_	Sp.	134	<input type="checkbox"/>	DSM 43	ATCC 0		diphtheri	Coryne	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary

At the bottom of the interface, there are buttons for 'Select All', 'Unselect all', 'Identify', 'Taxonomy', 'Superspectrum', 'Active superspectra', 'Delete', and 'Move To'. The status bar shows '392 results' and the system clock indicates '09:05 12.02.2015'.

Tabela 10- Agrupamento dos Espectros de Referência e SuperSpectras no Banco de Dados do SARAMIS (versão Database 4.10) para o gênero *Corynebacterium*

<b>Gênero <i>Corynebacterium</i> (BD/SARAMIS, versão Database 4.10)</b>	
<b>Nome da Pasta (Espécie)</b>	<b>Número de ER e SS</b>
<i>C. accolens</i>	4 ER
<i>C. amycolatum</i>	2 SS + 31ER
<i>C.amycolatum/ minutissimum</i>	1 ER
<i>C. amycolatum/striatum</i>	1 SS + 13 ER
<i>C. amycolatum/xerosis</i>	1 SS
<i>C. aurimucosus</i>	2 SS + 6 ER
<i>C. auris</i>	7 ER
<i>C. bovis</i>	10 ER
<i>C. diphtheriae</i>	2 SS + 37 ER
<i>C. freneyi</i>	4 ER
<i>C. glucuronolyticum</i>	4 SS + 7 ER
<i>C. jeikeium</i>	6 SS + 21 ER
<i>C. kutscheri</i>	2 SS + 4 ER
<i>C. macginleyi</i>	1 SS + 4 ER
<i>C. minutissimum</i>	2 ER
<i>C. mucifaciens</i>	2 ER
<i>C. propinquum</i>	6 ER
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	10 SS + 37 ER
<i>C. pseudotuberculosis</i>	2 SS
<i>C. renale</i>	1 SS + 2 ER
<i>C. riegellii</i>	4 ER
<i>C. striatum</i>	4 SS + 85 ER
<i>C. tuberculostearicum</i>	4 ER
<i>C. ulcerans</i>	2 SS + 27 ER
<i>C. urealyticum</i>	1 SS + 13 ER
<i>C. xerosis</i>	2 ER
spp.	14 ER
SuperSpectra de gênero	4 SS
<b>Total</b>	<b>45 SS + 347 ER</b>

Legenda: ER=Espectros de Referência; SS=SuperSpectras; C=*Corynebacterium*

Contudo, a distribuição dos perfis de espectros nas diversas pastas de espécie não se apresentou homogênea, pois enquanto algumas apresentavam de 30 a 89, como no caso das espécies *C. striatum*, *C. pseudodiphtheriticum* e *C. diphtheriae*, outras apresentavam pouquíssimos perfis: de um a seis perfis de espectros em 14 das 27 pastas associadas ao gênero *Corynebacterium* (Tabela 10). Outro aspecto importante a ser observado é que as espécies com maior número de perfis de espectros (ER e SS) são as de interesse clínico, justificando a excelente performance de identificação do BD/SARAMIS para estirpes isoladas a partir de pacientes (LI *et al.*, 2014). A identificação deste gênero na clínica também foi realizada utilizando outros sistemas/banco de dados de análise por MALDI-TOF MS, como o *software* BioTyper (VILA *et al.*, 2012). Neste trabalho desenvolvido por Vila e cols. (2012), todas as estirpes clínicas de *Corynebacterium* spp. foram identificadas tanto pelo kit bioquímico API (Bio-Mérieux) quanto por MALDI-TOF MS (Bruker). Outros trabalhos utilizando o *software* BioTyper na identificação de estirpes de *Corynebacterium* de origem clínica, tanto humana quanto veterinária, apresentaram porcentagem alta (acima de 90%) de resultados de identificação conclusiva, ao menos em nível de gênero (GONÇALVES *et al.*, 2014, BARBERIS *et al.*, 2014, THEEL *et al.*, 2012). Todavia, nestes artigos não realizou-se este tipo de análise (como a do presente trabalho, onde foi estabelecido um contraponto entre espécies presentes no BD com as espécies descritas), não sendo possível concluir a superioridade ou não do Biotyper em relação ao SARAMIS. No presente trabalho, em relação ao total de espécies descritas para o gênero *Corynebacterium* (96 espécies), o BD/SARAMIS mais uma vez apresenta baixa representatividade, constando somente 28,13% desta diversidade (EUZEBY, 1997, LPSN BACTERIO.NET, 2014).

Os dados até então apresentados expõem a imperfeição do BD/SARAMIS em relação à identificação de estirpes de origem ambiental utilizadas no presente trabalho. De acordo com o observado, na identificação de bactérias utilizando o sistema VITEK MS, a avaliação do BD quanto ao número de espécies descritas e o número de EE e SS contidos em cada pasta dos gêneros de interesse se apresenta como fundamental, para ao menos estimar a possibilidade (ou não) de acerto na identificação da estirpe analisada.

Caso a variedade proteômica da bactéria submetida a este sistema não esteja contemplada no BD, haverá grande possibilidade de falha na identificação.

Outra observação interessante que deve ser ressaltada na avaliação do BD/SARAMIS é a possibilidade da presença de estirpes pertencentes a espécies ainda não descritas. Com o aprimoramento das ferramentas utilizadas na sistemática microbiana e a diversificação dos estudos com foco na microbiota a partir de fontes não clínicas, a descrição de novas espécies e o reposicionamento filogenético de estirpes tem sido constante, ocasionando, naturalmente, uma dificuldade na atualização do bancos de dados de identificação. Além disso, a estimativa da existência de até centenas de milhões de espécies ainda não descritas (LPSN BACTERIO.NET, 2014, WELKER; MOORE, 2011, EUZEBY, 1997) torna a possibilidade de um banco de dados de MALDI-TOF MS atender a toda a diversidade microbiana existente ser nula.

A ausência do perfil proteico (avaliada pelos perfis de espectros obtidos nos resultados) expresso pelas estirpes autóctones de Bio-Manguinhos no BD/SARAMIS foi uma das hipóteses avaliadas para os resultados de ausência de identificação. Entretanto, por esta técnica analítica ser muito dependente da qualidade da amostra preparada (entrada do processo), esta hipótese também foi avaliada.

A confecção do *spot* contendo a estirpe misturada com a matriz é extremamente crítica para o resultado, sendo uma das desvantagens desta metodologia. Para descartar a possibilidade de mal preparo da amostra, cinco estirpes (representando os cinco gêneros cujas estirpes não foram identificadas pelo BD/SARAMIS e que estão apresentados na Tabela 5) foram novamente submetidos a identificação pelo VITEK MS RUO, desta vez em quadruplicata. Novamente, não houve identificação das estirpes. Os perfis de espectros obtidos foram comparados entre si para avaliação da reprodutibilidade dos picos apresentados entre as replicatas (Figuras 12 e 16).

As quatro replicatas (de cada estirpe) apresentaram perfis com similaridade superior a 70% (considerado pelo software como pertencentes a mesma espécie), sugerindo homogeneidade da amostra e descartando a possibilidade de ser um resultado atípico. O perfil de espectros obtido na primeira análise também foi comparado às quatro replicatas e a similaridade

entre os perfis analisados permaneceu elevada, reforçando a validade dos resultados obtidos. Ademais, um dos *scores* de qualidade atribuído aos resultados (*datacount*) se encontrava dentro da faixa indicada como adequada (entre 100 e 200), segundo recomendações da BioMérieux.

Todas estas evidências apontam para a inexistência destas variedades das estirpes testadas no BD/SARAMIS, sendo estas candidatas potenciais a construção de SuperSpectras” – que são modelos de comparação – a serem inseridos no BD, de forma complementar.

Figura 12 - Dendrograma do espécime do gênero Arthrobacter



Filter:  
 Error (%): 0.08  
 Absolute Intensity >= 0  
 Relative Intensity >= 0  
 Massrange from 2000 to 20000  
 Select Exclusion list: Sheep blood AGAR

Figura 13 - Dendrograma de um espécime do gênero *Paenibacillus*



**Filter:**  
 Error (%): 0.08  
 Absolute Intensity >= 0  
 Relative Intensity >= 0  
 Massrange from 2000 to 20000  
 Select Exclusion list: Sheep blood AGAR

Figura 14 - Dendrograma de um espécime do gênero *Corynebacterium*



**Filter:**  
 Error (%): 0.08  
 Absolute Intensity >= 0  
 Relative Intensity >= 0  
 Massrange from 2000 to 20000  
 Select Exclusion list: Sheep blood AGAR

Figura 15 - Dendrograma do espécime do gênero *Streptomyces***Filter:**

Error (%): 0.08

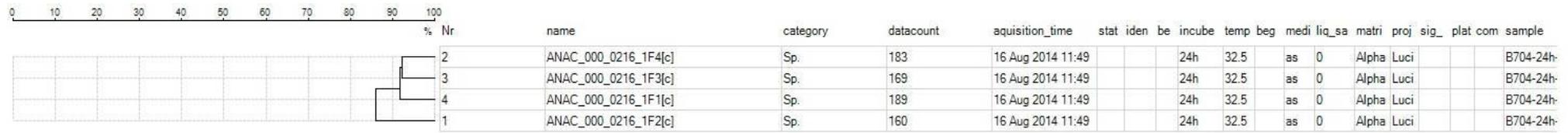
Absolute Intensity &gt;= 0

Relative Intensity &gt;= 0

Massrange from 2000 to 20000

Select Exclusion list: Sheep blood AGAR

Figura 16 - Dendrograma do espécime do gênero *Microbacterium*



Filter:  
 Error (%): 0.08  
 Absolute Intensity >= 0  
 Relative Intensity >= 0  
 Massrange from 2000 to 20000  
 SelectExclusion list: Sheep blood AGAR

#### 4.1.5 Construção de SuperSpectras e incorporação ao BD do SARAMIS

De acordo com os resultados obtidos na comparação das três metodologias (BBL Crystal/VITEK 2 Compact/VITEK MS RUO, apresentados no Quadro 6 e na Tabela 5), foi verificada a necessidade da expansão do BD/SARAMIS para a conclusão das identificações bacterianas no controle de qualidade de Bio-Manguinhos por este sistema. Dessa forma, as estirpes autóctones identificadas pelo MicroSEQ® 500 foram utilizadas para a construção de SuperSpectras e incorporação ao BD/SARAMIS, constituindo um BD *in house* customizado para a microbiota de Bio-Manguinhos.

Para apresentação dos primeiros SuperSpectras construídos e inseridos, foram utilizadas as estirpes B1047 (*Streptomyces* sp.) e B704 (*Microbacterium* sp.) autóctones.

A estirpe de *Streptomyces* sp. B1047 representa o único exemplar identificado deste gênero na Coleção de Bio-Manguinhos. A identificação deste gênero é complexa, em função de dificuldades no seu cultivo (tempo longo de incubação e colônias fortemente aderidas ao meio de cultura) e dos métodos fenotípicos utilizados resultarem em identificação inconclusiva (BAIO, 2007). Dessa forma, para a construção deste SS foi utilizada somente esta estirpe.

A partir do protocolo proposto neste estudo, seriam obtidos 112 perfis de espectros por estirpe. Entretanto, para esta, não foram realizadas as análises nos tempos de cultivo de 24 e 48 horas, por ausência de crescimento suficiente. Desta forma, utilizando a estirpe *Streptomyces* sp. B1047, foram obtidos somente 80 resultados, que foram analisados para a escolha dos perfis de espectros a serem utilizados na construção do SS. Dos 80 resultados, foram excluídos os resultados com baixo *datacount* (n=38), que não apresentaram perfil de espectros (n=23) e que se apresentaram como *outliers* (n=6) no dendrograma obtido. A obtenção de um grande número de resultados considerados de baixa qualidade (tanto os resultados com baixo *datacount* quanto os que não apresentaram perfil de espectros) pode refletir uma dificuldade na obtenção de proteínas ionizadas, uma vez que a parede celular deste gênero é de difícil ruptura. Talvez haja a necessidade de uma adaptação

do protocolo proposto pela empresa responsável pelo Sistema VITEK MS RUO (BioMerieux) para este gênero.

Os 13 perfis de espectros restantes foram importados para o BD/SARAMIS e alocados numa pasta criada para esta estirpe, denominada “Autóctone B1047”, dentro da Pasta do gênero *Streptomyces* (Figura 17).

Figura 17- Organização das pastas do gênero *Streptomyces* no BD/SARAMIS, com detalhamento dos perfis de espectros (ER e SS) contidos na pasta 'Autóctone B1047'

The screenshot displays the SARAMIS Premium software interface. On the left, a taxonomic tree shows the hierarchy from 'all' down to 'Autóctone B1047'. The right side features a table of spectra and superspectra for the selected folder. The table has 14 rows, each representing a different spectrum or superspectrum. The columns include 'Nr', 'Selection', 'Name', 'Category', 'Number of peaks', 'Active', 'Sample', 'Strain', 'Typ', 'Species', 'Genus', 'Family', 'Order', 'Class', 'Phylum', 'Kingdom', and 'Domain'. The 'Autóctone B1047' folder is highlighted in the tree, and its contents are listed in the table below.

Nr	Selection	Name	Category	Number of peaks	Active	Sample	Strain	Typ	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Kingdom	Domain
1	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	109	<input type="checkbox"/>	B1047-1			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
2	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	122	<input type="checkbox"/>	B1047-2			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
3	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	120	<input type="checkbox"/>	B1047-3			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
4	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	117	<input type="checkbox"/>	B1047-4			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
5	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	131	<input type="checkbox"/>	B1047-5			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
6	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	104	<input type="checkbox"/>	B1047-6			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
7	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	106	<input type="checkbox"/>	B1047-7			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
8	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	106	<input type="checkbox"/>	B1047-8			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
9	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	114	<input type="checkbox"/>	B1047-9			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
10	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	121	<input type="checkbox"/>	B1047-1			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
11	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	109	<input type="checkbox"/>	B1047-1			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
12	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	108	<input type="checkbox"/>	B1047-1			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0005_Sp.	Sp.	93	<input type="checkbox"/>	B1047-a			Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
14	<input type="checkbox"/>	superspectrum_St	SSp.	41	<input checked="" type="checkbox"/>				Autocton	Strepto	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary

At the bottom of the interface, there is a status bar showing '14 results' and a 'Tolerance: 0.08' dropdown. Below the table, there are buttons for 'Select All', 'Unselect all', 'Identify', 'Taxonomy', 'Superspectrum', 'Activate superspectra', 'Delete', and 'Move To'.

Com os perfis de espectros alocados na pasta criada, foi construído o SS para a estirpe *Streptomyces* sp. B1047, utilizando as ferramentas do *software* SARAMIS Premium para esta finalidade. Após a verificação dos critérios exigidos (ANAGNOSTEC, 2008) para a inserção do SS no BD/SARAMIS, este foi ativado, para uso na identificação de estirpes. O diagrama dos espectros selecionados (representados por picos) e a lista com cada massa associada a cada espectro estão apresentados nas Figuras 18 a 20.

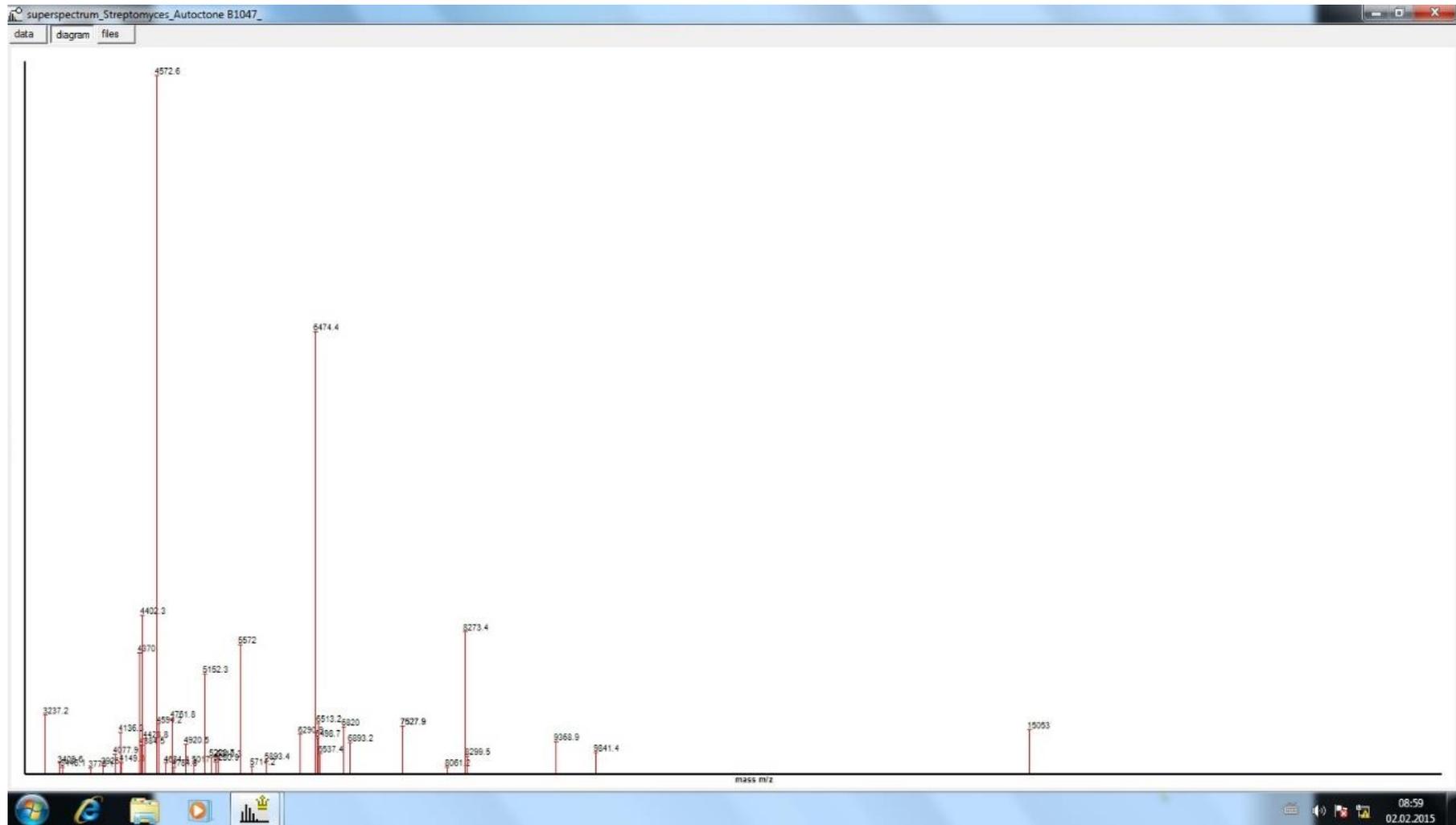
Figura 18- Diagrama SuperSpectra *Streptomyces* sp. B1047

Figura 19- Picos de massas para SuperSpectra *Streptomyces* sp. B1047 (parte I)

superspectrum\_Streptomyces\_Autoctone B1047

data diagram files

**Fileinformation**

name	category	stype	identifier	datacount	acquisition_time	status	iden_of_signal	bewertung	incube_time	temperature	begasung	medium	liq_sample	matrix	project	sig_ana_frag	plate_number	command	sample	iden_no_cod	
superspectru	SSp.	FP_SS	<input checked="" type="checkbox"/>	41		0															

**Spectrum**

stype	mass	error	rel. intensity	number_code	mass number	identification_	comment
FP_SD	3237.200000	0.033700	8.300000	1	12		
FP_SD	3409.600000	0.037900	1.500000	1	12		
FP_SD	3446.100000	0.026500	0.900000	1	12		
FP_SD	3776.100000	0.028400	0.800000	1	12		
FP_SD	3926.000000	0.001000	1.200000	1	12		
FP_SD	4077.900000	0.019600	2.700000	1	12		
FP_SD	4136.300000	0.024400	5.800000	1	12		
FP_SD	4149.300000	0.018600	1.600000	1	12		
FP_SD	4370.000000	0.026900	17.200000	1	12		
FP_SD	4384.500000	0.029300	4.100000	1	12		
FP_SD	4402.300000	0.035000	22.500000	1	12		
FP_SD	4428.800000	0.046500	4.900000	1	12		
FP_SD	4572.600000	0.023300	99.300000	1	12		
FP_SD	4594.200000	0.017400	7.100000	1	12		
FP_SD	4684.400000	0.023800	1.500000	1	12		
FP_SD	4761.800000	0.023100	7.800000	1	12		
FP_SD	4784.300000	0.000100	0.900000	1	12		
FP_SD	4920.500000	0.015700	4.200000	1	12		
FP_SD	5017.700000	0.013800	1.400000	1	12		
FP_SD	5152.300000	0.029800	14.200000	1	12		
FP_SD	5223.700000	0.019000	2.400000	1	12		
FP_SD	5280.900000	0.026100	1.700000	1	12		
FP_SD	5310.300000	0.022300	2.200000	1	12		
FP_SD	5572.000000	0.034700	18.300000	1	12		
FP_SD	5714.200000	0.022900	1.100000	1	12		
FP_SD	5893.400000	0.017700	1.800000	1	12		
FP_SD	6290.900000	0.030400	5.600000	1	12		
FP_SD	6474.400000	0.026200	62.900000	1	12		
FP_SD	6498.700000	0.011200	5.100000	1	12		
FP_SD	6513.200000	0.022100	7.200000	1	12		
FP_SD	6537.400000	0.046000	2.900000	1	12		
FP_SD	6820.000000	0.021700	6.700000	1	12		
FP_SD	6893.200000	0.037100	4.400000	1	12		
FP_SD	7527.900000	0.015800	6.800000	1	12		
FP_SD	7527.900000	0.015800	6.800000	1	12		
FP_SD	8061.200000	0.015700	0.900000	1	12		
FP_SD	8273.400000	0.022200	20.200000	1	12		
FP_SD	8299.500000	0.023300	2.500000	1	12		
FP_SD	9368.900000	0.045800	4.600000	1	12		

Unlock Close

09:01  
02.02.2015

Figura 20- Picos de massas para SuperSpectra *Streptomyces* sp. B1047 (parte II)

superspectrum\_Streptomyces\_Autoctone B1047\_

data diagram files

**File information**

name	category	stype	identifier	datacount	acquisition_tim	status	iden_of_signal	bewertung	incube_time	temperature	begasung	medium	liq_sample	matrix	project	sig_ana_frag	plate_number	command	sample	iden_no_cod	
superspectru	SSp	FP_SS	<input checked="" type="checkbox"/>	41		0															

**Spectrum**

stype	mass	error	rel. intensity	number_code	mass number	identification_	comment
FP_SD	3409.600000	0.037900	1.500000	1	12		
FP_SD	3446.100000	0.026500	0.900000	1	12		
FP_SD	3776.100000	0.028400	0.800000	1	12		
FP_SD	3926.000000	0.001000	1.200000	1	12		
FP_SD	4077.900000	0.019600	2.700000	1	12		
FP_SD	4136.300000	0.024400	5.800000	1	12		
FP_SD	4149.300000	0.018600	1.600000	1	12		
FP_SD	4370.000000	0.026900	17.200000	1	12		
FP_SD	4384.500000	0.029300	4.100000	1	12		
FP_SD	4402.300000	0.035000	22.500000	1	12		
FP_SD	4428.800000	0.046500	4.900000	1	12		
FP_SD	4572.600000	0.023300	99.300000	1	12		
FP_SD	4594.200000	0.017400	7.100000	1	12		
FP_SD	4684.400000	0.023800	1.500000	1	12		
FP_SD	4761.800000	0.023100	7.800000	1	12		
FP_SD	4784.300000	0.000100	0.900000	1	12		
FP_SD	4920.500000	0.015700	4.200000	1	12		
FP_SD	5017.700000	0.013800	1.400000	1	12		
FP_SD	5152.300000	0.029800	14.200000	1	12		
FP_SD	5223.700000	0.019000	2.400000	1	12		
FP_SD	5280.900000	0.026100	1.700000	1	12		
FP_SD	5310.300000	0.022300	2.200000	1	12		
FP_SD	5572.000000	0.034700	18.300000	1	12		
FP_SD	5714.200000	0.022900	1.100000	1	12		
FP_SD	5893.400000	0.017700	1.800000	1	12		
FP_SD	6290.900000	0.030400	5.600000	1	12		
FP_SD	6474.400000	0.026200	62.900000	1	12		
FP_SD	6498.700000	0.011200	5.100000	1	12		
FP_SD	6513.200000	0.022100	7.200000	1	12		
FP_SD	6537.400000	0.046000	2.900000	1	12		
FP_SD	6820.000000	0.021700	6.700000	1	12		
FP_SD	6893.200000	0.037100	4.400000	1	12		
FP_SD	7527.900000	0.015800	6.800000	1	12		
FP_SD	7527.900000	0.015800	6.800000	1	12		
FP_SD	8061.200000	0.015700	0.900000	1	12		
FP_SD	8273.400000	0.022200	20.200000	1	12		
FP_SD	8299.500000	0.023300	2.500000	1	12		
FP_SD	9368.900000	0.045800	4.600000	1	12		
FP_SD	9841.400000	0.019900	3.000000	1	12		

Unlock Close

09:02  
02.02.2015

Em relação ao gênero *Microbacterium*, há um representante, o *Microbacterium* sp. B704 presente na coleção, que consta como único exemplar identificado por sequenciamento para este gênero (Tabela 5). Por outro lado, há outros seis exemplares na coleção que foram identificados como pertencentes ao gênero *Microbacterium* pelo VITEK MS (Tabela 4).

Com o protocolo proposto neste estudo, foram obtidos 96 resultados para esta estirpe. As placas de ASC e TSA com 10 dias de cultivo não foram utilizadas, por apresentar crescimento confluyente das colônias desta estirpe. Na análise do *datacount*, 38 estavam fora da faixa desejada (entre 100 e 200) e foram excluídos, assim como os oito que não apresentaram espectros (problemas na confecção do *spot*) e os quatro *outliers* visualizados no dendrograma. Dos 96 perfis de espectros obtidos, 46 foram considerados adequados (*datacount* e posição no dendrograma) e foram importados para o BD/SARAMIS, sendo alocados na pasta “Autóctone B704”, dentro da pasta do gênero *Microbacterium* (Figura 21).

Na construção do SS desta estirpe, foram utilizados perfis de espectros com todos os tempos de cultivo. Pela frequência dos espectros de massa apresentados, não houve grande diferença entre os resultados obtidos nos diferentes tempos de cultivo analisados.

Figura 21 - Organização das pastas do gênero *Microbacterium* no BD/SARAMIS, com detalhamento dos perfis de espectros (ER e SS) contidos na pasta 'Autóctone B704'

The screenshot displays the SARAMIS Premium software interface. On the left, a taxonomic tree shows the hierarchy from Phylum BXIV Actinobacteria down to the 'Autóctone B704' folder under the genus *Microbacterium*. The right side of the interface shows a grid of spectral plots for various samples, with one plot labeled '22\_TF1[c] B704' selected. Below the plots is a table with the following columns: Nr, Selection, Name, Category, Number of peaks, Active, Sample, Strain, Typ, Species, Genus, Family, Order, Class, Phylum, Kingdom, and Domain.

Nr	Selection	Name	Category	Number of peaks	Active	Sample	Strain	Typ	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Kingdom	Domain
1	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0021_	Sp	165	<input type="checkbox"/>	B704-1			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
2	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0026_	Sp	103	<input type="checkbox"/>	B704-1			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
3	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0061_	Sp	110	<input type="checkbox"/>	B704-1			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
4	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0061_	Sp	107	<input type="checkbox"/>	B704-1			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
5	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0063_	Sp	123	<input type="checkbox"/>	B704-1			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
6	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0063_	Sp	138	<input type="checkbox"/>	B704-1			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
7	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0063_	Sp	69	<input type="checkbox"/>	B704-1			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
8	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0063_	Sp	113	<input type="checkbox"/>	B704-1			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
9	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0086_	Sp	139	<input type="checkbox"/>	B704 01			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
10	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0086_	Sp	150	<input type="checkbox"/>	B704 01			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
11	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0086_	Sp	144	<input type="checkbox"/>	B704 01			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
12	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0089_	Sp	225	<input type="checkbox"/>	B704 01			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
13	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0089_	Sp	189	<input type="checkbox"/>	B704 01			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
14	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0089_	Sp	237	<input type="checkbox"/>	B704 01			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
15	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0089_	Sp	235	<input type="checkbox"/>	B704 01			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
16	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0216_	Sp	199	<input type="checkbox"/>	B704-24			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary
17	<input type="checkbox"/>	ANAC_000_0216_	Sp	151	<input type="checkbox"/>	B704-24			Autocton	Microb	Family	Order	Class	Phylum	Bacteria	Prokary

At the bottom of the interface, there are buttons for 'Select All', 'Unselect all', 'Identify', 'Taxonomy', 'Superspectrum', 'Activate superspectra', 'Delete', and 'Move To'. The status bar at the bottom right shows the date and time: 09:07 02.02.2015.

Foi construído o SS para *Microbacterium* sp. a partir da estirpe B704, da mesma maneira que o descrito para a *Streptomyces* sp. B1047. O diagrama dos espectros selecionados (representados por picos) e a lista com cada massa associada a cada espectro estão apresentados na Figuras 22 e 23.

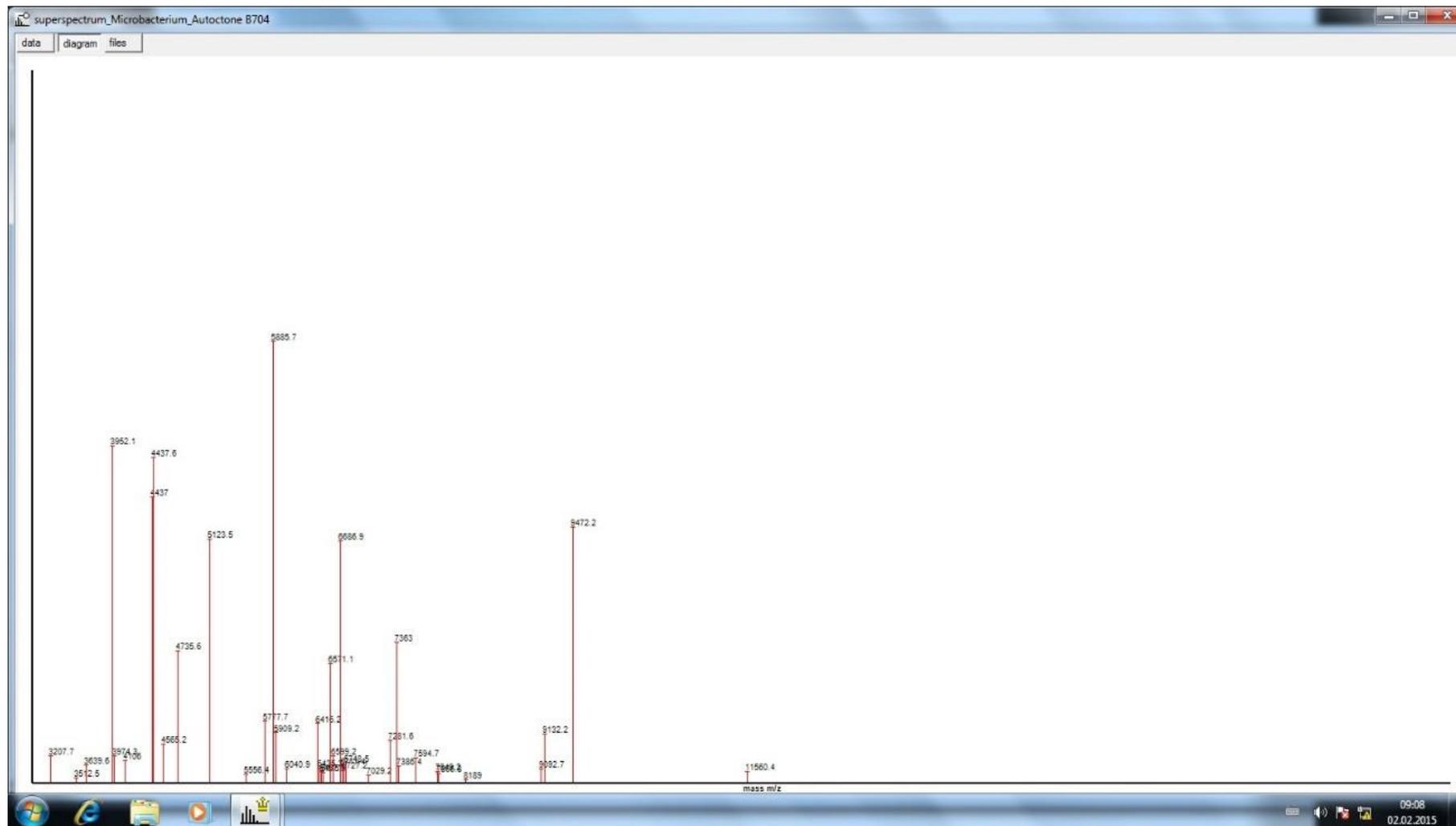
Figura 22 - Diagrama SuperSpectra *Microbacterium* sp. B704

Figura 23 - Picos de massas para SuperSpectra *Microbacterium* sp. B704

superspectrum\_Microbacterium\_Autoctone B704

data diagram files

**Fileinformation**

name	category	stype	identifier	datacount	aquisition_tim	status	iden_of_signal	bewertung	incube_time	temperature	begasung	medium	liq_sample	matrix	project	sig_ana_frag	plate_number	command	sample	iden_no_cod	
superspectru	SSp.	FP_SS	<input checked="" type="checkbox"/>	38		0															

**Spectrum**

stype	mass	error	rel. intensity	number_code	mass number	identification_	comment
FP_SD	3207.700000	0.057200	3.800000	1	36		
FP_SD	3512.500000	0.029600	0.700000	1	31		
FP_SD	3639.600000	0.022500	2.500000	1	33		
FP_SD	3952.100000	0.048600	47.900000	1	43		
FP_SD	3974.300000	0.021700	3.800000	1	31		
FP_SD	4106.000000	0.011500	3.100000	1	37		
FP_SD	4437.000000	0.121700	40.600000	1	33		
FP_SD	4437.600000	0.058900	46.200000	1	37		
FP_SD	4565.200000	0.002500	5.500000	1	37		
FP_SD	4735.600000	0.034900	18.700000	1	42		
FP_SD	5123.500000	0.040500	34.600000	1	43		
FP_SD	5556.400000	0.044100	1.200000	1	34		
FP_SD	5777.700000	0.011900	8.700000	1	41		
FP_SD	5885.700000	0.035400	62.800000	1	43		
FP_SD	5909.200000	0.017600	7.100000	1	38		
FP_SD	6040.900000	0.035400	1.900000	1	39		
FP_SD	6416.200000	0.031800	8.400000	1	43		
FP_SD	6435.200000	0.020500	2.100000	1	39		
FP_SD	6457.900000	0.037000	1.500000	1	38		
FP_SD	6475.100000	0.035500	1.400000	1	35		
FP_SD	6571.100000	0.033600	16.900000	1	43		
FP_SD	6599.200000	0.047500	3.800000	1	32		
FP_SD	6686.900000	0.041100	34.400000	1	43		
FP_SD	6711.400000	0.037000	2.400000	1	39		
FP_SD	6727.200000	0.028600	1.800000	1	31		
FP_SD	6748.500000	0.085800	2.800000	1	39		
FP_SD	7029.200000	0.026000	1.100000	1	40		
FP_SD	7281.600000	0.025900	6.000000	1	43		
FP_SD	7363.000000	0.027600	19.900000	1	43		
FP_SD	7386.400000	0.006000	2.400000	1	42		
FP_SD	7594.700000	0.022200	3.500000	1	40		
FP_SD	7849.200000	0.009400	1.600000	1	32		
FP_SD	7866.800000	0.025300	1.300000	1	38		
FP_SD	8189.000000	0.028700	0.400000	1	39		
FP_SD	9092.700000	0.022400	1.900000	1	38		
FP_SD	9132.200000	0.010600	6.900000	1	43		
FP_SD	9472.200000	0.007500	36.300000	1	43		
FP_SD	11560.400000	0.055300	1.600000	1	35		

Unlock Close

09:09  
02.02.2015

Após a construção dos SS e a sua ativação, as estirpes *Microbacterium* sp. B704 e *Streptomyces* sp. B1047 foram novamente submetidas ao VITEK MS RUO e corretamente identificadas, representando os primeiros SS autóctones inseridos e a expansão com sucesso do BD/SARAMIS em Bio-Manguinhos.

O aumento do BD dos *softwares* associados a sistemas de identificação por MALDI-TOF MS tem sido reportado em trabalhos a partir de estirpes clínicas (CALDERARO *et al.*, 2014, XIAO *et al.*, 2014, SOGAWA *et al.*, 2012) e ambientais (CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL, 2013), embora nenhum destes tenha utilizado o software SARAMIS.

No presente trabalho, foi proposto um protocolo de construção destes SuperSpectras, que será convertido em uma Instrução de Trabalho em Bio-Manguinhos. Dessa forma, a expansão do BD *in house* será uma atividade de rotina e contínua no controle de qualidade.

#### 4.1.6 Elaboração de Documentos Técnicos

Foram confeccionados diversos documentos técnicos com os resultados de performance dos métodos e das melhorias propostas: Instruções de Trabalho para cada método de identificação ou caracterização (APÊNDICES B, C, D, F e G), Protocolo e Relatório de Validação para o sistema VITEK 2 Compact (APÊNDICE E), Relatório de Investigação de Fontes de Contaminação utilizando o Banco de Dados, a Bacterioteca e a técnica de PFGE (APÊNDICE H), Relatório das Cepas Autóctones utilizadas como padrões Secundários (APÊNDICE I) e Instrução de Trabalho para investigação de origens de contaminação utilizando a técnica de PFGE (APÊNDICE L).

Foi construído um modelo de Ficha para o Catálogo de Identificação (APÊNDICE A) e, a partir deste modelo, foram construídas as duas primeiras fichas (APÊNDICES J e K) deste catálogo. A confecção destas fichas foi incorporada a rotina da equipe de identificação da SEPIN, e seu procedimento

está sendo descrito através de uma Instrução de Trabalho, cuja conclusão está prevista para julho de 2015.

#### 4.1.7 Melhorias quanto ao Custo/Tempo/Precisão associadas: cálculo do valor por amostra

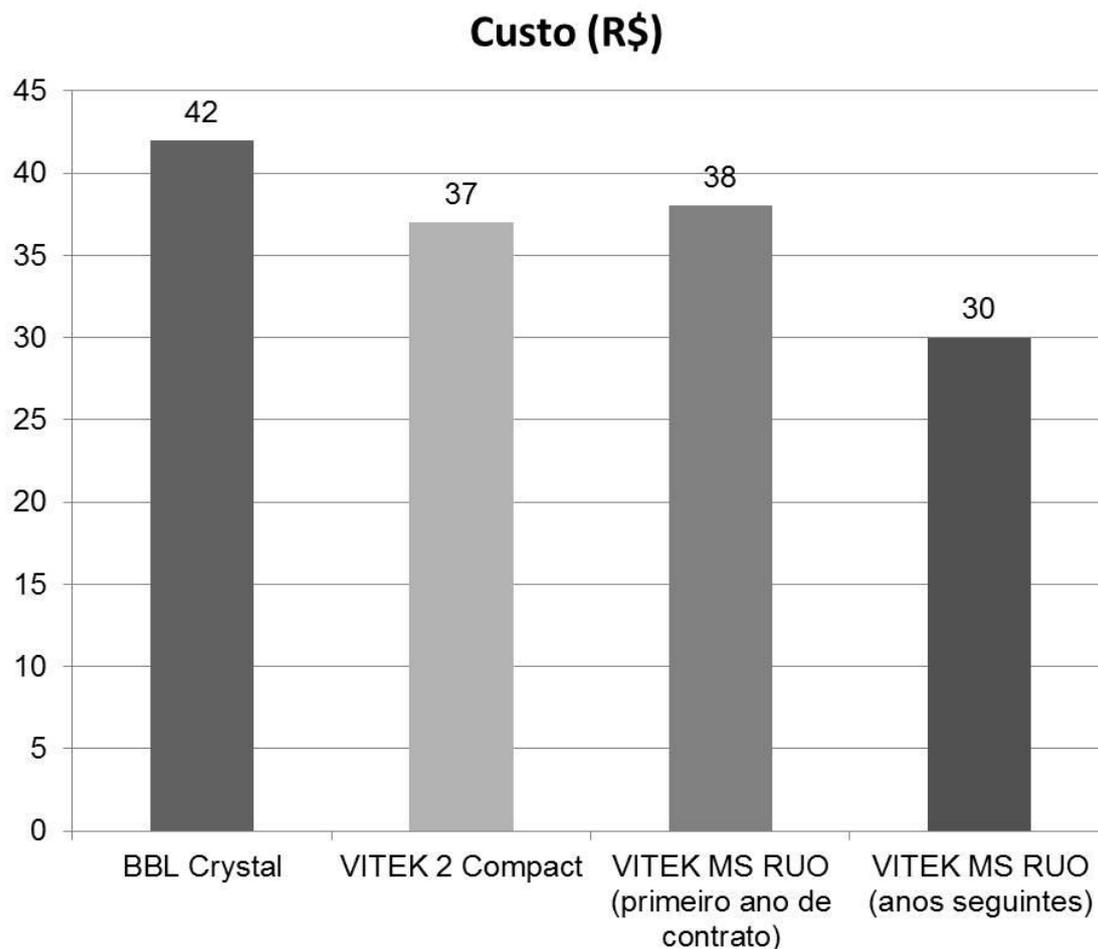
A melhoria das técnicas analíticas em busca da excelência dos resultados deve estar atrelada ao seu impacto na demanda e no orçamento da Instituição, de forma a racionalizar a relação custo/benefício. Geralmente, a associação dos três aspectos ideais (resultado correto/baixo custo/rapidez de resposta) em um único método de identificação é uma rara probabilidade, sendo necessária uma avaliação prévia destes aspectos antes da escolha da metodologia a ser implementada na rotina.

Dentre as quatro metodologias propostas, o kit MicroSEQ® seria o mais indicado na obtenção de uma resposta inequívoca a respeito da identidade taxonômica da estirpe avaliada. Entretanto, como já discutido anteriormente, o uso desta ferramenta em todas as amostras submetidas a identificação na SEPIN seria completamente inviável, uma vez que o custo por amostra (MicroSEQ®) foi estimado em R\$ 116,89 (considerando somente os insumos e consumíveis, com base em orçamento recebido em 2015 pela Life Technologies). Entretanto, seu uso é de fundamental importância na identificação de estirpes não identificadas pelos outros três métodos ou de resultado questionável, e seu uso na rotina na SEPIN deve ser implementado com este propósito, inclusive para atender as exigências da Anvisa e da OMS quanto a este aspecto. Dos outros três métodos restantes, o VITEK MS RUO foi o que apresentou melhor performance na identificação das estirpes, conforme já discutido anteriormente.

Em relação ao custo por amostra dos outros três métodos (BBL Crystal, VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO), de acordo com os contratos atuais estabelecidos entre Bio-Manguinhos e os fornecedores dos kits e utilizando somente os insumos utilizados no preparo de uma amostra (excluindo, dessa forma, o cálculo de hora-homem, hora-máquina, etc), a identificação pelo

VITEK MS RUO prevista pelo contrato para o ano de 2014 se apresentou como o de menor custo (Figura 24):

Figura 24 - Comparação do custo dos insumos por amostra (valores obtidos em 2012)



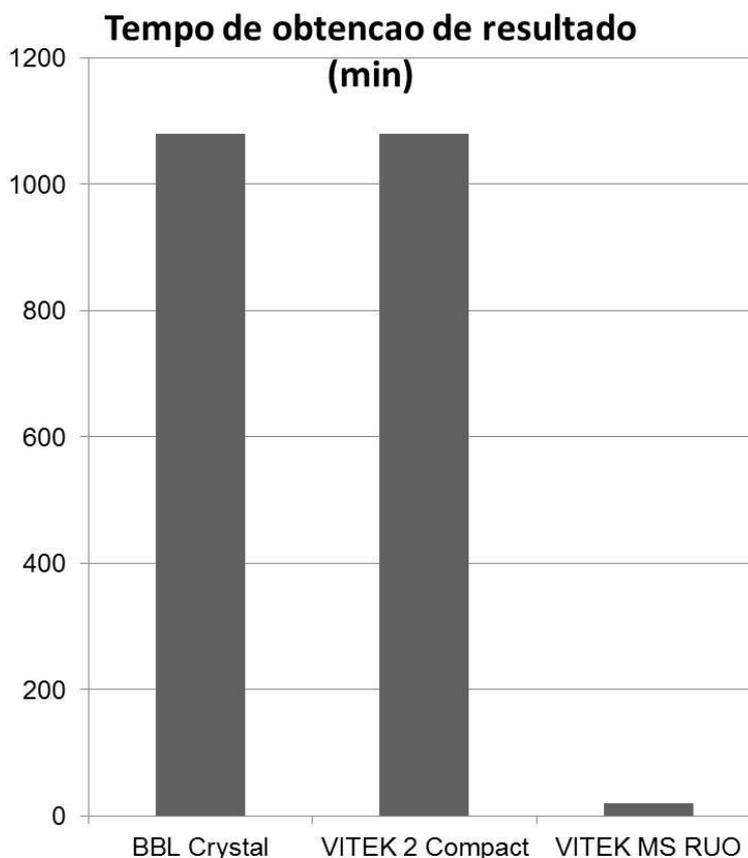
Observação: O primeiro ano de contrato do VITEK MS RUO foi o ano de 2013.

Importante ressaltar que, no cálculo da amostra dos sistemas VITEK 2 Compact e do VITEK MS RUO, os custos de manutenção/prevenção (inclusive troca de peças) e de assessoria técnica e científica já estão embutidos no preço dos insumos, inclusive o uso do equipamento. No estudo desenvolvido por Deng e cols. (2014), foi realizado o cálculo do custo por amostra para o VITEK MS RUO e para o VITEK 2, considerando somente os insumos utilizados no primeiro método – solução matriz, *slides*, alças de inoculação e

ponteiras – e no segundo – cartões de identificação, tubos de preparo de suspensões, *swabs* e solução salina. O custo para a identificação de uma amostra pelo VITEK MS (20 yuans, moeda chinesa) ficou avaliado em aproximadamente 65% menor que uma identificação pelo VITEK 2 (56 yuans). Outros trabalhos também apresentaram a redução do custo da identificação através do uso da técnica de MALDI-TOF MS (SENG *et al.*, 2009, CHERKAOUI *et al.*, 2010, BIZZINI & GREUB, 2010)

Ao compararmos os três métodos segundo o tempo de obtenção de resultado, observamos uma diferença drástica entre os métodos bioquímicos (BBL Crystal e VITEK 2 Compact) e o proteômico (VITEK MS RUO), conforme a Figura 25. Este cálculo foi realizado para a identificação de uma estirpe bacteriana.

Figura 25 - Comparação do tempo de obtenção de resultados



Deng e cols. (2014) também avaliaram o tempo para a identificação pelos dois métodos (VITEK MS RUO e VITEK 2) e utilizaram 16 cepas para realizar esse cálculo: enquanto o VITEK MS RUO concluiu a identificação deste número de amostras em 48 minutos, o VITEK 2 apresentou resultados após 510 minutos. Estes resultados apontam para a liberação de resultados 10 vezes mais rápida pelo sistema VITEK MS RUO.

Num estudo mais detalhado, Tan e cols. (2012) avaliaram o tempo e o custo por identificação de espécimes clínicos realizando análises estatísticas dos valores mensurados em um ano na rotina de identificação do laboratório de um hospital americano. Neste estudo, o gasto com implementação e manutenção do equipamento também foi avaliado. A identificação pelo MALDI-TOF, mais uma vez, foi considerada vantajosa economicamente.

A rápida obtenção de resultados permite um *feedback* mais veloz em relação aos riscos relacionados aos processos e ambientes produtivos. Esta pronta resposta, por sua vez, favorece a liberação de produtos em um menor período de tempo (PAVLOVIC *et al.*, 2013). Isso representa um ganho econômico para a Instituição pela economia com gastos relacionados a infraestrutura (energia elétrica, força de trabalho, etc). Se for traçado um paralelo entre custo com hora-homem e hora-máquina associado a cada método e o tempo necessário para a realização do ensaio, o sistema VITEK MS RUO se apresenta muito mais econômico.

## 4.2 BACTERIOTECA E BANCO DE DADOS

A Bacterioteca de Bio-Manguinhos foi concebida com a proposta de ser uma coleção de trabalho, de memória e de pesquisa. Todas as bactérias depositadas nesta coleção são oriundas da rotina de identificação de contaminantes da SEPIN e apresentam diversas fontes de isolamento (monitoramento ambiental, monitoramento de água, processos de validação, produtos, insumos e matérias-primas analisados, entre outros), desde 2008. Sua estruturação contribuiu para o conhecimento da microbiota autóctone de

Bio-Manguinhos e da sua distribuição nas áreas produtivas monitoradas. Além disso, permitiu a investigação fidedigna de fontes de contaminação e a implementação de padrões autóctones no controle de qualidade Microbiológico.

A primeira apresentação formal desta coleção foi em maio de 2011. No mesmo ano, um trabalho com os primeiros resultados compilados foi apresentado oralmente no 26<sup>o</sup>. Congresso Brasileiro de Microbiologia. Em relação à diversidade em indústrias farmacêuticas, poucos dados são publicados (XAVIER *et al.*, 2013) e o uso de coleções para construir este conhecimento foi apontado como fundamental e inovador.

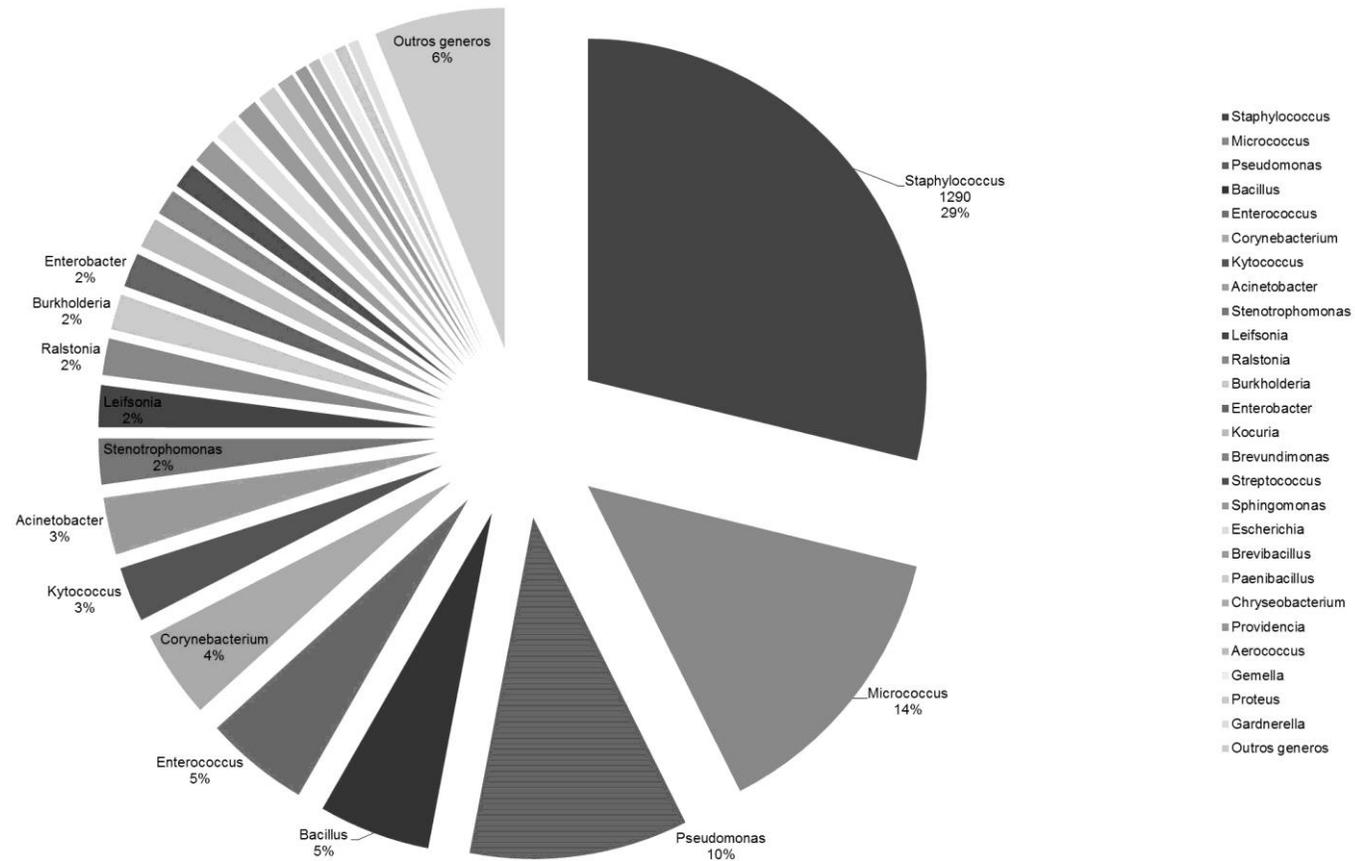
Até setembro de 2011, a Bacterioteca apresentava mais de 4.550 estirpes, sendo 2.752 identificadas por meio do kit BBL Crystal. Estas estirpes foram identificadas como representantes de 42 gêneros distintos, de acordo com a identificação bioquímica, obtida por meio deste kit. Os seis gêneros identificados que apresentaram a maior incidência foram *Staphylococcus* (32,06%), *Micrococcus* (26,23%), *Bacillus* (7,11%), *Corynebacterium* (6,60%), *Leifsonia* (3,98%) e *Pseudomonas* (3,55%). Estes seis gêneros representam quase 80% do total de cepas identificadas. Para mais de 1.800 estirpes, a identificação bioquímica foi inconclusiva (resultado "Inaceitável"), correspondendo a aproximadamente 40% de todo acervo biológico (Dados não apresentados no presente trabalho, sendo as informações extraídas de MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>).

No presente trabalho, esta baixa performance de identificação pelo kit BBL Crystal foi observada não somente com relação às estirpes de referência (57,90%), conforme o Quadro 6, mas também nas autóctones identificadas pelo MicroSEQ (48,08%), conforme a Tabela 5. Este resultado reflete a inadequação deste sistema de identificação para a diversidade isolada pelo CQ de Bio-Manguinhos.

De janeiro de 2010 a agosto de 2014, período utilizado para o presente trabalho, a Bacterioteca era constituída por 5.842 estirpes que representavam 80 gêneros bacterianos distintos (Figura 26). Este levantamento foi realizado com o resultado obtido pelos métodos de identificação disponíveis no momento de isolamento. Até 2011, todas as estirpes foram identificadas pelo kit bioquímico BBL Crystal. Em 2012, as estirpes foram identificadas pelo Sistema bioquímico VITEK 2 Compact. Em 2013 e 2014, todas as estirpes

foram submetidas ao Sistema VITEK 2 Compact e algumas estirpes de interesse foram submetidas ao VITEK MS RUO.

Figura 26 - Distribuição dos gêneros bacterianos dos estirpes da Bacterioteca, no período de 2010 a 2014 (N=5.842)



Outros gêneros: 54 gêneros bacterianos restantes

A diversidade de gêneros registrados na Bacterioteca (no período de 2010 a 2014) quase dobrou em relação aos dados registrados até 2011 (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>): de 42 para 80 gêneros identificados. Os 54 gêneros que representam 6% das estirpes da Bacterioteca estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – 54 gêneros (6%) da Bacterioteca que não foram discriminados na Figura 26

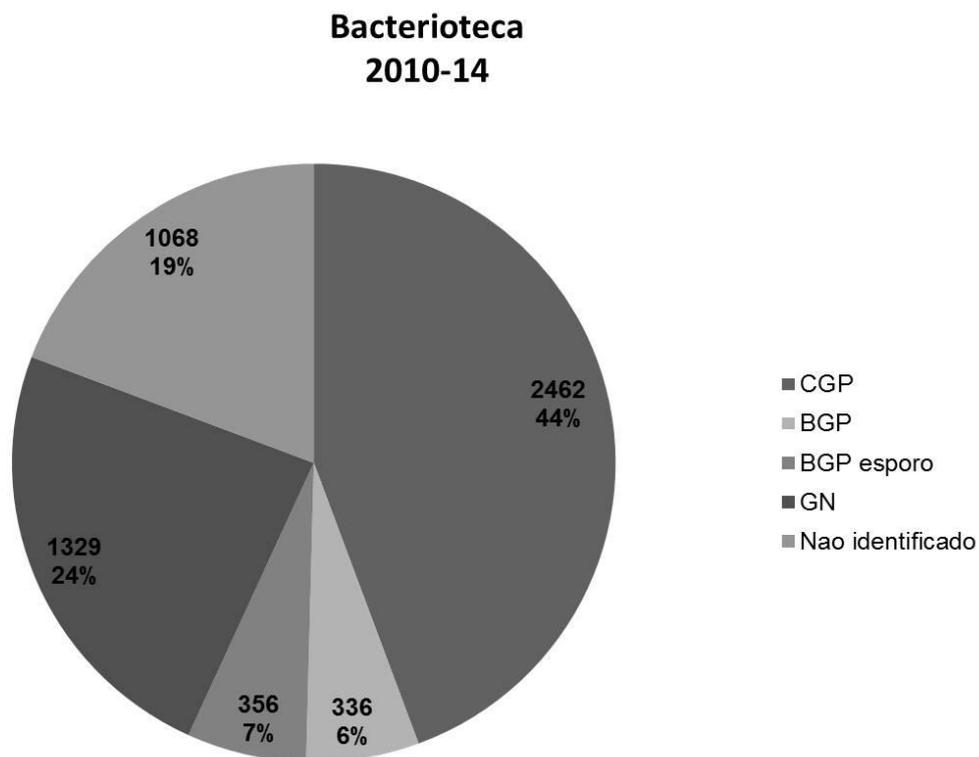
Gênero	Nº de estirpes	Gênero	Nº de estirpes
<i>Actinomyces</i>	2	<i>Lactococcus</i>	5
<i>Achromobacter</i>	2	<i>Leclercia</i>	2
<i>Aeromonas</i>	3	<i>Leuconostoc</i>	17
<i>Alloiococcus</i>	4	<i>Lysinobacillus</i>	4
<i>Alicyclobacillus</i>	22	<i>Methylobacterium</i>	1
<i>Agrobacterium</i>	3	<i>Microbacterium</i>	7
<i>Arcanobacterium</i>	1	<i>Moraxella</i>	10
<i>Arthrobacter</i>	9	<i>Ochrobacterium</i>	1
<i>Brachybacterium</i>	10	<i>Oerskovia</i>	12
<i>Citrobacter</i>	4	<i>Pantoea</i>	5
<i>Comamonas</i>	4	<i>Pediococcus</i>	6
<i>Cronobacter</i>	3	<i>Propionibacterium</i>	2
<i>Cupriavidus</i>	16	<i>Rhizobium</i>	3
<i>Delftia</i>	7	<i>Roseomonas</i>	1
<i>Dermacoccus</i>	2	<i>Rhodococcus</i>	1
<i>Dermabacter</i>	2	<i>Rothia</i>	8
<i>Empedobacter</i>	3	<i>Serratia</i>	22
<i>Enhydrobacter</i>	2	<i>Shewanella</i>	1
<i>Erysipelothrix</i>	1	<i>Shigella</i>	3
<i>Flavibacterium</i>	5	<i>Sphingobacterium</i>	7
<i>Flavimonas</i>	5	<i>Stomatococcus</i>	2
<i>Geobacillus</i>	4	<i>Streptomyces</i>	1
<i>Globicatella</i>	1	<i>Terribacillus</i>	1
<i>Granulicatella</i>	10	<i>Turicella</i>	1
<i>Herbaspirillum</i>	1	<i>Vibrio</i>	1
<i>Klebsiella</i>	18	<i>Weeksella</i>	1
<i>Kluyvera</i>	1	<i>Yersinia</i>	8

Apesar dos gêneros *Staphylococcus* (29%) e *Micrococcus* (14%) permanecerem como os mais frequentes no período de 2010 a 2014, a porcentagem destes apresentou queda em relação ao total da Bacterioteca, quando comparado ao observado por Medeiros e cols. no período de 2008 a 2011 (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>). A lista dos gêneros mais frequentes também apresentou mudanças nas posições: atualmente, o gênero *Pseudomonas* (10% das estirpes da Bacterioteca) é o terceiro mais identificado, ao contrário do observado até 2011, quando constava na sexta posição dos mais frequentes, com 3,55% das estirpes (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>). O gênero *Bacillus* (5%) caiu para a quarta posição e o gênero *Corynebacterium*, para a sexta (4%), enquanto o gênero *Enterococcus* (5%) aponta como o quinto mais identificado. Até 2011, o somatório dos seis gêneros mais frequentes chegava a 79,53% do total da coleção (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>). Agora, eles somam 67%. Outra mudança observada foi a diminuição do quantitativo de estirpes não identificadas: dos 40% (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>), houve uma redução para 19%. A introdução dos sistemas VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO em 2012 sugere que estes dois métodos ajudaram na discriminação mais apurada das estirpes submetidas à identificação e diminuiram a quantidade de estirpes não identificadas.

Os resultados encontrados apresentam similaridade com outros realizados em outras unidades farmacêuticas. Utescher e cols. (2007) encontraram os gêneros *Staphylococcus* (74,52%), *Micrococcus* (19,08%) e *Bacillus* (6,40%) como os mais incidentes em três áreas classificadas numa indústria de imunobiológicos. Abreu e cols. (2003) observaram os gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, enquanto Wu e Liu (2007) relataram a predominância dos gêneros *Staphylococcus*, *Microbacterium* e *Bacillus*. Pereira (2009) relatou o isolamento e a identificação de 227 estirpes bacterianas a partir de amostras de ar em uma área controlada (Classes C e D). Destas, 154 (67%) eram *Staphylococcus* spp.

Ao realizar uma análise do perfil geral da Bacterioteca no presente trabalho (no período de 2010 a 2014), foram observadas algumas modificações (Figura 27).

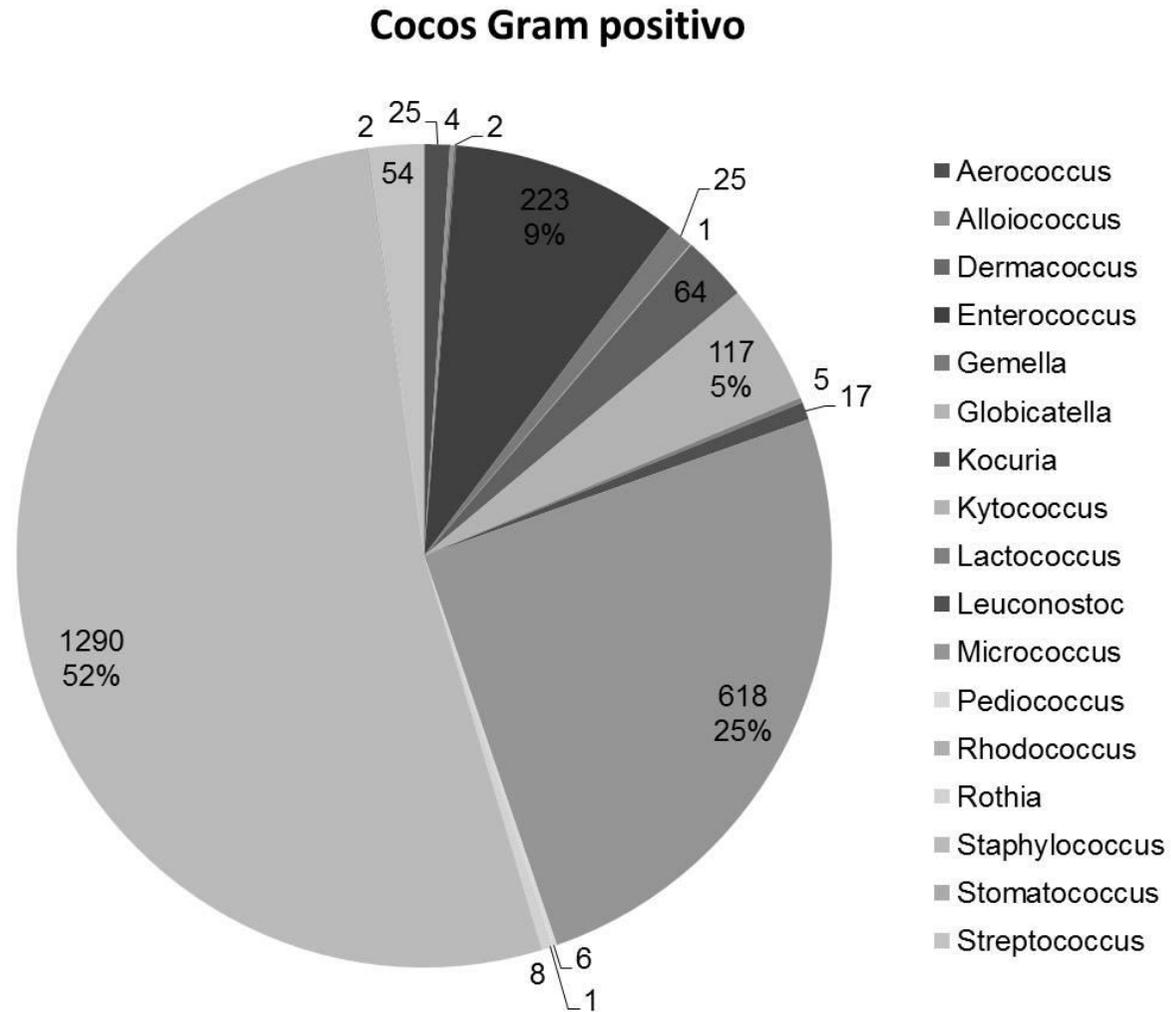
Figura 27 - Distribuição dos grupos bacterianos (Gram) da Bacterioteca no período de 2010 a 2014



CGP=Cocos Gram positivos; BGP=Bastonetes Gram positivos não formadores de esporos; BGP esporo: Bastonetes Gram positivos formadores de esporos; GN=Bastonetes e Cocos Gram negativos

A grande predominância das estirpes permanece como Gram positiva, em relação ao observado no período de 2008 a 2011 (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>). Este grupo representa 57% de todas as estirpes da coleção, enquanto o grupo de Gram negativos consta como 24%. Os Cocos Gram positivos (CGP), maior grupo da Bacterioteca, apresentam 17 gêneros (Figura 28) .

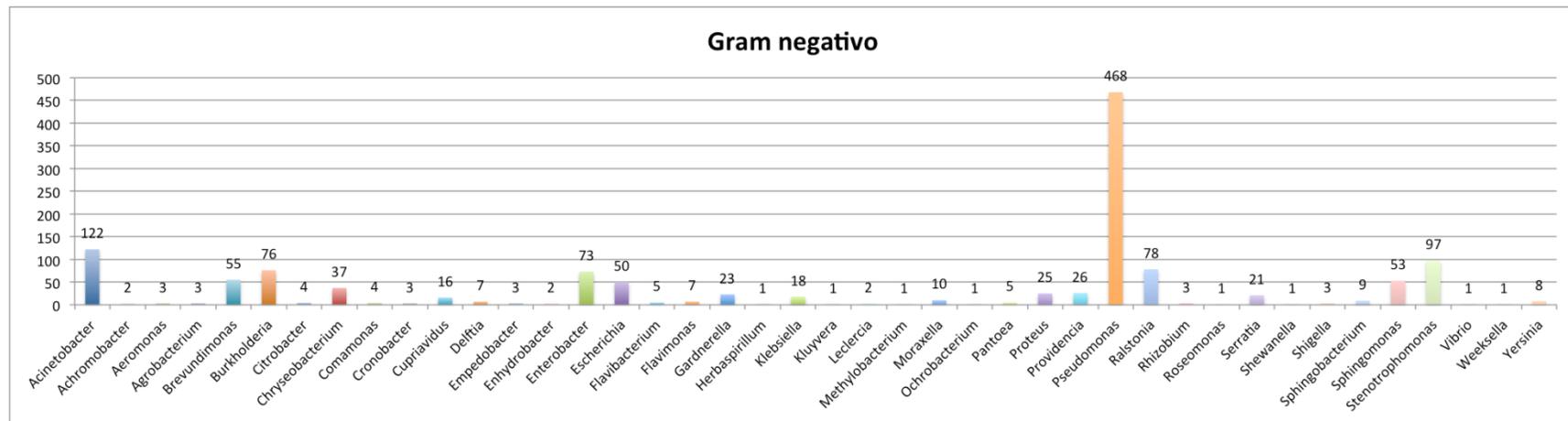
Figura 28 - Gêneros identificados entre os cocos Gram positivos (2010-2014)



Destes, 1.290 pertencem ao gênero *Staphylococcus* (52% dos CGP); 618 (25%) ao *Micrococcus*; 223 (5%) ao *Enterococcus*; 117 (4,75%) ao *Kytococcus*; 64 (2,6%) ao *Kocuria*; e 54 (2,2%) ao *Streptococcus* (Figura 28). Há a possibilidade, de 2010 a 2011 (quando as estirpes eram identificadas pelo kit BBL Crystal, sem as atualizações taxonômicas relacionadas), das estirpes dos gêneros *Kytococcus* e *Kocuria* terem sido identificadas na SEPIN como pertencentes ao gênero *Micrococcus*. Somando estes três gêneros, obtém-se 32,45% dos CGP, aproximando-se da estatística anterior, quando *Staphylococcus* e *Micrococcus* apresentavam uma menor diferença entre si. Novamente, o poder discriminatório se mostrou maior com a introdução dos dois métodos de identificação (VITEK MS e VITEK 2 Compact).

O perfil das estirpes Gram negativas (GN) da Bacterioteca apresentou mudanças significativas ao longo destes anos. De 2008 a 2011, contavam como 6,06% das estirpes (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>), divididos em 18 gêneros. Já no período de 2010 a 2014, constam como 24% da Bacterioteca, e abrangem 42 gêneros (Figura 29).

Figura 29 - Gêneros identificados entre as estirpes Gram negativas (2010-2014)



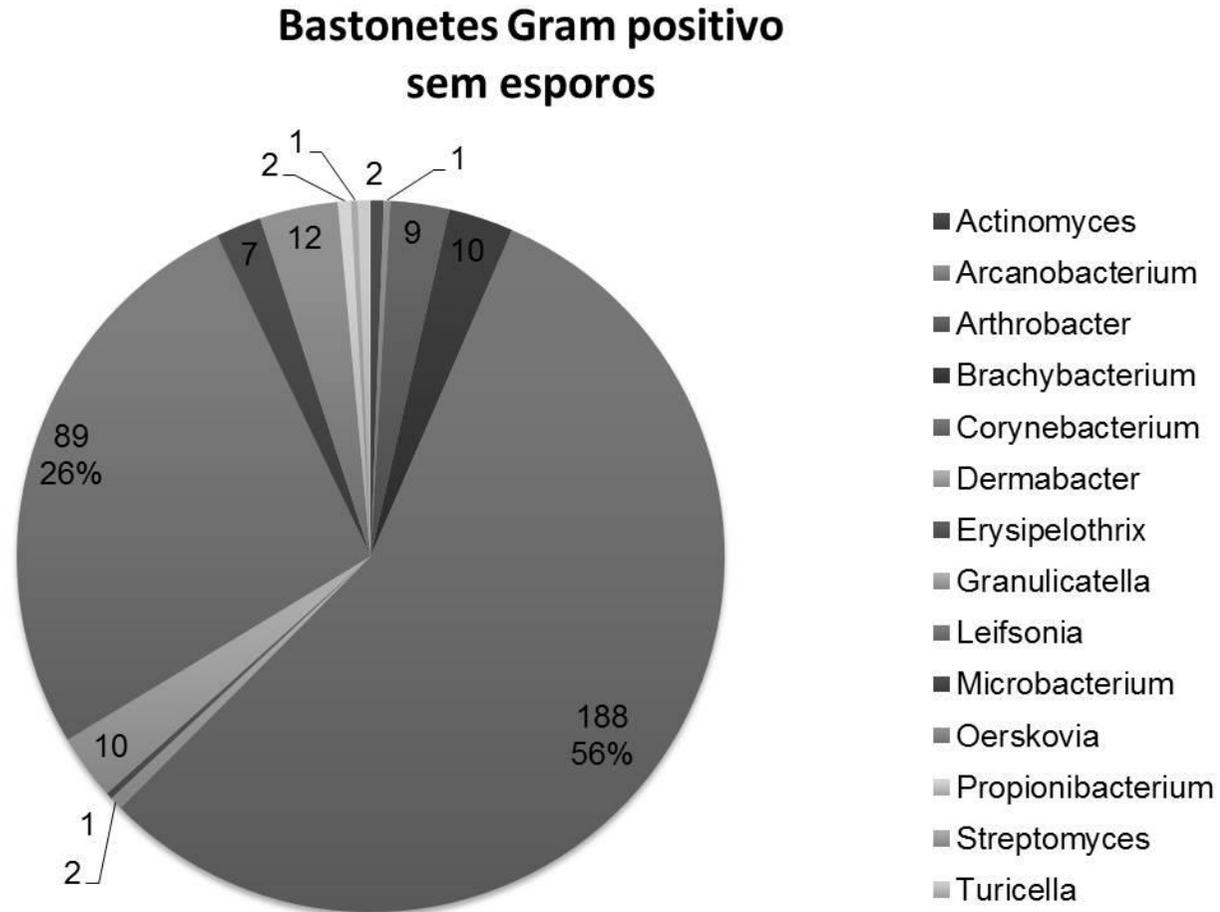
O gênero *Pseudomonas*, com 468 estirpes (35,22% do grupo GN), apresenta liderança na frequência de isolamento. Em seguida, foram observados os gêneros *Acinetobacter* (9,18% dos GN), *Stenotrophomonas* (7,30%), *Ralstonia* (5,87%), *Burkholderia* (5,72%) e *Enterobacter* (5,50%), para citar os mais frequentes (Figura 29). Os três gêneros mais frequentes (*Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas*) e o gênero *Enterobacter* já apresentam histórico de isolamento de 2010 a 2014, sendo encontrados em todos os anos. Entretanto, o gênero *Ralstonia* foi identificado somente a partir de 2013 e, em dois anos, já soma estirpes para constar como o quarto gênero GN mais frequente na Bacterioteca (Figura 29).

Estas mudanças (aumento do número de estirpes GN e aumento da diversidade de gêneros) podem estar atribuídas à melhoria das metodologias de identificação, às modificações nos meios de cultura utilizados no monitoramento de águas e ao aumento dos pontos de água monitorados. Entretanto, em relação às estirpes GN provenientes do monitoramento ambiental de amostras de ar e de operadores (cujos procedimentos, pontos de amostragem e meios utilizados não apresentaram grandes modificações), a diversidade e o número de estirpes também aumentaram em 2013 e 2014, sugerindo que as mudanças tenham sido evidenciadas pela melhoria dos métodos de identificação.

No perfil dos Bastonetes Gram positivos (BGP), a porcentagem das estirpes da Bacterioteca permaneceu quase a mesma: no período de 2008 a 2011, 12,6% das estirpes identificadas eram classificadas como BGP (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>); e, no período de 2010 a 2014, 13% se apresentavam como tal. A diferença ocorreu na divisão – até então inexistente – no grupo de BGP na Bacterioteca: o dos produtores de esporos (7%) e o dos não produtores desta estrutura (6%), conforme a Figura 6.

Dos BGP não formadores de esporos, o gênero *Corynebacterium* se mostra o mais frequentemente identificado (Figura 30), com 188 estirpes (56%), sendo o sexto gênero da Bacterioteca (Figura 26).

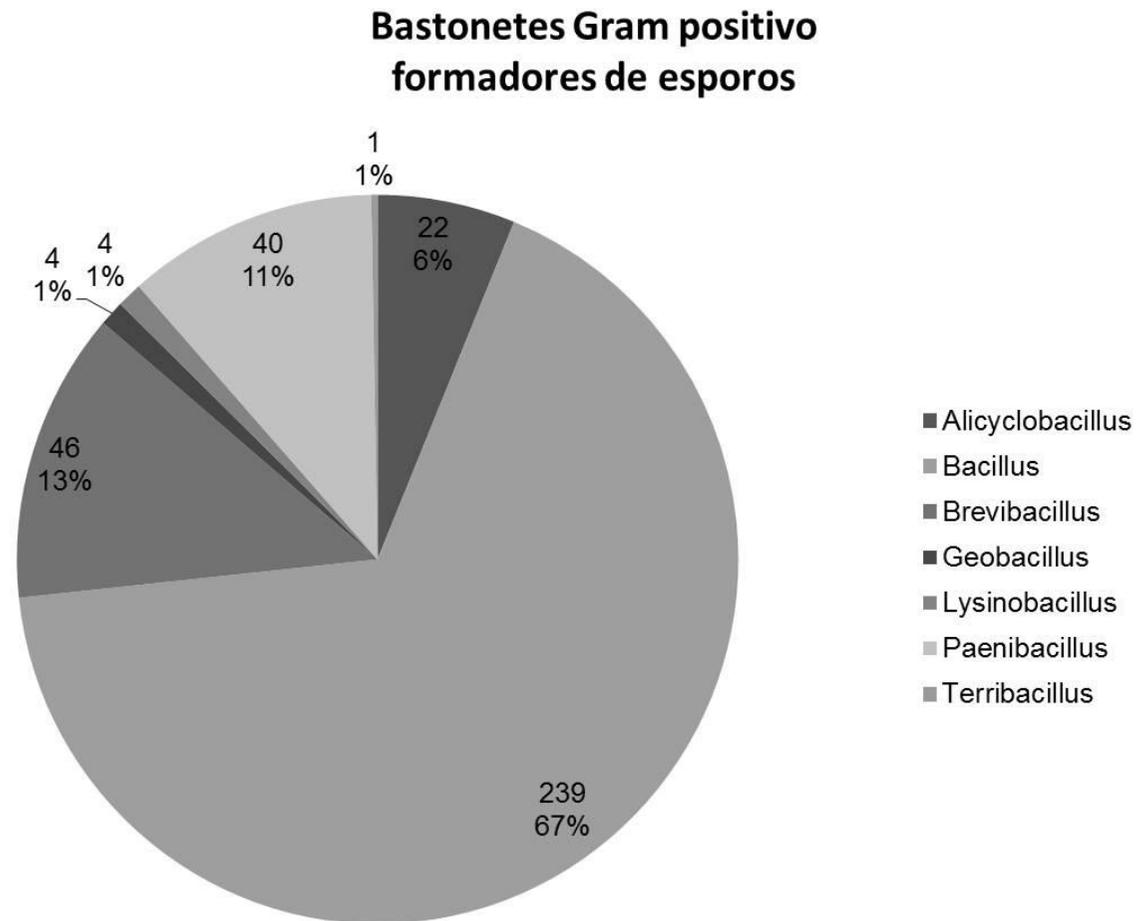
Figura 30 - Gêneros identificados entre os bastonetes Gram positivo não formadores de esporos ( 2010-2014)



Em seguida, o gênero *Leifsonia* (anteriormente pertencente ao gênero *Corynebacterium*) tem como representantes 89 estirpes (26%). Outros gêneros – *Brachybacterium* (10 estirpes) e *Arcanobacterium* (uma estirpe) – também eram pertencentes ao gênero *Corynebacterium*. Se todas as estirpes desses três novos gêneros (100 estirpes) fossem somadas às do *Corynebacterium* (188), este último gênero retornaria a sua posição no “ranking” estabelecido em 2011 (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>; MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>), como o quarto gênero mais frequente na Bacterioteca. Mais uma vez, há evidências do aumento do poder discriminatório dos métodos estabelecidos por meio do presente trabalho.

Nos BGP produtores de esporos, o gênero *Bacillus* permanece como o principal, representando 67% das estirpes desta categoria (Figura 31).

Figura 31 - Gêneros identificados entre os bastonetes Gram positivo formadores de esporos (2010-2014)



A taxonomia de BGP formadores de esporos é muito complexa e a sua identificação inequívoca representa um dos principais desafios enfrentados pelo controle de qualidade microbiológico de Bio-Manguinhos. A maioria das estirpes não identificadas na SEPIN pertence a este grupo. Dos gêneros identificados, o *Terribacillus* (com um único exemplar identificado na Bacterioteca, isolado em 2010) somente foi identificado por meio do kit MicroSEQ®, não estando este gênero representado nos Bancos de Dados dos outros sistemas de identificação avaliados. O gênero *Paenibacillus* teve duas estirpes em 2010 que foram identificadas também utilizando o kit MicroSEQ®. Entretanto, a partir de 2013, outras 38 estirpes do gênero *Paenibacillus* foram identificadas pelos sistemas VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO. Até 2012, pelo kit BBL Crystal, somente eram identificados os gêneros *Bacillus* e *Brevibacillus*. A partir de 2013, três outros gêneros foram identificados (*Alicyclobacillus*, *Geobacillus* e *Lysinobacillus*), pela introdução do VITEK 2 Compact e do VITEK MS RUO.

A presença de BGP formadores de esporos em áreas produtivas merece atenção quanto aos processos de limpeza e desinfecção, em particular das áreas classificadas (WHO, 2012; WHO, 2011). A eliminação eficiente de suas estruturas de resistência (esporos) requer escolha criteriosa de produtos desinfetantes com atividade esporicida comprovada, e a identificação correta destes micro-organismos permite o mapeamento do risco associado aos processos. Assim, o conhecimento da presença ou ausência deste grupo de micro-organismos nas áreas, assim como a sua frequência, é fundamental para conseguirmos manter a segurança dos processos em cada área (WHO, 2012, BRASIL, 2010).

Um dos objetivos da construção da Bacterioteca foi permitir esse estudo mais detalhado da microbiota encontrada em cada área de Bio-Manguinhos. O conhecimento e o mapeamento dos gêneros microbianos em áreas produtivas é uma estratégia de controle (por permitir análise de tendências), uma vez que dados referentes a este tipo de microbiota são praticamente inexistentes no mundo todo. Na busca de trabalhos sobre microbiota de “salas limpas”, foram encontradas muitas pesquisas em centros cirúrgicos e da Agencia Espacial Norte Americana (NASA). Para áreas farmacêuticas controladas, entretanto,

poucos são encontrados. Nesse aspecto, pode se considerar esta uma experiência bem sucedida, pois forneceu muitos dados acerca deste nicho.

Devido ao grande número de estirpes introduzidas a cada mês, a Bacterioteca da SEPIN apresenta um fluxo dinâmico de entrada e de descarte de parte do acervo anualmente. O prazo determinado para a manutenção das estirpes foi de cinco anos (por uma limitação física, uma vez que a SEPIN não possui infraestrutura exclusiva para coleções, que incluem equipamentos, áreas e funcionários). Dessa forma, a cada ano, serão selecionadas as estirpes de interesse em permanecer nas coleções e as outras serão descartadas. Os critérios de seleção deverão se basear na importância taxonômica da estirpe para a Bacterioteca, na origem da identificação (com ênfase para ingredientes farmacêuticos ativos, produtos intermediários e acabados), no ano do isolamento, assim como outros de interesse para a SEPIN.

Este descarte – assim como outros aspectos, como o fato de não haver manutenção em duas formas de preservação destas bactérias, equipe reduzida, ausência de área dedicadas, ausência de identificação polifásica das estirpes – fere algumas exigências preconizadas para Coleções Institucionais, impossibilitando a Bacterioteca a se transformar em uma destas coleções. A solução encontrada seria a criação de uma outra coleção – a COLECAO DE CULTURAS DE MICRO-ORGANISMOS AUTÓCTONES (CCMA) – na qual seriam depositadas somente as estirpes identificadas utilizando a abordagem polifásica, oriundos da Bacterioteca. Esta coleção, então, poderia constar como uma das coleções institucionalizadas da Fiocruz, seguindo as exigências determinadas. Entretanto, o presente trabalho apenas sugere tal criação, devendo esta ser uma decisão da Diretoria da Unidade, caso haja interesse, inclusive de prestação de serviços.

#### 4.2.1 Uso de padrões autóctones: procedimentos e aplicações

Com o intuito de se introduzir as cepas autóctones (*in house*) como padrões secundários nas validações dos processos de fabricação de injetáveis (*media fill*), assim como nos testes de promoção de crescimento realizados no Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos, foram selecionadas 12 estirpes bacterianas (Quadro 7), de acordo com sua incidência em cinco das principais áreas de produção em 2010, avaliada a partir da identificação fenotípica prévia (APÊNDICE I). Estas estirpes foram novamente submetidas às provas fenotípicas – identificação bioquímica, coloração de Gram, teste de KOH, produção de indol, oxidase e catalase – e a identificação genotípica, utilizando-se o kit MicroSEQ® 500 16S rDNA Bacterial Identification™.

Quadro 7- Cepas bacterianas candidatas a serem utilizadas como padrões autóctones

Identificação das estirpes	Procedência	Características morfo-tintoriais
B-287 ( <i>Providencia stuartii</i> )	Suspensão Viral	BGN
B-357 ( <i>Moraxella osloensis</i> )	Monitoramento do Ar	BGN
B-358 ( <i>Staphylococcus cohnii urealyticum</i> )	Monitoramento do Ar	CGP
B-359 ( <i>Moraxella osloensis</i> )	Monitoramento do Ar	BGN
B-614 ( <i>Micrococcus</i> sp)	Monitoramento do Ar	CGP
B-726 ( <i>Corynebacterium</i> sp)	Monitoramento do Ar	BGP
B-883 ( <i>Bacillus firmus</i> )	Monitoramento do Ar	BGP
B-985 ( <i>Staphylococcus</i> sp)	Monitoramento do Ar	CGP
B-986 ( <i>Micrococcus</i> sp)	Monitoramento do Ar	CGP
B-988 ( <i>Acinetobacter schindleri</i> )	Monitoramento do Ar	BGN
B-1024 ( <i>Staphylococcus</i> sp)	Monitoramento do Ar	CGP
B-1063 ( <i>Acinetobacter</i> sp)	Monitoramento do Ar	BGN

CGP=Cocos Gram positivos; BGP=Bastonetes Gram positivos; BGN=Bastonetes Gram negativos

Nos meios de cultura desafiados, o crescimento bacteriano foi detectado para todas as 12 estirpes, embora uma (*Moraxella osloensis* B-357) tenha apresentado uma turvação mais discreta dos meios testados, por apresentar necessidade de um tempo de cultivo maior. Essa turvação, entretanto, foi suficiente para a leitura do teste no período preconizado pelo procedimento referente a promoção de crescimento e o número de células viáveis se apresentou na faixa indicada para desafio, que é de 10 a 100 UFC (Dados não apresentados, sendo resultado dos laudos dos ensaios de promoção de crescimento nos meios de cultura da SEPIN). Destas 12 estirpes, foram gerados oito lotes de trabalho.

As oito cepas utilizadas para o preparo dos lotes trabalho foram implementadas com sucesso na promoção de crescimento dos meios de cultura preparados para *media fill* e teste de esterilidade. Quase 900 lotes de meios líquidos (caldo caseína, em especial) já foram avaliados com o uso dos padrões secundários (lotes de trabalho – Tabela 12). Este procedimento garantiu a conformidade de Bio-Manguinhos às exigências da Anvisa em relação às boas práticas de fabricação (WHO, 2012, BRASIL, 2010). Estes resultados foram apresentados em três eventos científicos, em 2010, 2011 e 2012 (MEDEIROS *et al.*, 2012, MATTOSO *et al.*, 2011, MEDEIROS *et al.*; 2010).

Tabela 12 - Quantitativo de lotes de meio de cultura avaliados com uso de padrões autóctones, no período de 2010 a 2014

LOTES DE TRABALHO	MEIOS LÍQUIDOS AVALIADOS 2010-2014	MEIOS SÓLIDOS AVALIADOS 2010-2014
B-287 ( <i>Providencia stuartii</i> )	Caldo Caseína (706 lotes)	TSARM/Count-Act (112 lotes)
B-358 ( <i>Staphylococcus cohnii urealyticum</i> )		
B-359 ( <i>Moraxella osloensis</i> )		
B-614 ( <i>Micrococcus</i> sp)	Caldo Tioglicolato (190 lotes)	TSA/TSNI (140 lotes)
B-726 ( <i>Corynebacterium</i> sp)		
B-883 ( <i>Bacillus firmus</i> )		
B-986 ( <i>Micrococcus</i> sp)		
B-988 ( <i>Acinetobacter schindleri</i> )		

TSA: Agar tripton de soja, TSARM: Agar tripton de soja modificado, TSNI: Agar tripton de soja irradiado com neutralizadores

#### 4.2.2 Mapeamento da distribuição das bactérias isoladas nos ambientes de produção (monitoramento ambiental/água) por área: gêneros em cada área de produção de Bio-Manguinhos, no período de 2010 a 2014

A distribuição da microbiota circulante foi estimada pela análise do BD (planilha Excel com os dados das estirpes) da Bacterioteca de Bio-Manguinhos (BD/Bacterioteca). Por meio desta primeira avaliação, puderam ser observados os gêneros de maior frequência de isolamento e a sua permanência/surgimento ao longo dos anos. Entretanto, ainda restavam dúvidas quanto à distribuição destes gêneros nas diversas áreas de produção da unidade, assim como nos processos produtivos.

Para facilitar esta análise e tentar chegar a um perfil por área, foram destacadas as seis áreas produtivas de maior importância, denominadas de área 1 a área 6. O compilado da microbiota destas seis áreas foi apresentado na Tabela 13 e consiste em 1.823 estirpes.

Tabela 13 - Distribuição entre as Áreas e a Bacterioteca

Bacterioteca N=5.842	Área 1 N=474	Área 2 N=346	Área 3 N=121	Área 4 N=603	Área 5 N=194	Área 6 N=85
<i>Staphylococcus</i> (29%)	<i>Staphylococcus</i> (25,53%)	<i>Staphylococcus</i> (33,82%)	<i>Staphylococcus</i> (16,53%)	<i>Staphylococcus</i> (38,97%)	<i>Staphylococcus</i> (55,67%)	<i>Staphylococcus</i> (29,41%)
<i>Micrococcus</i> (14%)	<i>Micrococcus</i> (20,47%)	<i>Micrococcus</i> (25,72%)	<i>Ralstonia</i> (14,05%)	<i>Micrococcus</i> (26,20%)	<i>Micrococcus</i> (17,01%)	<i>Micrococcus</i> (23,53%)
<i>Pseudomonas</i> (10%)	<i>Enterobacter</i> (9,92%)	<i>Corynebacterium</i> (5,78%)	<i>Pseudomonas</i> (12,4%)	<i>Corynebacterium</i> (5,47%)	<i>Bacillus</i> (5,67%)	<i>Corynebacterium</i> (15,30%)
<i>Bacillus</i> (5%)	<i>Pseudomonas</i> (6,12%)	<i>Bacillus</i> (3,76%) e <i>Kytococcus</i> (3,76%)	<i>Micrococcus</i> (11,57%)	<i>Bacillus</i> (4,65%)	<i>Corynebacterium</i> (2,58%), <i>Enterobacter</i> (2,58%) e <i>Kytococcus</i> (2,58%)	<i>Bacillus</i> (9,41%)
<i>Enterococcus</i> (5%)	<i>Corynebacterium</i> (5,48%)		<i>Bacillus</i> e <i>Kocuria</i> (4,96% cada)	<i>Chryseobacterium</i> (3,32%)		<i>Streptococcus</i> (5,88%)
<i>Corynebacterium</i> (4%)	<i>Burkholderia</i> (4,01%)	<i>Leifsonia</i> (3,18%)		<i>Kytococcus</i> e <i>Pseudomonas</i> (1,83% cada)		<i>Alicyclobacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> e <i>Sphingomonas</i> (2,35% cada)
E mais 75 gêneros (33%)	E mais 29 gêneros(28,47%)	E mais 31 gêneros (23,98%)	E mais 18 gêneros (40,49%)	E mais 33 gêneros (17,73%)	E mais 11 gêneros (13,91%)	E mais 8 gêneros(9,42%)

Todas as áreas avaliadas (com exceção da área 6) apresentam um sistema de águas próprio (1 a 5) e a microbiota isolada a partir do monitoramento ambiental (amostras do ar e de operadores) e do monitoramento de águas (água para injetáveis, vapor puro e água purificada) foi analisada como pertencente ao ambiente produtivo e utilizada para caracterizar a composição da microbiota das referidas áreas (1 a 6).

Em cada área avaliada, os resultados foram apresentados da seguinte maneira: todas as bactérias isoladas (contagem geral e por ano), as isoladas em amostras de monitoramento ambiental e as isoladas a partir de amostras de monitoramento de águas. O mapeamento por área é interessante para avaliações de risco e para acompanhamento da introdução de novos gêneros.

Durante a avaliação do período citado (2010 a 2014), o ano de 2014 (janeiro a agosto) foi caracterizado pela pouca produção de lotes de produtos (vacinas e biofármacos) em decorrência das diversas obras e melhorias de processos/áreas que ocorreram a partir do final do ano de 2013, em todas as áreas produtivas de Bio-Manguinhos. Por consequência da parada de produção pelas obras, a quantidade de amostras obtidas em procedimentos de monitoramento ambiental (de ar e de operadores) praticamente chegou a zero, uma vez que este procedimento está associado a áreas que estejam em processo de produção. O monitoramento dos pontos de água, entretanto, se manteve durante o ano de 2014. Dessa forma, na análise da microbiota obtida pelo monitoramento ambiental (ar e operadores), os dados relacionados ao ano de 2014 foram considerados, mas não representaram o funcionamento normal de cada área.

Na avaliação dos gêneros por área, somente foi possível a análise de frequência de isolamento e de mudanças ao longo no período, não sendo possível realizar inferências em relação aos motivos/fatores que poderiam influenciar esta microbiota, por desconhecimento das particularidades que cada área apresenta e dos eventos que ocorreram nestas.

#### 4.2.2.1 Área 1

Esta área pode ser considerada a área de produção mais antiga de Bio-Manguinhos. Geograficamente, é a mais isolada das áreas produtivas. Todavia, o processo produtivo iniciado nesta área tem continuidade nas áreas 4 ou 5. Alocada em um prédio antigo, tombado pelo patrimônio histórico, apresentou diversas limitações em relação às atuais exigências para uma área de produção, que foram ajustadas com obras.

Dentre todas as áreas avaliadas, esta foi a que se manteve em produção quase continua durante todo o período avaliado, parando por períodos curtos para reformas e/ou intervenções.

Em relação ao total de estirpes no período analisado, foram identificados 35 gêneros (N=474), sendo 18 de GN, quatro de BGP produtor de esporos, 10 de CGP e três de BGP não produtor de esporos (Quadro 8).

O gênero *Staphylococcus* (N=121) foi o que apresentou maior número de estirpes, sendo seguido por *Micrococcus* (N=97), *Enterobacter* (N=47), *Pseudomonas* (N=29), *Corynebacterium* (N=26) e *Burkholderia* (N=19), para citar os mais frequentes, conforme o Quadro 8. Estes seis gêneros representam mais de 70% da microbiota bacteriana isolada na Área 1.

Quadro 8 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 1 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	Total
GN	<i>Acinetobacter</i>	14
	<i>Agrobacterium</i>	1
	<i>Brevundimonas</i>	13
	<i>Burkholderia</i>	19
	<i>Chryseobacterium</i>	2
	<i>Delftia</i>	2
	<i>Enterobacter</i>	47
	<i>Escherichia</i>	1
	<i>Flavimonas</i>	2
	<i>Gardnerella</i>	2
	<i>Klebsiella</i>	4
	<i>Pantoea</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	29
	<i>Ralstonia</i>	2
	<i>Serratia</i>	2
	<i>Sphingomonas</i>	3
	<i>Sphingobacterium</i>	2
<i>Stenotrophomonas</i>	3	
BGP (esporo)	<i>Alycycobacillus</i>	1
	<i>Bacillus</i>	7
	<i>Brevibacillus</i>	14
	<i>Paenibacillus</i>	2
CGP	<i>Aerococcus</i>	3
	<i>Gemella</i>	1
	<i>Enterococcus</i>	9
	<i>Rhodococcus</i>	1
	<i>Kocuria</i>	5
	<i>Kytococcus</i>	7
	<i>Leuconostoc</i>	1
	<i>Staphylococcus</i>	121
	<i>Streptococcus</i>	16
	<i>Micrococcus</i>	97
BGP	<i>Oerskovia</i>	1
	<i>Corynebacterium</i>	26
	<i>Leifsonia</i>	13

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos

Outros trabalhos também apontam o gênero *Staphylococcus* como o mais incidente entre as estirpes isoladas a partir do controle de qualidade de ambientes de produção (PEREIRA, 2009, UTESCHER *et al.*, 2007, WU e LIU, 2007).

Ao comparar estes resultados com o total da Bacterioteca (Tabela 14), a prevalência de estirpes dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* já era esperada, por representarem mais de 40% das estirpes preservadas nesta coleção. Todavia, o gênero *Enterobacter* constar como o terceiro mais frequente neste “ranking” foi um achado distinto do perfil da Bacterioteca, na qual sua frequência foi estimada em 2% do acervo. A mesma observação foi apontada para o gênero *Burkholderia*, o sexto mais frequente nesta área.

Tabela 14 - Gêneros das estirpes identificadas: Bacterioteca X Área 1

Bacterioteca 2008-2011*	Bacterioteca 2010-2014	Área 1 2010-2014
<i>Staphylococcus</i> (32,06%)	<i>Staphylococcus</i> (29%)	<i>Staphylococcus</i> (25,53%)
<i>Micrococcus</i> (26,23%)	<i>Micrococcus</i> (14%)	<i>Micrococcus</i> (20,47%)
<i>Bacillus</i> (7,11%)	<i>Pseudomonas</i> (10%)	<i>Enterobacter</i> (9,92%)
<i>Corynebacterium</i> (6,6%)	<i>Bacillus</i> (5%)	<i>Pseudomonas</i> (6,12%)
<i>Leifsonia</i> (3,98%)	<i>Enterococcus</i> (5%)	<i>Corynebacterium</i> (5,48%)
<i>Pseudomonas</i> (3,55%)	<i>Corynebacterium</i> (4%)	<i>Burkholderia</i> (4,01%)

\*Dados extraídos de trabalhos previamente apresentados (MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>)

Para tentar entender o fato do gênero *Enterobacter* estar em uma posição destacada na frequência de isolamentos desta área, foi realizada uma análise, ano a ano, da frequência de cada gênero (Quadro 9). Do período analisado, o ano de 2012 apresentou um perfil completamente distinto dos outros três anos: a predominância de gêneros de bactérias GN, sendo o gênero *Enterobacter* (n=35) o de isolamento mais frequente, superando o número de estirpes dos gêneros *Staphylococcus* (n=22) e *Micrococcus* (n=16) inclusive. O gênero *Burkholderia* (n=18) e o gênero *Pseudomonas* (n=17) aparecem em terceiro e quarto lugar, respectivamente, no “ranking” de 2012. Estes três

gêneros de GN representaram 48,96% do total de isolamentos nesta área, em 2012.

Durante a análise das fontes de isolamento destas estirpes de *Enterobacter* spp., o sistema de água foi evidenciado como a origem do isolamento (Quadro 10). Todas as 47 estirpes eram oriundas de amostras obtidas no ponto de água purificada (PW) da área. Sendo *Enterobacter* um dos gêneros do grupo Coliforme, este resultado aponta a inadequação da qualidade microbiológica desta água, no ano de 2012. Ademais, Souto (2008) relata a detecção e o isolamento de espécies deste gênero (*E. intermedius* e *E. cloacae*) e de *Pantoea agglomerans* (anteriormente classificada como pertencente ao gênero *Enterobacter*) em testes de esterilidade para produto injetável. A presença deste gênero na área 1, portanto, pode representar um risco biológico associado. Apesar deste ponto de água não ter seu uso associado ao processo produtivo de maneira direta, este aspecto sanitário foi evidenciado e corrigido, por meio de sanitizações no sistema de água.

Para verificar se a frequência de estirpes do gênero *Enterobacter* se mantinha elevada, foram observados os resultados dos anos de 2013 e 2014 para o mesmo ponto de água. Houve uma drástica queda no ano de 2013 (sete estirpes) e, até agosto de 2014, somente uma estirpe foi identificada em amostras de PW nesta área (Quadro 9). Importante ressaltar que esta área teve sucessivas sanitizações (como uma ação corretiva resultante da comprovação deste desvio), uma grande obra em 2013 e teve todo seu sistema de água substituído.

As estirpes obtidas a partir do monitoramento ambiental, tanto de amostras de ar quanto de operadores, estão organizadas no Quadro 11.

Quadro 9 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 1 (2010 a 2014)

<b>Gênero</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014*</b>	<b>Total</b>
<i>Acinetobacter</i>	5		2	1	6	14
<i>Aerococcus</i>		1	2			3
<i>Alyclicobacillus</i>					1	1
<i>Agrobacterium</i>	1					1
<i>Bacillus</i>	4	3				7
<i>Brevibacillus</i>	10	3			1	14
<i>Brevundimonas</i>	1	6	5	1		13
<i>Burkholderia</i>			18	1		19
<i>Chryseobacterium</i>			2			2
<i>Corynebacterium</i>	11	7	7	1		26
<i>Delftia</i>					2	2
<i>Enterobacter</i>		4	35	7	1	47
<i>Enterococcus</i>			6	1	2	9
<i>Escherichia</i>				1		1
<i>Flavimonas</i>			2			2
<i>Gardnerella</i>	1	1				2
<i>Gemella</i>		1				1
<i>Klebsiella</i>			4			4
<i>Kocuria</i>				2	3	5
<i>Kytococcus</i>	4	2		1		7
<i>Leifsonia</i>	8	3	2			13
<i>Leuconostoc</i>			1			1
<i>Micrococcus</i>	47	16	16	9	9	97
<i>Oerskovia</i>	1					1
<i>Pantoea</i>	1					1
<i>Paenibacillus</i>					2	2
<i>Pseudomonas</i>	5	3	17	4		29
<i>Ralstonia</i>					2	2
<i>Rhodococcus</i>	1					1
<i>Serratia</i>			2			2
<i>Sphingobacterium</i>					2	2
<i>Sphingomonas</i>				3		3
<i>Staphylococcus</i>	43	19	22	15	22	121
<i>Stenotrophomonas</i>	3					3
<i>Streptococcus</i>	12	4				16
<b>Total</b>	<b>158</b>	<b>73</b>	<b>143</b>	<b>47</b>	<b>53</b>	<b>474</b>

2014\* considerado até agosto de 2014

Quadro 10 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimento de monitoramento de águas (WFI e PW) na área 1 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	WFI	PW	Total
GN	<i>Acinetobacter</i>	0	7	7
	<i>Agrobacterium</i>	0	0	0
	<i>Brevundimonas</i>	1	3	4
	<i>Burkholderia</i>	0	18	18
	<i>Chryseobacterium</i>	0	2	2
	<i>Delftia</i>	0	2	2
	<i>Enterobacter</i>	0	47	47
	<i>Escherichia</i>	0	0	0
	<i>Flavimonas</i>	0	1	1
	<i>Gardnerella</i>	0	1	1
	<i>Klebsiella</i>	0	4	4
	<i>Pantoea</i>	0	0	0
	<i>Pseudomonas</i>	1	18	19
	<i>Ralstonia</i>	0	2	2
	<i>Serratia</i>	0	2	2
	<i>Sphingomonas</i>	1	1	2
	<i>Sphingobacterium</i>	0	2	2
<i>Stenotrophomonas</i>	0	1	1	
BGP (esporo)	<i>Alycicobacillus</i>	0	0	0
	<i>Bacillus</i>	0	0	0
	<i>Brevibacillus</i>	0	1	1
	<i>Paenibacillus</i>	0	0	0
CGP	<i>Aerococcus</i>	0	0	0
	<i>Gemella</i>	0	0	0
	<i>Enterococcus</i>	0	9	9
	<i>Rhodococcus</i>	0	0	0
	<i>Kocuria</i>	1	1	2
	<i>Kytococcus</i>	0	0	0
	<i>Leuconostoc</i>	0	0	0
	<i>Staphylococcus</i>	3	4	7
	<i>Streptococcus</i>	0	0	0
	<i>Micrococcus</i>	0	0	0
BGP	<i>Oerskovia</i>	0	0	0
	<i>Corynebacterium</i>	0	5	5
	<i>Leifsonia</i>	0	2	2

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos, WFI= água para injetáveis, PW= água purificada

Como já observado em outros trabalhos (MARTIN *et al.*, 2012, COBO *et al.*, 2006, ABREU *et al.*, 2003), as bactérias Gram positivas constituem a maioria das bactérias isoladas, sendo os gêneros *Staphylococcus* (34,13% das estirpes obtidas a partir de amostras do monitoramento do ar e dos operadores nesta área) e *Micrococcus* (29,04%) mais preponderantes (Quadro 11), estando esse resultado em concordância com outros relatos em áreas de produção farmacêutica, que apontam o gênero *Staphylococcus* como o mais frequentemente isolado (PEREIRA, 2009, UTESCHER *et al.*, 2007, WU; LIU, 2007).

Quadro 11 – Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 1

Gram	Gênero	Número estirpes
GN	<i>Acinetobacter</i>	8
	<i>Agrobacterium</i>	1
	<i>Brevundimonas</i>	13
	<i>Burkholderia</i>	19
	<i>Chryseobacterium</i>	2
	<i>Delftia</i>	0
	<i>Enterobacter</i>	6
	<i>Escherichia</i>	1
	<i>Flavimonas</i>	2
	<i>Gardnerella</i>	2
	<i>Klebsiella</i>	4
	<i>Pantoea</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	29
	<i>Ralstonia</i>	0
	<i>Serratia</i>	2
	<i>Sphingomonas</i>	4
	<i>Sphingobacterium</i>	0
	<i>Stenotrophomonas</i>	2
	BGP (esporo)	<i>Alycycobacillus</i>
<i>Bacillus</i>		7
<i>Brevibacillus</i>		13
<i>Paenibacillus</i>		2
CGP	<i>Aerococcus</i>	3
	<i>Gemella</i>	1
	<i>Enterococcus</i>	0
	<i>Rhodococcus</i>	1
	<i>Kocuria</i>	4
	<i>Kytococcus</i>	7
	<i>Leuconostoc</i>	1
	<i>Staphylococcus</i>	120
	<i>Streptococcus</i>	16
	<i>Micrococcus</i>	97
BGP	<i>Oerskovia</i>	1
	<i>Corynebacterium</i>	26
	<i>Leifsonia</i>	13

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos

#### 4.2.2.2 Área 2

Esta área apresenta proximidade geográfica com outras duas (áreas 3 e 4), sendo que parte dos processos realizados na área 2 são finalizados na área 4. Entretanto, apresentam separações físicas e barreiras sanitárias bem estabelecidas. Suas instalações são específicas para áreas produtivas classificadas, tendo fluxograma de processos e trânsito de funcionários e materiais definidos.

O perfil de gêneros bacterianos observados na área 2 apresentou *Staphylococcus* (N=117) como o de maior frequência de isolamento, seguido por *Micrococcus* (N=89), *Corynebacterium* (N=20), *Bacillus* (N=13), *Kytococcus* (N=13) e *Leifsonia* (N=11) (Quadro 12).

Foram identificados 37 gêneros distintos nesta área, no período de 2010 a 2014. Entretanto, os seis gêneros mais identificados representam 76,02% da microbiota bacteriana isolada (na área 2) nestes cinco anos de estudo e somente os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*, juntos, representam 59,54% deste total. Das 346 estirpes isoladas no período analisado, 306 (88,44%) pertenciam ao grupo Gram positivo, caracterizando a predominância de estirpes GP na área 2.

Na análise da distribuição dos gêneros por ano (Quadro 13), foi observado que o ano de 2011 apresentou o maior número de estirpes isoladas (n=188), representando 54,34% do total identificado nos cinco anos avaliados. Como este foi o ano em que esta área esteve em produção ativa, é provável que este resultado esteja associado a um maior número de amostragens realizadas, principalmente do monitoramento ambiental, aumentando naturalmente o número de isolamentos e identificações.

A observação concreta que se pode extrair destes resultados é que o gênero *Micrococcus* (N=68) superou o número de estirpes do gênero *Staphylococcus* (N=41) em 2011, sendo portanto o mais frequente neste ano na área 2. Todavia, nos outros quatro anos avaliados, *Staphylococcus* spp. se manteve como o mais frequente.

A elevada frequência de estirpes de *Staphylococcus* spp. também foi observada a partir de amostras de WFI (*Water For Injection*, ou água para

injetáveis, sendo um dos graus farmacêuticos de água, segundo BRASIL, 2010) oriundas do Monitoramento de Águas. Entretanto, o mesmo não foi observado para as amostras de PW (*Purified Water*, ou água purificada), das quais o gênero mais frequentemente isolado foi *Pseudomonas* spp. (Quadro 14).

As estirpes obtidas a partir do monitoramento ambiental, tanto de amostras de ar quanto de operadores, estão organizadas no Quadro 15.

Quadro 12 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 2 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	Total
GN	<i>Acinetobacter</i>	3
	<i>Brevundimonas</i>	4
	<i>Burkholderia</i>	1
	<i>Citrobacter</i>	1
	<i>Gardnerella</i>	4
	<i>Klebsiella</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	8
	<i>Ralstonia</i>	1
	<i>Serratia</i>	1
	<i>Sphingomonas</i>	3
	<i>Vibrio</i>	1
	<i>Stenotrophomonas</i>	2
	<i>Moraxella</i>	5
	<i>Sphingobacterium</i>	4
	<i>Shewanella</i>	1
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	13
	<i>Brevibacillus</i>	3
	<i>Paenibacillus</i>	1
	<i>Alycyclobacillus</i>	1
BGP	<i>Arcanobacterium</i>	1
	<i>Corynebacterium</i>	20
	<i>Leifsonia</i>	11
	<i>Oerskovia</i>	4
	<i>Microbacterium</i>	6
	<i>Brachybacterium</i>	4
	<i>Dermabacter</i>	2
	<i>Granulicatella</i>	1
CGP	<i>Aerococcus</i>	2
	<i>Alloiococcus</i>	1
	<i>Gemella</i>	7
	<i>Kocuria</i>	6
	<i>Kytococcus</i>	13
	<i>Micrococcus</i>	89
	<i>Pediococcus</i>	1
	<i>Rothia</i>	1
	<i>Staphylococcus</i>	117
	<i>Streptococcus</i>	2

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos

Quadro 13 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 2 (2010 a 2014)

<b>Gênero</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014*</b>	<b>Total</b>
<i>Acinetobacter</i>		1		2		3
<i>Aerococcus</i>		2				2
<i>Alloicoccus</i>		1				1
<i>Arcanobacterium</i>		1				1
<i>Bacillus</i>	1	7	3	2		13
<i>Brevibacillus</i>		2		1		3
<i>Brevundimonas</i>		2			2	4
<i>Burkholderia</i>			1			1
<i>Citrobacter</i>			1			1
<i>Corynebacterium</i>		19	1			20
<i>Gardnerella</i>		4				4
<i>Gemella</i>		7				7
<i>Klebsiella</i>			1			1
<i>Kocuria</i>		1			5	6
<i>Kytococcus</i>		9			4	13
<i>Leifsonia</i>		11				11
<i>Micrococcus</i>	1	68	1	1	18	89
<i>Oerskovia</i>		4				4
<i>Paenibacillus</i>		1				1
<i>Pediococcus</i>		1				1
<i>Pseudomonas</i>	1	2	4	1		8
<i>Ralstonia</i>				1		1
<i>Rothia</i>		1				1
<i>Serratia</i>			1			1
<i>Sphingomonas</i>			1	2		3
<i>Staphylococcus</i>		41	7	6	63	117
<i>Stenotrophomonas</i>			2			2
<i>Streptococcus</i>		2				2
<i>Vibrio</i>		1				1
<i>Microbacterium</i>					6	6
<i>Moraxella</i>					5	5
<i>Sphingobacterium</i>					4	4
<i>Brachybacterium</i>					4	4
<i>Dermabacter</i>					2	2
<i>Alycyclobacillus</i>					1	1
<i>Granulicatella</i>					1	1
<i>Shewanella</i>			1			1
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>188</b>	<b>24</b>	<b>16</b>	<b>115</b>	<b>346</b>

2014\* considerado até agosto de 2014

Quadro 14 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento de águas na área 2 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	WFI	PW	Total
GN	<i>Acinetobacter</i>	2	0	2
	<i>Brevundimonas</i>	0	1	1
	<i>Burkholderia</i>	1	0	1
	<i>Citrobacter</i>	1	0	1
	<i>Gardnerella</i>	0	1	1
	<i>Klebsiella</i>	0	1	1
	<i>Pseudomonas</i>	1	5	6
	<i>Ralstonia</i>	0	1	1
	<i>Serratia</i>	0	1	1
	<i>Sphingomonas</i>	2	1	3
	<i>Vibrio</i>	1	0	1
	<i>Stenotrophomonas</i>	0	2	2
	<i>Moraxella</i>	0	0	0
	<i>Sphingobacterium</i>	0	0	0
	<i>Shewanella</i>	0	0	0
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	3	0	3
	<i>Brevibacillus</i>	1	0	1
	<i>Paenibacillus</i>	0	1	1
	<i>Alycyclobacillus</i>	0	0	0
BGP	<i>Arcanobacterium</i>	0	0	0
	<i>Corynebacterium</i>	0	2	2
	<i>Leifsonia</i>	1	0	1
	<i>Oerskovia</i>	0	0	0
	<i>Microbacterium</i>	0	0	0
	<i>Brachybacterium</i>	0	0	0
	<i>Dermabacter</i>	0	0	0
	<i>Granulicatella</i>	0	0	0
CGP	<i>Aerococcus</i>	1	0	1
	<i>Alloiococcus</i>	0	0	0
	<i>Gemella</i>	0	0	0
	<i>Kocuria</i>	0	0	0
	<i>Kytococcus</i>	0	0	0
	<i>Micrococcus</i>	2	0	2
	<i>Pediococcus</i>	0	0	0
	<i>Rothia</i>	0	0	0
	<i>Staphylococcus</i>	12	0	12
	<i>Streptococcus</i>	0	0	0

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos

Quadro 15 – Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 2

Gram	Gênero	Total
GN	<i>Acinetobacter</i>	1
	<i>Brevundimonas</i>	3
	<i>Burkholderia</i>	0
	<i>Citrobacter</i>	0
	<i>Gardnerella</i>	3
	<i>Klebsiella</i>	0
	<i>Pseudomonas</i>	2
	<i>Ralstonia</i>	0
	<i>Serratia</i>	0
	<i>Sphingomonas</i>	0
	<i>Vibrio</i>	0
	<i>Stenotrophomonas</i>	0
	<i>Moraxella</i>	5
	<i>Sphingobacterium</i>	4
	<i>Shewanella</i>	1
BGP esporo	<i>Bacillus</i>	10
	<i>Brevibacillus</i>	2
	<i>Paenibacillus</i>	0
	<i>Alycyclobacillus</i>	1
BGP	<i>Arcanobacterium</i>	1
	<i>Corynebacterium</i>	18
	<i>Leifsonia</i>	10
	<i>Oerskovia</i>	4
	<i>Microbacterium</i>	6
	<i>Brachybacterium</i>	4
	<i>Dermabacter</i>	2
	<i>Granulicatella</i>	1
CGP	<i>Aerococcus</i>	1
	<i>Alloiococcus</i>	1
	<i>Gemella</i>	7
	<i>Kocuria</i>	6
	<i>Kytococcus</i>	13
	<i>Micrococcus</i>	87
	<i>Pediococcus</i>	1
	<i>Rothia</i>	1
	<i>Staphylococcus</i>	105
	<i>Streptococcus</i>	2

GN= Gram negativos, BGP esporo=bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos

#### 4.2.2.3 Área 3

Esta área permaneceu por muito tempo inoperante, por estar em obras de manutenção e melhorias.

Foram identificados 24 gêneros distribuídos em 121 estirpes bacterianas durante o período de 2010 a 2014.

O gênero *Staphylococcus* apresentou o maior número de estirpes (N=20), sendo seguido por *Ralstonia* (N=17), *Pseudomonas* (N=15) e *Micrococcus* (N=14). Os gêneros *Bacillus* e *Kocuria* apresentaram o mesmo número de estirpes (N=6), ocupando a quinta posição no “ranking” de frequência na área 3 (Quadro 16).

Assim como nas áreas anteriores, o gênero *Staphylococcus* foi o mais frequentemente identificado. O gênero *Ralstonia* chamou atenção por ocupar a segunda posição em frequência. Conforme já foi citado, este gênero foi identificado na microbiota circulante em Bio-Manguinhos somente a partir de 2013. Em dois anos, foram isoladas nesta área 17 estirpes pertencentes a este gênero – 10 estirpes em 2013 e 7 em 2014 – assumindo uma posição de destaque na microbiota da área 3 (Quadro 17). Em 2012, o gênero *Pseudomonas* se apresentou como o gênero de GN de maior frequência.

Quadro 16 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 3 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	Total
GN	<i>Acinetobacter</i>	4
	<i>Brevundimonas</i>	4
	<i>Burkholderia</i>	1
	<i>Chryseobacterium</i>	3
	<i>Comamonas</i>	1
	<i>Delftia</i>	1
	<i>Flavibacterium</i>	2
	<i>Flavimonas</i>	2
	<i>Pseudomonas</i>	15
	<i>Ralstonia</i>	17
	<i>Serratia</i>	3
	<i>Sphingomonas</i>	3
	<i>Stenotrophomonas</i>	5
	<i>Yersinia</i>	2
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	6
	<i>Alycyclobacillus</i>	1
	<i>Brevibacillus</i>	3
BGP	<i>Granulicatella</i>	1
	<i>Leifsonia</i>	5
CGP	<i>Streptococcus</i>	1
	<i>Staphylococcus</i>	20
	<i>Enterococcus</i>	1
	<i>Kocuria</i>	6
	<i>Micrococcus</i>	14

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos

Quadro 17 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 3 (2010 a 2014)

Gênero	2010	2011	2012	2013	2014*	Total
<i>Acinetobacter</i>			1	2	1	4
<i>Alycyclobacillus</i>					1	1
<i>Bacillus</i>				2	4	6
<i>Brevibacillus</i>					3	3
<i>Brevundimonas</i>		1	3			4
<i>Burkholderia</i>				1		1
<i>Chryseobacterium</i>		2	1			3
<i>Comamonas</i>					1	1
<i>Delftia</i>				1		1
<i>Enterococcus</i>				1		1
<i>Flavibacterium</i>			2			2
<i>Flavimonas</i>			1	1		2
<i>Granulicatella</i>				1		1
<i>Kocuria</i>				6		6
<i>Leifsonia</i>		4	1			5
<i>Micrococcus</i>	1	4		7	2	14
<i>Pseudomonas</i>		3	8	4		15
<i>Ralstonia</i>				10	7	17
<i>Serratia</i>				3		3
<i>Sphingomonas</i>				3		3
<i>Staphylococcus</i>	1	4		11	4	20
<i>Stenotrophomonas</i>			2	3		5
<i>Streptococcus</i>			1			1
<i>Yersinia</i>			2			2
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>18</b>	<b>22</b>	<b>56</b>	<b>23</b>	<b>121</b>

2014\* considerado até agosto de 2014

Ao observar a fonte de isolamento de *Ralstonia* spp. na área 3, foi observado que as estirpes foram obtidas a partir de amostras do monitoramento de águas, tanto de amostras de WFI quanto de PW (Quadro 18). Contudo, o número de estirpes a partir de WFI foi maior. Essa tendência aponta para a necessidade de um acompanhamento cuidadoso desse ponto do sistema de água, uma vez que este micro-organismo já foi associado à contaminação de um produto de uso endovenoso, causando a morte de dois recém-nascidos e a causa de um choque séptico em um adulto em hospitais no Rio de Janeiro (Moreira *et al.*, 2005).

Quadro 18 – Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento de águas na área 3 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	WFI	PW	Total
GN	<i>Acinetobacter</i>	2	1	3
	<i>Brevundimonas</i>	0	4	4
	<i>Burkholderia</i>	0	0	0
	<i>Chryseobacterium</i>	1	2	3
	<i>Comamonas</i>	1	0	1
	<i>Delftia</i>	0	0	0
	<i>Flavibacterium</i>	1	1	2
	<i>Flavimonas</i>	0	2	2
	<i>Pseudomonas</i>	0	1	1
	<i>Ralstonia</i>	12	5	17
	<i>Serratia</i>	0	3	3
	<i>Sphingomonas</i>	0	1	1
	<i>Stenotrophomonas</i>	0	4	4
	<i>Yersinia</i>	0	0	0
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	0	0	0
	<i>Alycyclobacillus</i>	1	0	0
	<i>Brevibacillus</i>	2	1	3
BGP	<i>Granulicatella</i>	0	0	0
	<i>Leifsonia</i>	0	1	1
CGP	<i>Streptococcus</i>	0	1	1
	<i>Staphylococcus</i>	3	0	3
	<i>Enterococcus</i>	0	1	1
	<i>Kocuria</i>	0	0	0
	<i>Micrococcus</i>	0	0	0

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos, WFI= água para injetáveis, PW=água purificada

Apesar das estirpes de *Pseudomonas* spp. detectadas predominantemente em pontos de PW, a presença no sistema de água e a sua frequência de isolamento também devem servir de alerta para a área 3, uma vez que este gênero foi associado também à contaminação de produtos injetáveis, inclusive havendo relato de produtos reprovados no teste de esterilidade do INCQS (Souto, 2008).

As estirpes obtidas a partir do monitoramento ambiental, tanto de amostras de ar quanto de operadores, estão organizadas no Quadro 19.

Quadro 19 – Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 3

Gram	Gênero	Número estirpes
GN	<i>Acinetobacter</i>	1
	<i>Brevundimonas</i>	0
	<i>Burkholderia</i>	1
	<i>Chryseobacterium</i>	0
	<i>Comamonas</i>	0
	<i>Delftia</i>	1
	<i>Flavibacterium</i>	0
	<i>Flavimonas</i>	0
	<i>Pseudomonas</i>	2
	<i>Ralstonia</i>	0
	<i>Serratia</i>	0
	<i>Sphingomonas</i>	2
	<i>Stenotrophomonas</i>	1
	<i>Yersinia</i>	2
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	6
	<i>Alycyclobacillus</i>	0
	<i>Brevibacillus</i>	0
BGP	<i>Granulicatella</i>	1
	<i>Leifsonia</i>	4
CGP	<i>Streptococcus</i>	0
	<i>Staphylococcus</i>	17
	<i>Enterococcus</i>	0
	<i>Kocuria</i>	6
	<i>Micrococcus</i>	14

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos.

#### 4.2.2.4 Área 4

Esta área, apesar de fisicamente separada, apresenta correlações (de processo) com as outras determinadas no presente estudo, por realizar atividades de finalização de processos produtivos. Assim como as áreas 2 e 3, a área 4 apresenta instalações mais recentes para áreas controladas de produção e também barreiras sanitárias efetivas.

Nesta área, foram obtidas 603 estirpes no período de cinco anos, agrupadas em 40 gêneros: quatro de BGP produtores de esporo, seis de BGP não produtores de esporo, 13 de CGP e 17 de GN (Quadro 20).

Na avaliação geral da microbiota bacteriana associada a esta área, pode se observar a prevalência expressiva de estirpes dos gêneros *Staphylococcus* (N=235) e *Micrococcus* (N=158), conforme o Quadro 20, em acordo com a distribuição apresentada na Bacterioteca de Bio-Manguinhos (Figura 26). Entretanto, nesta área, estes dois gêneros compreendem 65,17% de todas as estirpes no período analisado.

Quadro 20 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 4 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	Total
BGN	<i>Acinetobacter</i>	7
	<i>Brevundimonas</i>	7
	<i>Chryseobacterium</i>	20
	<i>Empedobacter</i>	1
	<i>Enhydrobacter</i>	2
	<i>Enterobacter</i>	3
	<i>Escherichia</i>	1
	<i>Gardnerella</i>	4
	<i>Leclercia</i>	1
	<i>Moraxella</i>	1
	<i>Pantoea</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	11
	<i>Ralstonia</i>	2
	<i>Serratia</i>	8
	<i>Shewanella</i>	1
	<i>Sphingomonas</i>	5
<i>Stenotrophomonas</i>	7	

Continuação Quadro 20 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 4 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	Total
BGP esporo	<i>Bacillus</i>	28
	<i>Brevibacillus</i>	7
	<i>Paenibacillus</i>	2
	<i>Terribacillus</i>	1
BGP	<i>Arthrobacter</i>	1
	<i>Corynebacterium</i>	33
	<i>Leifsonia</i>	8
	<i>Microbacterium</i>	5
	<i>Oerskovia</i>	1
	<i>Streptomyces</i>	1
CGP	<i>Aerococcus</i>	2
	<i>Alloicoccus</i>	1
	<i>Gemella</i>	3
	<i>Globicatella</i>	1
	<i>Kocuria</i>	7
	<i>Kytococcus</i>	11
	<i>Lactococcus</i>	1
	<i>Leuconostoc</i>	3
	<i>Micrococcus</i>	158
	<i>Pediococcus</i>	2
	<i>Rothia</i>	1
	<i>Staphylococcus</i>	235
	<i>Streptococcus</i>	9

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos

Os outros quatro gêneros mais frequentes (Quadro 20) foram *Corynebacterium* (N=33), *Bacillus* (N=28), *Chryseobacterium* (N=20), *Kytococcus* (N=11) e *Pseudomonas* (N=11).

Ao observar a frequência de isolamento dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*, pode-se notar uma diminuição do número de estirpes a cada ano (Quadro 21). Como não foi avaliado o número de amostras nesta inferência (para estabelecer o número de estirpes por evento de amostragem), em função

da ausência de registro desta informação no BD/Bacterioteca, não se pode afirmar que houve queda na frequência.

Quadro 21 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 4 (2010 a 2014)

<b>Gênero</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014*</b>	<b>Total</b>
<i>Acinetobacter</i>		1	3	3		7
<i>Aerococcus</i>				1	1	2
<i>Alloicoccus</i>	1					1
<i>Arthrobacter</i>	1					1
<i>Bacillus</i>	10	9	2	4	3	28
<i>Brevibacillus</i>	4	3				7
<i>Brevundimonas</i>	2	2	3			7
<i>Chryseobacterium</i>		8	12			20
<i>Corynebacterium</i>	15	8	9	1		33
<i>Empedobacter</i>		1				1
<i>Enhydrobacter</i>	2					2
<i>Enterobacter</i>		2		1		3
<i>Escherichia</i>			1			1
<i>Gardnerella</i>	1	1	1	1		4
<i>Gemella</i>		3				3
<i>Globicatella</i>			1			1
<i>Kocuria</i>	3	3		1		7
<i>Kytococcus</i>	9	2				11
<i>Lactococcus</i>			1			1
<i>Leclercia</i>		1				1
<i>Leifsonia</i>	2	4	2			8
<i>Leuconostoc</i>		2	1			3
<i>Microbacterium</i>	1				4	5
<i>Micrococcus</i>	78	60	8	7	5	158
<i>Moraxella</i>				1		1
<i>Oerskovia</i>		1				1
<i>Paenibacillus</i>	2					2
<i>Pantoea</i>				1		1
<i>Pediococcus</i>	1		1			2
<i>Pseudomonas</i>		4	4	3		11
<i>Ralstonia</i>				2		2
<i>Rothia</i>		1				1

2014\* considerado até agosto de 2014

Continuação Quadro 21 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 4 (2010 a 2014)

Gênero	2010	2011	2012	2013	2014*	Total
<i>Serratia</i>		7		1		8
<i>Shewanella</i>			1			1
<i>Sphingomonas</i>	1			4		5
<i>Staphylococcus</i>	79	72	47	26	11	235
<i>Stenotrophomonas</i>			5		2	7
<i>Streptococcus</i>	7	1	1			9
<i>Streptomyces</i>	1					1
<i>Terribacillus</i>	1					1
Total	221	196	103	57	26	603

2014\* considerado até agosto de 2014

Nesta área, o gênero *Chryseobacterium* apresenta frequência de isolamento elevada (3,32%) quando comparada com outras áreas (Tabela 13) e a Bacterioteca (Figura 26). Por este gênero apresentar esta estatística singular, buscou-se observar sua distribuição ao longo dos anos.

Durante o ano de 2011, foram identificadas oito estirpes de *Chryseobacterium* e, em 2012, 12 estirpes (Quadro 21). Nos outros dois anos avaliados (2010 e 2013), não foi identificada nenhum representante deste gênero. A frequência deste gênero deverá ser acompanhada nos próximos anos, para averiguar se este consta como um evento recorrente ou um evento pontual.

Verificou-se também as fontes de isolamento (monitoramento ambiental ou monitoramento de águas) das estirpes do gênero *Chryseobacterium*. Todas (N=20) foram isoladas a partir de amostras de água, sendo 19 de PW e uma de WFI (Quadro 22).

Quadro 22 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento de águas na área 4 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	WFI	PW	Total
BGN	<i>Acinetobacter</i>	0	4	4
	<i>Brevundimonas</i>	1	0	1
	<i>Chryseobacterium</i>	1	19	20
	<i>Empedobacter</i>	0	0	0
	<i>Enhydrobacter</i>	0	0	0
	<i>Enterobacter</i>	0	2	2
	<i>Escherichia</i>	0	0	0
	<i>Gardnerella</i>	0	0	0
	<i>Leclercia</i>	0	1	1
	<i>Moraxella</i>	0	0	0
	<i>Pantoea</i>	0	0	0
	<i>Pseudomonas</i>	3	5	8
	<i>Ralstonia</i>	2	0	2
	<i>Serratia</i>	0	8	8
	<i>Shewanella</i>	0	0	0
	<i>Sphingomonas</i>	0	0	0
	<i>Stenotrophomonas</i>	2	5	7
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	0	0	0
	<i>Brevibacillus</i>	0	1	1
	<i>Paenibacillus</i>	0	0	0
	<i>Terribacillus</i>	0	0	0
BGP	<i>Arthrobacter</i>	0	0	0
	<i>Corynebacterium</i>	3	1	4
	<i>Leifsonia</i>	2	1	3
	<i>Microbacterium</i>	0	0	0
	<i>Oerskovia</i>	0	0	0
	<i>Streptomyces</i>	0	0	0

BGN= Bastonetes Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos, WFI= água para injetáveis, PW= água purificada.

Continuação Quadro 22 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento de águas na área 4 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	WFI	PW	Total
CGP	<i>Aerococcus</i>	1	0	1
	<i>Alloicoccus</i>	0	0	0
	<i>Gemella</i>	0	0	0
	<i>Globicatella</i>	0	0	0
	<i>Kocuria</i>	0	3	3
	<i>Kytococcus</i>	0	0	0
	<i>Lactococcus</i>	0	0	0
	<i>Leuconostoc</i>	1	0	1
	<i>Micrococcus</i>	0	1	1
	<i>Pediococcus</i>	0	0	0
	<i>Rothia</i>	0	1	1
	<i>Staphylococcus</i>	9	1	10
	<i>Streptococcus</i>	0	0	0

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos, WFI= água para injetáveis, PW= água purificada.

Dos gêneros mais frequentemente identificados em amostras do sistema de águas 4, *Chryseobacterium* spp. foi o que apresentou maior número de estirpes em amostras de PW, enquanto as amostras de WFI apresentaram *Staphylococcus* spp. com elevada frequência (Quadro 23). A elevada detecção deste último gênero em amostras de WFI também foi evidenciada nos sistemas 1 e 2. Este é um perfil pouco usual em amostras de água, nas quais geralmente se espera encontrar bactérias Gram negativas como as mais frequentes no isolamento.

As estirpes obtidas a partir do monitoramento ambiental, tanto de amostras de ar quanto de operadores, estão organizadas no Quadro 23.

Quadro 23 - Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 4

Gram	Gênero	Total
BGN	<i>Acinetobacter</i>	3
	<i>Brevundimonas</i>	6
	<i>Chryseobacterium</i>	0
	<i>Empedobacter</i>	1
	<i>Enhydrobacter</i>	2
	<i>Enterobacter</i>	1
	<i>Escherichia</i>	1
	<i>Gardnerella</i>	4
	<i>Leclercia</i>	0
	<i>Moraxella</i>	1
	<i>Pantoea</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	3
	<i>Ralstonia</i>	0
	<i>Serratia</i>	0
	<i>Shewanella</i>	1
	<i>Sphingomonas</i>	5
<i>Stenotrophomonas</i>	0	
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	28
	<i>Brevibacillus</i>	6
	<i>Paenibacillus</i>	2
	<i>Terribacillus</i>	1
BGP	<i>Arthrobacter</i>	1
	<i>Corynebacterium</i>	29
	<i>Leifsonia</i>	5
	<i>Microbacterium</i>	5
	<i>Oerskovia</i>	1
	<i>Streptomyces</i>	1

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes  
 Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos  
 Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não  
 produtores de esporos

Continuação Quadro 23 – Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 4

Gram	Gênero	Total
CGP	<i>Aerococcus</i>	1
	<i>Alloicoccus</i>	1
	<i>Gemella</i>	3
	<i>Globicatella</i>	1
	<i>Kocuria</i>	4
	<i>Kytococcus</i>	11
	<i>Lactococcus</i>	1
	<i>Leuconostoc</i>	2
	<i>Micrococcus</i>	157
	<i>Pediococcus</i>	2
	<i>Rothia</i>	0
	<i>Staphylococcus</i>	225
	<i>Streptococcus</i>	9

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos

#### 4.2.2.5 Área 5

Tanto a área 5 como a área 6 eram prédios de laboratórios de pesquisa, que foram adaptados para as necessidades de Bio-Manguinhos. Nestas duas áreas, são realizadas atividades de desenvolvimento, de produção e administrativas. As áreas destinadas a produção foram adaptadas com base nas exigências regulatórias vigentes, tendo passado por diversas obras ao longo dos anos, particularmente após 2012.

Em relação às estirpes de 2010 a 2014 depositadas na Bacterioteca, 194 foram associadas a esta área de produção (Quadro 24). Destas, 108 (55,67%) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e 33 (17,01%) ao *Micrococcus*, posicionando estes dois gêneros novamente como os de maior frequência de isolamento. O terceiro gênero *Bacillus* (11 estirpes – 5,67%) e os gêneros *Enterobacter*, *Corynebacterium* e *Kytococcus* aparecem empatados no quarto lugar dos mais frequentes, com cinco (2,58%)

estirpes, cada um. Estes seis gêneros representam 86, 09% de todas as estirpes isoladas nesta área no período estudado (de 2010 a 2014). Foram identificados 17 gêneros nesta área.

Quadro 24 - Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 5 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	Total
GN	<i>Acinetobacter</i>	2
	<i>Enterobacter</i>	5
	<i>Gardnerella</i>	3
	<i>Klebsiella</i>	3
	<i>Moraxella</i>	1
	<i>Pantoea</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	1
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	11
BGP	<i>Corynebacterium</i>	5
	<i>Leifsonia</i>	3
	<i>Turicella</i>	2
CGP	<i>Gemella</i>	3
	<i>Kocuria</i>	4
	<i>Kytococcus</i>	5
	<i>Micrococcus</i>	33
	<i>Staphylococcus</i>	108
	<i>Streptococcus</i>	4

GN: Gram negativo, BGP esporo: bastonetes Gram positivo produtores de esporos, CGP: cocos Gram positivo, BGP: bastonetes Gram positivo não produtores de esporos

Como observado nas áreas anteriores, a frequência de isolamento dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* apresenta diminuição do número de estirpes a cada ano (Quadro 25).

Quadro 25 – Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) e de monitoramento de águas na área 5 (2010 a 2014)

Gênero	2010	2011	2012	2013	2014*	Total
<i>Acinetobacter</i>	1	1				2
<i>Bacillus</i>	2	1	4	3	1	11
<i>Corynebacterium</i>	2	3				5
<i>Enterobacter</i>		5				5
<i>Gardnerella</i>	2	1				3
<i>Gemella</i>			3			3
<i>Klebsiella</i>			3			3
<i>Kocuria</i>	3			1		4
<i>Kytococcus</i>	5					5
<i>Leifsonia</i>	2	1				3
<i>Micrococcus</i>	14	10	9			33
<i>Moraxella</i>				1		1
<i>Pantoea</i>				1		1
<i>Pseudomonas</i>				1		1
<i>Staphylococcus</i>	38	11	36	18	5	108
<i>Streptococcus</i>		4				4
<i>Turicella</i>		2				2

2014\* considerado até agosto de 2014

A presença de estirpes do gênero *Enterobacter* nesta área, apesar de baixa (2,58% do total de estirpes na área 5), foi evidenciada e buscou-se verificar a origem de isolamento. Como resultado não esperado, todos foram oriundos de amostras do monitoramento ambiental (Quadro 25), não sendo evidenciada a presença de estirpes deste gênero no sistema de água 5, ao contrário do observado no sistema de águas 1 (Quadro 14).

Outra surpresa em relação ao sistema de água desta área foi a presença de uma única estirpe de Gram negativo ao longo de cinco anos (Quadro 26), sendo Gram positivo a microbiota bacteriana mais presente (37 estirpes). A microbiota esperada em águas, como já citado anteriormente, é de bactérias Gram negativo.

Quadro 26 – Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento de águas na área 5 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	WFI	PW	Total água
BGN	<i>Klebsiella</i>	1	0	1
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	3	0	3
BGP	<i>Corynebacterium</i>	1	0	1
	<i>Turicella</i>	1	0	1
CGP	<i>Gemella</i>	1	0	1
	<i>Micrococcus</i>	5	0	5
	<i>Staphylococcus</i>	25	0	25
	<i>Streptococcus</i>	1	0	1

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos, WFI= água para injetáveis, PW= água purificada.

A presença de *Staphylococcus* spp. em WFI novamente foi evidenciada, sendo este o gênero mais frequente dentre as estirpes isoladas nas amostras de água (Quadro 26). Este resultado foi similar ao encontrado nos sistemas de água das áreas 1 e 2 (Quadros 10 e 14). O sistema de águas 4 (Quadro 22) também apresentou um grande número de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas a partir de amostras de WFI (N=10), sendo este o segundo gênero mais frequentemente identificado para esta categoria de água farmacêutica.

As estirpes obtidas a partir do monitoramento ambiental, tanto de amostras de ar quanto de operadores, estão organizadas no Quadro 27.

Quadro 27 – Estirpes isoladas a partir de amostras do monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 5

Gram	Gênero	Número estirpes
GN	<i>Acinetobacter</i>	2
	<i>Enterobacter</i>	5
	<i>Gardnerella</i>	3
	<i>Klebsiella</i>	2
	<i>Moraxella</i>	1
	<i>Pantoea</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	1
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	8
BGP	<i>Corynebacterium</i>	4
	<i>Leifsonia</i>	3
	<i>Turicella</i>	1
CGP	<i>Gemella</i>	2
	<i>Kocuria</i>	4
	<i>Kytococcus</i>	5
	<i>Micrococcus</i>	28
	<i>Staphylococcus</i>	83
	<i>Streptococcus</i>	3

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não produtores de esporos

#### 4.2.2.6 Área 6

Nesta área, foram evidenciados 16 gêneros bacterianos, sendo *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp., novamente, os de maior frequência (Quadro 28).

Esta área não possui sistema de água exclusivo, portanto não foram isoladas estirpes a partir de água. As estirpes foram obtidas a partir de amostras de monitoramento do ar e de operadores, apenas (Quadro 28).

Quadro 28 – Total dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 6 (2010 a 2014)

Gram	Gênero	Total
GN	<i>Moraxella</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	1
	<i>Sphingomonas</i>	2
	<i>Brevundimonas</i>	1
BGP (esporo)	<i>Bacillus</i>	8
	<i>Brevibacillus</i>	2
	<i>Alycyclobacillus</i>	2
BGP	<i>Corynebacterium</i>	13
CGP	<i>Gemella</i>	1
	<i>Kytococcus</i>	1
	<i>Lactococcus</i>	1
	<i>Micrococcus</i>	20
	<i>Staphylococcus</i>	25
	<i>Streptococcus</i>	5
	<i>Dermaococcus</i>	1
	<i>Kocuria</i>	1

GN= Gram negativos, BGP esporo= bastonetes  
 Gram positivos produtores de esporos, CGP= cocos  
 Gram positivos, BGP= bastonetes Gram positivos não  
 produtores de esporos

Como observado nas áreas anteriores (Quadros 11, 15, 19, 23 e 27), os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* foram os mais identificados (Quadro 24) a partir de amostras de monitoramento ambiental (ar e operadores) e a frequência de isolamento dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* apresenta diminuição do número de estirpes a cada ano (Quadro 29).

Quadro 29 - Distribuição dos gêneros identificados em procedimentos de monitoramento ambiental (ar e operadores) na área 6 (2010 a 2014)

<b>Gênero</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014*</b>	<b>Total</b>
<i>Moraxella</i>				1		1
<i>Pseudomonas</i>		1				1
<i>Sphingomonas</i>				1	1	2
<i>Brevundimonas</i>					1	1
<i>Bacillus</i>		4	3	1		8
<i>Brevibacillus</i>	1	1				2
<i>Alycyclobacillus</i>					2	2
<i>Corynebacterium</i>		5	8			13
<i>Gemella</i>		1				1
<i>Kytococcus</i>		1				1
<i>Lactococcus</i>		1				1
<i>Micrococcus</i>	1	14	1	2	2	20
<i>Staphylococcus</i>		21		3	1	25
<i>Streptococcus</i>		5				5
<i>Dermacoccus</i>					1	1
<i>Kocuria</i>					1	1

2014\* considerado até agosto de 2014

4.2.3 Mapeamento da distribuição nos processos produtivos: gêneros identificados no processo de produção do Insumo Farmacêutico Ativo na área 1 (IFA-A), no período de 2010 a 2013

No período de 2010 a 2013, foram analisados mais de 180 lotes de IFA-A, subdivididos em um número superior a 3.600 amostras enviadas para o ensaio de Esterilidade na SEPIN. A partir das amostras que foram enviadas para a Identificação de Contaminantes, foram isoladas 1.337 estirpes bacterianas (Tabela 15).

Tabela 15 - Estirpes bacterianas (N=1337) a partir de IFA-A, de 2010 a 2013

<b>Gênero</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>Total</b>
<i>Acinetobacter</i>		2	37		39
<i>Aerococcus</i>		1			1
<i>Alycyclobacillus</i>				3	3
<i>Bacillus</i>	11	4	2	19	36
<i>Brevibacillus</i>	1				1
<i>Brevundimonas</i>			3		3
<i>Burkholderia</i>		1	2		3
<i>Citrobacter</i>		1		2	3
<i>Chryseobacterium</i>			1		1
<i>Corynebacterium</i>	3	3		2	8
<i>Cronobacter</i>				1	1
<i>Empedobacter</i>			1		1
<i>Enterobacter</i>			2		2
<i>Enterococcus</i>		1	52	209	262
<i>Escherichia</i>	4	3	18	21	46
<i>Gardnerella</i>				2	2
<i>Granulicatella</i>				1	1
<i>Gemella</i>		2			2
<i>Klebsiella</i>			2		2
<i>Kocuria</i>				2	2

(Continuação) Tabela 15 - Estirpes bacterianas (N=1337) a partir de IFA-A, de 2010 a 2013

<b>Gênero</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>Total</b>
<i>Lactococcus</i>			2		2
<i>Leuconostoc</i>			2		2
<i>Leifsonia</i>			1		1
<i>Micrococcus</i>		1	8	1	10
<i>Pediococcus</i>				1	1
<i>Propionibacterium</i>				2	2
<i>Pseudomonas</i>	23	22	49	258	352
<i>Proteus</i>		1	6	14	21
<i>Providencia</i>		1	20		21
<i>Ralstonia</i>				1	1
<i>Rhizobium</i>				1	1
<i>Roseomonas</i>				1	1
<i>Sphingobacterium</i>		1			1
<i>Sphingomonas</i>			2	3	5
<i>Staphylococcus</i>	3	18	15	27	63
<i>Stenotrophomonas</i>	5	2	4	16	27
<i>Streptococcus</i>			2		2
Não identificado	236	42	32	94	404
<b>Total</b>	<b>286</b>	<b>106</b>	<b>264</b>	<b>681</b>	<b>1337</b>

Deste total (N=1.337), foram identificados 37 gêneros distribuídos em 933 (69,78%) estirpes identificadas e 404 (30,22%) não identificadas (Tabela 16), embora fossem caracterizadas por coloração de Gram, sendo este o resultado da identificação liberado.

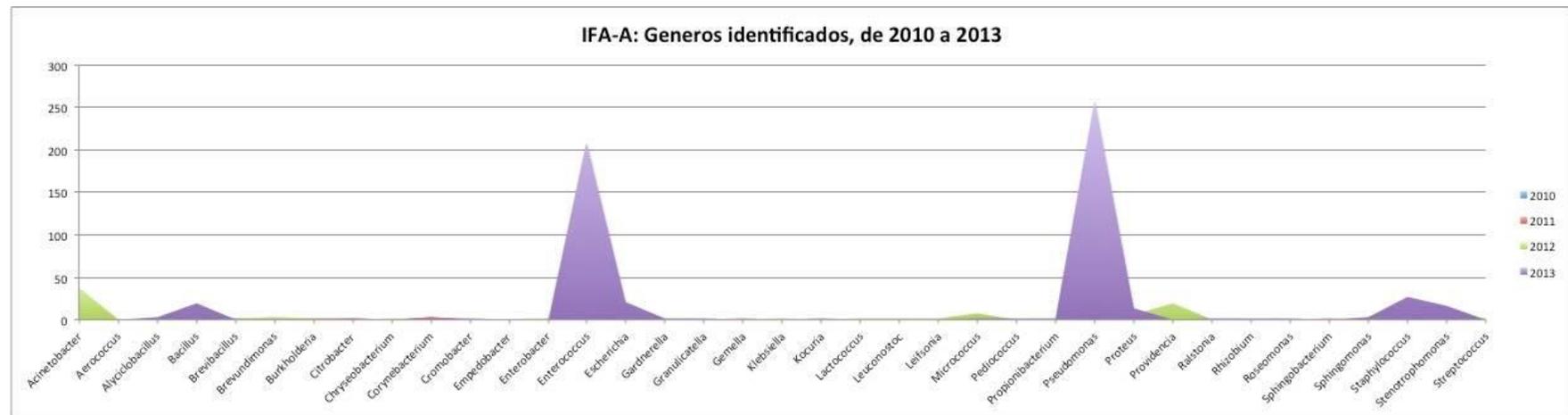
Tabela 16 - Número de amostras de IFA-A analisadas e resultados inconclusivos na identificação de contaminantes (2010 a 2013)

Ano	Não identificado	Total estirpes
<b>2010</b>	236 (82,52%)	286
<b>2011</b>	42 (39,62%)	106
<b>2012</b>	32 (12,12%)	264
<b>2013</b>	94 (13,80%)	681
<b>Total</b>	404 (30,22%)	1337

O ano de 2010 teve um número muito elevado de estirpes não identificadas. Na análise destes resultados, a porcentagem destas estirpes (maior que 80%) chamou atenção por se apresentar muito superior a porcentagem geral de estirpes com resultado inconclusivo na rotina (estimada em 40%, segundo MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>a</sub>, MEDEIROS *et al.*, 2011<sub>b</sub>). Na busca por informações que justificassem este número, foram apontados problemas diversos que resultaram na liberação dos laudos analíticos apenas com os resultados obtidos no teste de Gram. Dessa forma, não se pode fazer qualquer inferência em relação à acurácia do método de identificação (BBL Crystal) a partir do número de estirpes não identificados em 2010.

Durante todo o período analisado, o maior número de isolamentos bacterianos a partir de IFA-A foi observado no ano de 2013 (Figura 32), com prevalência dos gêneros *Pseudomonas* e *Enterococcus*.

Figura 32 - Distribuição dos gêneros identificados a partir de amostras de IFA-A (2010 a 2013)



Estes dois gêneros (*Pseudomonas* e *Enterococcus*) representam 45,92% (N=614) de todas as 1.337 estirpes isoladas a partir de amostras de IFA-A no período analisado (quatro anos), conforme apresentado na Tabela 15. O gênero *Pseudomonas* apresentou histórico de isolamento em todo período analisado, enquanto o gênero *Enterococcus* só não foi isolado no ano de 2010 (Tabela 17).

Tabela 17 - Principais gêneros identificados (2010 a 2013) a partir de IFA-A

	<i>Acinetobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<b>2010</b>		11		4	23	3	5
<b>2011</b>	2	4	1	3	22	18	2
<b>2012</b>	37	2	52	18	49	15	4
<b>2013</b>		19	209	21	258	27	16
<b>Total</b>	39	36	262	46	352	63	27

Durante o ano de 2010, foram identificados sete gêneros bacterianos a partir de estirpes de amostras de IFA-A (Tabela 15). O gênero *Pseudomonas* foi o que apresentou maior número de estirpes identificadas, sendo seguido por *Bacillus* spp.

Em 2011, foram identificados 16 gêneros. Novamente, o gênero *Pseudomonas* foi o mais frequentemente identificado. Neste ano, o gênero *Staphylococcus* ficou em segundo lugar no “ranking” dos gêneros mais identificados (Tabela 15).

Em 2012, o gênero *Enterococcus* constou como o de maior frequência de isolamento e identificação (Tabela 15). *Pseudomonas* spp. ficou em segundo, sendo seguido por *Acinetobacter* spp. Neste ano, foram identificados 22 gêneros distintos.

Em 2013, o ano do maior número de identificações a partir de IFA-A (n=681), foram identificados 21 gêneros bacterianos. A predominância dos gêneros *Pseudomonas* e *Enterococcus* foi marcante (Tabela 15).

A identificação da microbiota encontrada em etapas do processo produtivo pode representar um dado interessante na compreensão das origens de contaminação. A amostragem de simulação de envase (*media fill*) e de matérias-primas e insumos utilizados na formulação também se apresenta como peça fundamental para este entendimento (BRASIL, 2010). Como os dados referentes a estas amostras não foram completamente discriminados (as informações extraídas das solicitações de análise enviadas a SEPIN estavam incompletas), não foi possível a correlação das estirpes isoladas a partir de amostras de *media fill* e de matéria-prima/insumo, por isso não foram inseridas neste estudo. Entretanto, a partir desta observação, serão encaminhadas ao Departamento de Garantia da Qualidade a solicitação de mudança nos campos de preenchimento das solicitações, de forma a assegurar o rastreamento de toda a informação necessária para a alimentação do banco de dados da bacterioteca.

Outra comparação interessante seria entre as estirpes identificadas em cada área e aquelas identificadas no seu respectivo processo produtivo. Para exemplificar, foram comparados os resultados encontrados na área 1 (monitoramento ambiental e monitoramento de pontos de água) com os resultados apresentados na análise de amostras de IFA-A (produzida na área 1) durante o ano de 2013 (Tabela 18).

Tabela 18 - Resultados da identificação de estirpes isoladas no ano de 2013 de diversas fontes na Área 1

Gênero/Fonte	Gram	IFA-A	M.AR	M.HU	WFI	PW	Total
<i>Acinetobacter</i>	BGN			1			1
<i>Alycyclobacillus</i>	BGP	3					3
<i>Bacillus</i>	BGP	19					19
<i>Brevundimonas</i>	BGN				1		1
<i>Burkholderia</i>	BGN					1	1
<i>Citrobacter</i>	BGN	2					2
<i>Corynebacterium</i>	BGP	2	1				3
<i>Cronobacter</i>	BGN	1					1
<i>Enterobacter</i>	BGN					7	7
<i>Enterococcus</i>	CGP	209				1	210
<i>Escherichia</i>	BGN	21		1			22
<i>Gardnerella</i>	BGN	21					21
<i>Granulicatella</i>	BGP	1					1
<i>Kocuria</i>	CGP	2		1	1		4
<i>Kytococcus</i>	CGP		1				1
<i>Micrococcus</i>	CGP	1	4	5			10
<i>Pediococcus</i>	CGP	1					1
<i>Propionibacterium</i>	BGP	2					2
<i>Pseudomonas</i>	BGN	258			1	3	262
<i>Proteus</i>	BGN	14					14
<i>Ralstonia</i>	BGN	1					1
<i>Rhizobium</i>	BGN	1					1
<i>Roseomonas</i>	BGN	1					1
<i>Sphingomonas</i>	BGN	3		1	1	2	7
<i>Staphylococcus</i>	CGP	27	7	4	3	1	42
<i>Stenotrophomonas</i>	BGN	16					16
<b>TOTAL</b>		597	13	13	7	15	654

IFA-A=Ingrediente Farmacêutico Ativo; M.AR=Monitoramento Ambiental; M.HU=Monitoramento de Operadores; WFI=Água para injetáveis; PW=Água purificada; BGN=Bastonete Gram negativos; BGP=Bastonete Gram positivos; CGP=Coco Gram positivos

Atualmente em Bio-Manguinhos e em diversas indústrias farmacêuticas, a comparação dos resultados de identificação das estirpes isoladas no processo produtivo e de produtos com os das isoladas nos pontos de

monitoramento das áreas (amostras de ar, de operadores, de superfícies e de água) é uma das únicas maneiras de elucidação de possíveis origens de contaminação dos processos e, conseqüentemente, dos produtos. Mais uma vez, é importante ressaltar que o ambiente de produção (e todas as partes monitoradas nas áreas) não é o único responsável pela contaminação de produtos, devendo se considerar também a natureza da matéria-prima, o grau de pureza dos insumos utilizados, o uso de quaisquer utensílios/instrumentos, entre outros (WHO, 2012, BRASIL, 2010).

Ao seguir essa abordagem de investigação e esta ressalva, pode-se observar que alguns gêneros identificados em amostras de IFA-A (como, por exemplo, *Alycyclobacillus*, *Bacillus*, *Gardnerella*, *Proteus* e *Stenotrophomonas*, para citar alguns dos 13 gêneros nesta mesma condição) não foram identificados em qualquer outra amostra de fonte diferente (Tabela 18). Este resultado não permite a elucidação da fonte de contaminação da IFA, de acordo com esta abordagem, permanecendo a dúvida sobre o que ocasionou a presença do micro-organismo investigado e, conseqüentemente, não possibilitando uma medida corretiva adequada.

Ainda mantendo esta abordagem de comparação dos resultados de identificação como mecanismo de investigação, pode-se observar uma situação oposta, na qual o mesmo gênero foi identificado em mais de uma possível fonte de contaminação monitorada (como os gêneros *Kocuria*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas*). O gênero *Staphylococcus* foi identificado em todas as fontes (Tabela 18). Nestes casos, a dúvida sobre qual a real fonte de contaminação permaneceu e a investigação, novamente, foi inconclusiva.

Por fim, mesmo nos casos onde um gênero foi identificado em amostras de IFA-A e em amostras de uma única fonte de monitoramento, resta a dúvida se as estirpes apresentavam, de fato, uma origem comum. Os três gêneros que foram identificados somente em IFA-A e uma única outra fonte de isolamento (*Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp. e *Escherichia* spp.) estão ilustrados, em destaque, na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados dos gêneros *Corynebacterium*, *Enterococcus* e *Escherichia* no ano de 2013 na Área 1

Gênero/Fonte	Gram	IFA-A	M.AR	M.HU	WFI	PW	Total
<i>Corynebacterium</i>	BGP	2	1				3
<i>Enterococcus</i>	CGP	209				1	210
<i>Escherichia</i>	BGN	21		1			22

IFA-A=Ingrediente Farmacêutico Ativo; M.AR=Monitoramento Ambiental; M.HU=Monitoramento de Operadores; WFI=Água para injetáveis; PW=Água purificada; BGN=Bastonete Gram negativos; BGP=Bastonete Gram positivos; CGP=Coco Gram positivos.

Na análise realizada com as três estirpes pertencentes ao gênero *Corynebacterium* isoladas na Área 1 durante o ano de 2013, duas foram isoladas a partir de amostras de IFA-A e uma a partir de uma placa de meio TSA oriunda do monitoramento do ar. Apesar de somente uma possível fonte de contaminação ter sido associada (ar), dados complementares como a data do processo, lote das duas amostras de IFA-A e a data do isolamento de cada estirpe são fundamentais para verificar se as estirpes podem estar associadas a uma origem comum ou não. Caso as duas estirpes isoladas a partir de amostras de IFA-A apresentem datas de isolamento cronologicamente distantes da data de isolamento da estirpe oriunda de uma amostra de ar, não há como correlacioná-las e, mais uma vez, a investigação será inconclusiva.

Este raciocínio também foi utilizado na análise dos resultados das estirpes dos gêneros *Enterococcus* e *Escherichia* citadas na Tabela 19. Caso as datas de isolamento sejam distintas, não há como estabelecer relação entre as estirpes. Com estes dois gêneros, entretanto, foi apontado mais um dos possíveis problemas encontrados nesse tipo de investigação: a grande diferença numérica entre as estirpes isoladas a partir de amostras de IFA-A e as isoladas na possível fonte. É pouco provável que todas as estirpes apresentassem exatamente a mesma data de isolamento entre si. Todas as 209 estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas no ano de 2013 foram a partir da mesma amostra de IFA-A (ou que, ao menos, fossem pertencentes ao mesmo lote de produção)? Qual seria a origem da contaminação das amostras de IFA-A, caso não houvesse relação cronológica entre as estirpes? Dúvidas e

problemas de correlação como os apresentados reafirmam a necessidade de um método de investigação com mais evidências para sua conclusão.

#### 4.3 RASTREAMENTO DE CONTAMINANTES

O Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos tem apoiado, desde 2010, a presente proposta de melhorias nos sistemas de identificação da microbiota autóctone e contaminante, assim como de estabelecimento de investigações efetivas, como o rastreamento molecular pela técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE). O uso original da técnica de PFGE era relacionado à investigação de surtos: a análise do cromossomo bacteriano inteiro, com o auxílio de enzimas de restrição de corte raro (macro restrição), fornece perfis de fragmentos que podem indicar a presença de uma relação clonal (muito próxima, sugerindo uma fonte em comum). A construção de uma coleção de culturas fez parte deste conjunto de melhorias atuando como uma “memória biológica”, e, desta forma, permitindo que as investigações retrocedam no tempo através da recuperação de cada micro-organismo envolvido.

Em Bio-Manguinhos e em outras indústrias, de modo geral, a investigação de origens de contaminação é realizada por meio da análise de documentos, como resultados de laudos de identificação. Esta forma de investigação se revela um pouco ineficaz na resolução dos problemas de contaminação, uma vez que a comparação dos registros impressos nem sempre permite apontar uma origem e, conseqüentemente, uma ação corretiva. Ademais, esta análise é de grande subjetividade por não conseguir a comprovação de que os micro-organismos investigados apresentam uma origem comum entre si. Assim sendo, o uso de uma técnica analítica seria interessante neste tipo de investigação, por apresentar maior objetividade na interpretação de resultados e por fornecer subsídios concretos de comparação.

A técnica de PFGE foi utilizada, em conjunto com o banco de dados e a Bacterioteca, na investigação de um evento de contaminação (desvio da

qualidade) ocorrido em Bio-Manguinhos. A viabilidade e a eficácia do uso desta técnica como ferramenta de investigação no Controle de Qualidade foram avaliadas na execução deste estudo. Os resultados relacionados estão descritos no relatório produzido para esta investigação (APÊNDICE H), sendo seu teor considerado sigiloso por se tratar de assuntos internos de Bio-Manguinhos. Entretanto, a linha de raciocínio utilizada e os resultados obtidos no gel de PFGE e sua análise serão apresentados, omitindo somente a espécie isolada, as possíveis fontes de contaminação analisadas e a linha produtiva envolvida.

#### 4.3.1 Uso do Banco de Dados e da Bacterioteca

Um desvio da qualidade (evento de contaminação, evidenciado em um ponto de um dos processos produtivos) foi detectado na Área 1. Foi realizada uma pesquisa a partir da espécie envolvida nesse desvio ao Banco de Dados (BD) da Bacterioteca, utilizando os seguintes parâmetros: data do desvio, espécie identificada, local de isolamento, lote envolvido e tipo de fonte de isolamento. A partir do BD/Bacterioteca, tornou-se possível o cruzamento de informações para fins de investigação com os espécimes envolvidos no momento exato do evento. Dessa forma, seu uso permitiu não só a busca de todos os estirpes nas datas com resultados positivos para a pesquisa do contaminante investigado, como também resultados encontrados em amostras de IFAs, *Media Fill*, monitoramento ambiental (ar, operadores e superfícies), monitoramento de pontos de utilização de água, entre outros relacionados ao mesmo processo produtivo. O BD/Bacterioteca permitiu uma pesquisa rápida e a Bacterioteca permitiu a recuperação das estirpes envolvidas, uma vez que, a partir da listagem elaborada com as estirpes selecionadas pelo BD/Bacterioteca, as mesmas foram recuperadas com sucesso. Foram selecionadas 11 estirpes, sendo uma isolada no evento de contaminação e 10 isoladas de três fontes distintas (denominadas Fonte 1, Fonte 2 e Fonte 3) e

correlacionadas ao evento de contaminação em algum dos parâmetros pesquisados (Tabela 20).

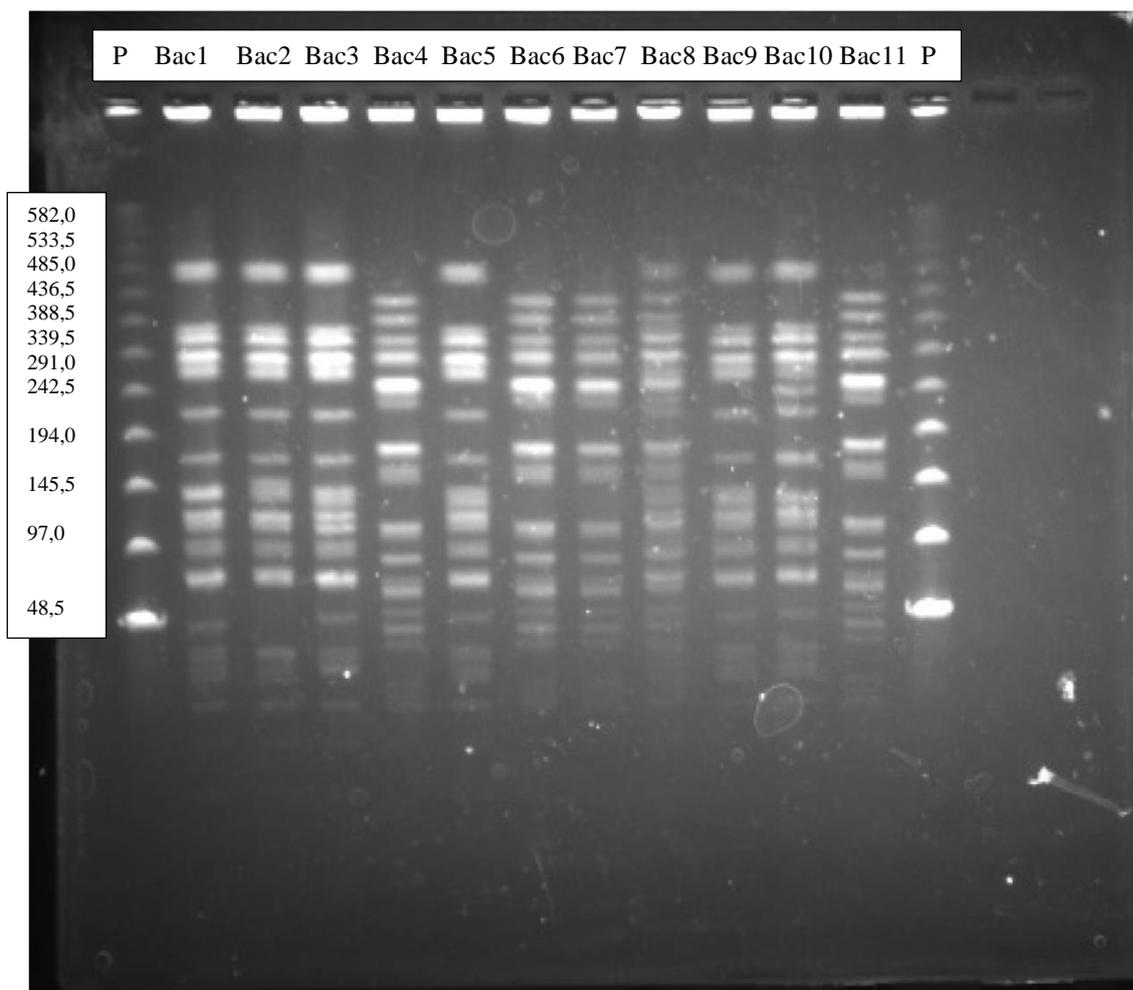
Tabela 20 - Estirpes selecionados para a investigação do desvio de qualidade

<b>Estirpe</b>	<b>Fonte de isolamento</b>
Bac-1	1
Bac-2	1
Bac-3	1
Bac-4	2
Bac-5	3
Bac-6	2
Bac-7	2
Bac-8	2
Bac-9	3
Bac-10	3
Bac-11	Desvio investigado

#### 4.3.2 Uso da técnica do PFGE

As 11 estirpes foram submetidas à técnica de PFGE, após a realização dos ajustes para o gênero envolvido. Os perfis de restrição podem ser observados na Figura 33. Foram determinados cinco perfis distintos (Quadro 30), utilizando os critérios determinados por Tenover e cols.(1995).

Figura 33 - Gel de PFGE com 11 amostras investigadas.



Legenda – P= Padrão de peso molecular Lambda ladder, unidade= quilobase (kb)

Quadro 30 - Relação entre estirpe e perfil apresentado.

<b>Estirpe</b>	<b>Fonte de isolamento</b>	<b>Perfil PFGE</b>
Bac-1	Fonte 1	A
Bac-2	Fonte 1	A1
Bac-3	Fonte 1	A
Bac-4	Fonte 2	B
Bac-5	Fonte 3	A
Bac-6	Fonte 2	B
Bac-7	Fonte 2	B
Bac-8	Fonte 2	C
Bac-9	Fonte 3	A
Bac-10	Fonte 3	A2
Bac-11	Desvio	B

Entre três estirpes oriundas de amostras da fonte 2 e a estirpe do desvio investigado, pode-se observar exatamente o mesmo perfil de restrição (denominado B), o que sugere uma relação clonal (muito próxima) e, dessa forma, uma provável origem única, segundo os critérios estabelecidos por Tenover e cols. (1995). A obtenção do perfil de restrição B observado em amostras da fonte 2 antes do evento de contaminação (uma estirpe) e após (duas estirpes) indica também a persistência deste clone na fonte 2, necessitando uma investigação aprofundada do sítio exato de contaminação para a sua total eliminação.

Como resultado, é interessante ressaltar que o uso desta técnica foi considerado satisfatório na investigação epidemiológica da possível fonte de contaminação neste evento, a partir da qual pode ser observada relação clonal entre os estirpes de uma das prováveis fontes de contaminação (fonte 2) e a estirpe observada no desvio da qualidade (evento de contaminação). A realização de uma investigação utilizando diretamente as estirpes bacterianas envolvidas no evento e a obtenção de uma correlação avaliada por uma técnica analítica de valor epidemiológico representou uma investigação mais fidedigna, quando comparada ao método de investigação de desvios atualmente utilizado pelas indústrias farmacêuticas em geral, que se baseia somente pela análise dos resultados impressos (obtidos a partir dos laudos emitidos), sem uso das estirpes envolvidas e sem método analítico.

#### 4.4 CONSTRUÇÃO DE CATÁLOGO DE IDENTIFICAÇÃO

Com intuito de registrar a diversidade bacteriana identificada na SEPIN, foi construído um modelo de catálogo (APÊNDICE A). Foram construídas duas fichas a partir deste modelo proposto: uma com informações sobre *Micrococcus luteus* (a partir da estirpe *Micrococcus luteus* B934, no APÊNDICE K) e uma sobre o gênero *Streptomyces* (estirpe *Streptomyces* spp. B1047, no APÊNDICE J).

Este catálogo representa uma iniciativa importante para o conhecimento das espécies ambientais, em especial as de ambientes industriais. Esta microbiota isolada de áreas controladas apresenta grande variação e diferenças marcantes quando comparadas as estirpes isoladas de solo, da agropecuária e da clínica (humana e animal). Em geral, estas espécies não estão amplamente descritas em livros didáticos ou outras fontes de referência, gerando uma grande lacuna para a sua correta identificação pelo Controle Microbiológico de Qualidade de produtos de saúde. Este catálogo representa uma fonte de referência futura para outras instituições que trabalhem com CQ de medicamentos e imunobiológicos.

Este catálogo será utilizado pela equipe de identificação microbiana, sendo mais uma ferramenta disponibilizada para auxiliar a conclusão das identificações.

#### 4.5 PROPOSTA DE SISTEMA EXCLUSIVO DE IDENTIFICAÇÃO E DE RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO:

A identificação de micro-organismos isolados a partir de ambientes controlados consta como um dos principais desafios ao CQ da indústria farmacêutica. A Anvisa e a OMS exigem a identificação em nível de espécie e o não atendimento a esta exigência implica em transgressão (BRASIL, 2010, WHO, 2011, WHO, 2012). Em relação ao método que atenda essa exigência, tanto as Farmacopeias quanto os Compêndios não determinam o procedimento ideal de identificação. Além disso, ainda não há um consenso sobre qual seria este procedimento, uma vez que cada método apresenta limitações (custo, banco de dados, sensibilidade, entre outros).

A proposta de um sistema que pudesse resolver não só a identificação de todo micro-organismo isolado, mas que também permitisse a elucidação de sua origem de contaminação por meio de método analítico, até então era uma utopia do CQ industrial, não tendo sido encontrada nenhuma proposta que resolvesse o assunto de maneira integrada e de forma definitiva.

Os resultados obtidos nas diversas etapas do presente trabalho forneceram subsídios para a proposta (e a verificação da funcionalidade) de um sistema integrado de identificação e de rastreamento de fontes de contaminação. Este sistema poderá ser implementado em qualquer unidade industrial que disponibilize os métodos sugeridos (MALDI-TOF/MS, sequenciamento de genes conservados e PFGE), permita a construção de uma coleção de culturas de micro-organismos autóctones e apresente corpo técnico capacitado para a construção de um BD *in house*.

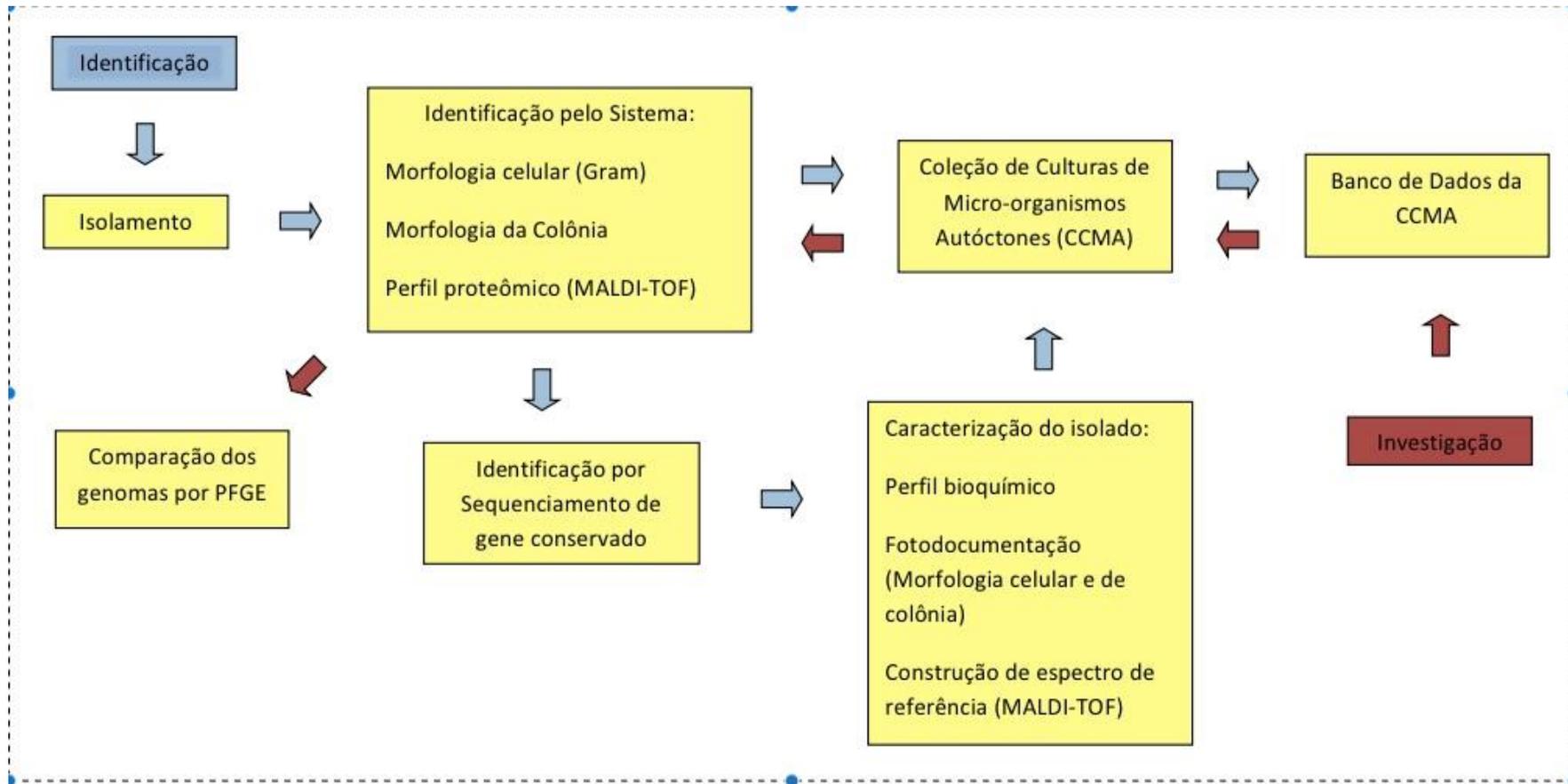
Este sistema visa permitir que cada microbiota autóctone seja inequivocamente identificada e que o Controle de Qualidade realize investigações fidedignas das possíveis fontes de contaminação, sendo específico para cada unidade Industrial.

#### 4.5.1 Fluxograma proposto

O fluxograma do Sistema Integrado de Identificação de Micro-organismos e de Investigação de Fontes de Contaminação proposto está ilustrado na Figura 34.

Cada uma das etapas está discriminada e apresenta a cor das setas (azul ou vermelha) indica a sequência a ser seguida, dependendo da atividade (Identificação ou Investigação) que se deseja realizar.

Figura 34 - Fluxograma do Sistema Integrado de Identificação de Micro-organismos e Investigação de Origem de Contaminação.



Fonte: Elaborado pela autora

As setas de cor azul indicam a sequência de etapas do processo de Identificação de Micro-organismos. Nesta, todas as amostras serão semeadas em placas de ASC e incubadas em estufa bacteriológica a 30-35 °C, sendo o período de incubação variável (dependendo do tempo de crescimento de cada micro-organismo). Cada colônia isolada será repicada para uma placa de TSA e incubada nas mesmas condições. Após crescimento suficiente, as culturas serão submetidas a coloração de Gram (segundo protocolo sugerido no APÊNDICE C) e a identificação pelo VITEK MS RUO (segundo protocolo sugerido no APÊNDICE G). Serão utilizados três parâmetros de identificação: o resultado da identificação apresentado pelo software SARAMIS; as características das colônias (cultivo em placas de ASC e TSA); e as características morfo-tintórias (observação do resultado do Gram). De acordo com o resultado apresentado, ocorrerá uma dicotomia entre as estirpes identificadas (seguindo as etapas de inserção na Bacterioteca/Banco de Dados e liberação do laudo analítico) e as não identificadas. Quando os três parâmetros apresentarem concordância (resultados característicos e esperados para cada espécie identificada), o resultado da identificação será considerado conclusivo e estará apto a ser liberado a partir de laudo analítico e a estirpe será incorporada à Bacterioteca. Nas estirpes cujos resultados forem inconclusivos ou divergentes (quando os três parâmetros observados estiverem em desacordo com o esperado), as mesmas serão submetidas a identificação pelo kit MicroSEQ®. Após esta identificação, o resultado será considerado conclusivo e estará apto a ser liberado a partir de laudo analítico. Em seguida, todas as estirpes identificadas pelo MicroSEQ® serão caracterizadas pelo VITEK MS RUO e pelo VITEK 2 Compact; terão suas culturas fotografadas (em placas de ASC e de TSA); e terão suas lâminas de Gram fotografadas. Os dados obtidos serão utilizados para alimentar o Banco de Dados do VITEK MS RUO, o Banco de dados da Bacterioteca e o Catálogo de Identificação da Unidade. As estirpes serão então incorporadas à Bacterioteca.

Quando o objetivo for a investigação de fontes de contaminação, a sequência das etapas será determinada pelas setas de cor vermelha. Para a investigação, em caso de ocorrência de desvio, será realizada consulta ao banco de dados da Bacterioteca para a busca de estirpes que estejam

epidemiologicamente relacionados com a estirpe encontrada no desvio. Em seguida, as estirpes serão recuperadas na Bacterioteca e novamente submetidos a identificação (VITEK MS RUO, coloração de Gram e características de colônia), para confirmação da identidade. As estirpes serão então analisadas pela técnica de PFGE e os perfis de restrição obtidos serão comparados e avaliados na busca da provável fonte de contaminação.

#### 4.5.2 Sequenciamento de cepas de difícil identificação

Esta etapa será realizada para todas as estirpes que apresentarem identificação inconclusiva ou divergente (entre o observado na lâmina de Gram e os sistemas VITEK MS RUO e/ou VITEK 2 Compact). Esta etapa deverá ser realizada conforme o descrito no item 3.5.4 do presente trabalho (Identificação pelo sistema MicroSEQ®500) e segundo Protocolo sugerido no APÊNDICE F.

O resultado obtido na identificação pelo MicroSEQ® será liberado no laudo analítico e inserido no Banco de Dados da Coleção de Culturas.

#### 4.5.3 Construção de uma Base de Dados de espectros própria

As estirpes que forem submetidas a identificação pelo kit MicroSEQ® deverão ser submetidas a caracterização pelo VITEK MS RUO, para a construção de um SuperSpectra e a inserção deste no BD do SARAMIS. Esta etapa deverá ser realizada conforme o descrito no item 3.9 do presente trabalho (Caracterização e identificação de estirpes...o uso de estirpes autóctones)

#### 4.5.4 Fotodocumentação e inserção no Catálogo de Identificação

As estirpes que forem submetidas a identificação pelo kit MicroSEQ® deverão ser fotografados (lâmina de Gram e cultivos em placas de TSA e de ASC) para a construção de uma nova ficha do catálogo de identificação, segundo o descrito no item 3.10 do presente trabalho (Construção de catálogo de identificação), com a utilização do modelo de ficha sugerido (APÊNDICE A). Todas as informações geradas a partir da nova identificação (nova espécie ou novo gênero) deverão ser adicionadas a ficha, que deverá ser incorporada ao catálogo de identificação.

#### 4.5.5 Preservação das cepas em coleção de cultivos

Todos os estirpes bacterianos deverão ser preservados numa Coleção de Culturas e os seus dados deverão ser registrados no BD da mesma, conforme o descrito nos itens 3.2 (Construção do Banco de Dados da Coleção de Culturas (Bacterioteca)) e 3.6 (Preservação das estirpes bacterianas da coleção de culturas (Bacterioteca)) do presente trabalho.

Futuramente, estas cepas também serão liofilizadas, e desta forma a bacterioteca estará preservada por dois métodos, conforme recomendações dos *guidelines* da Federação Mundial de Coleções de Cultura (WFCC, 2010) da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2007) e da Sociedade Brasileira de Microbiologia (SETTE *et al.*, 2007).

#### 4.5.6 Uso do Banco de Dados, da Bacterioteca e do PFGE na investigação de fontes de contaminação

A consulta ao Banco de Dados da Bacterioteca será a primeira etapa a ser realizada e informações a respeito do desvio (lote envolvido, data do

processo, local de ocorrência e espécie identificada) serão utilizadas para selecionar outras estirpes da Bacterioteca que apresentem informações em comum. A ferramenta “Filtro” do *software* Excel deverá ser utilizada no cruzamento destas informações para a busca de estirpes. Estas cepas deverão ser avaliadas através da técnica de PFGE, segundo protocolo sugerido no APÊNDICE L. Este protocolo deverá ser adaptado em função do gênero pesquisado, onde a consulta a protocolos descritos em artigos científicos e trabalhos acadêmicos deve constar como uma etapa prévia a sua execução. Uma vez estabelecida a adequação do protocolo gênero-específico, as estirpes serão processadas e terão seus perfis de restrição avaliados. Os critérios descritos por Tenover e cols. (1995) deverão ser observados. O resultado desta análise deverá ser emitido em forma de relatório técnico, a ser construído em parceria com profissionais da Garantia da Qualidade e da área de Produção envolvida.

## 5 CONCLUSÕES

- A avaliação e a incorporação de novas metodologias de identificação de micro-organismos autóctones foram realizadas com êxito e contribuíram para a melhoria dos resultados de Identificação de Contaminantes da SEPIN;
- A construção da Bacterioteca e de um Banco de Dados associado auxiliaram no conhecimento da microbiota autóctone de Bio-Manguinhos e na investigação das origens de contaminação, se apresentando como ferramenta útil ao Controle de Qualidade de Indústrias;
- A técnica de PFGE foi empregada com sucesso na investigação de um desvio da qualidade;
- A construção de um Banco de Dados *in house* associado ao *software* SARAMIS se mostrou viável;
- O Sistema Integrado de Identificação de Micro-organismos e Investigação de Origem de Contaminação foi avaliado e considerado aplicável.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C.S.; PINTO, T.J.A.; OLIVEIRA, D.C. Áreas limpas: estudo de correlação entre partículas viáveis e não viáveis. **Braz J Pharm Sci**, v.39, n.2, p.177-84, 2003.
- ALEMÁN, Z.W.; DÍAZ, R.A.J.; ROSA, O.E.D. Colección de cultivos microbianos. Apuntes sobre su desarrollo. **Rev Cubana Hig Epidemiol**. v.41, n.1, 2003.
- ALEMÁN, Z.W.; HERNÁNDEZ, B.I.; ORTA, M.A.; BELTRÁN, J.R. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. **Rev Cubana Hig Epidemiol**., v. 42, n.1, ene.-abr., 2004.
- AMARAL, F.D. Contaminacao microbiana em ambiente industrial farmaceutico. **Rev Soc Bra Con Cont**, v.57, p.32-37, 2004.
- ANGELAKIS, E.; MILLION, M.; HENRY, M.; RAOULT, D. Rapid and Accurate bacterial identification in probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass spectrometry. **J Food Sci**, v.76, n.8, p.M568-M571, 2011.
- ANHALT, J.P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Anal Chem**, v.47, p.219-225, 1975.
- ANAGNOSTEC. Operating Instructions – AXIMA@SARAMIS, MALDI-TOF MS based analysis of microbiological samples for identification with AnagnosTec SARAMIS, 67p., 2008.
- AROSIO, M.; NOZZA, F.; RIZZI, M.; RUGGERI, M.; CASELLA, P.; BERETTA, G.; RAGLIO, A.; GOGLIO, A. Evaluation of the MicroSeq 500 16S rDNA-based gene sequencing for diagnosis of culture-negative bacterial meningitis. **New Microbiol**., v. 31, n.3, p.343-9, 2008.
- BAIO, P. V. P. Identificação Bioquímica e Caracterização Molecular de Bactérias Corineformes e Nocardioformes Analisadas no Setor de Identificação Bacteriana do DM/INCQS/FIOCRUZ. **Dissertação de Mestrado em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**, Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2007.
- BARBERIS, C.; ALMUZARA, M.; JOIN-LAMBERT, O.; RAMÍREZ, M.S.; FAMIGLIETTI, A.; VAY, C. Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. **Plos One**, v.9, n.9, e106303, 2014.
- BARBUDDHE, S.B.; MAIER, T.; SCHWARZ, G.; *et al.* Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Appl Environ Microbiol**, v.74, p. 5402-5407, 2008.
- BIO-MANGUINHOS.[www.bio.fiocruz.br](http://www.bio.fiocruz.br) Colocar Acesso em junho de 2014.

BIZZINI, A., DURUSSEL, C., BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains. **J Clin Microbiol**, v.48, p.1549-1554, 2010.

BLONDIAUX, N., GAILLOT, O., COURCOL, R.J. MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille. **Pathol Biol**, v. 58, p.55-57, 2010.

BODTKER, G.; THORSTENSON, T.; LILLEBO, B.L.; THORBJORNSEN, B.E.; ULVOEN, R.H.; SUNDE, E.; TORSVIK, T. The effect of long-term nitrate treatment on SRB activity, corrosion rate and bacterial community composition in offshore water injection systems. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.35, n.12, p.1625-36, 2008.

BOHME, K.; FERNANDEZ-NO, I.C.; PAZOS, M.; GALLARDO, J.M.; BARROS-VELAZQUEZ, J.; CANAS, B.; CALO-MATA, P. Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting. **Electrophoresis**, n. 34, p. 877-887, 2013.

BOSSHARD, P. P. *et al.* ABELS, S; ALTWEGG, M; BOTTGER, E. C; ZBINDEN, R. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase negative Gram positive cocci in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 2065-2073, 2004.

BRASIL. Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências.

BRASIL. Resolução RDC nº17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 abr.2010. Seção 1, p.94-110, 2010.

BRASIL. Agência nacional de Vigilância Sanitária. Guia da qualidade para sistemas de tratamento do ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica

BUCK, J.D. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v.44, n.4, p. 992-993, 1982..

CALDERARO, A.; GORRINI, C.; PICCOLO, G.; MONTECCHINI, S.; BUTTRINI, M.; ROSSI, S.; PIERGIANNI, M.; ARCANGELETTI, M.C.; DE CONTO, F.; CHEZZI, C.; MEDICI, M.C. Identification of *Borrelia* species after creation of an in-house MALDI-TOF MS database. **Plos One**, v.9, capítulo 2, p.1-7, e88895, 2014.

CARBONNELLI, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E. DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J.L.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X. MALDI-TOF mass

spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clin Biochem**, v. 44, p.104-9; 2011.

CARROLL, K.C. & WEINSTEIN, M.P. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., JORGENSEN, J.H., et al. eds. Manual of clinical microbiology. 9ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p. 192-217, 2007.

CARVALHO, C.; MACHADO, R.B.; TIMM, L.B. Direito Sanitário Brasileiro. **Editora Quartier Latin**, 250p., 2004.

CASSAGNE, C., RANQUE, S., NORMAND, A.C., et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **PLoS One**, v.6, p.e28425, 2011.

CHAP, J.; JACKSON, P.; SIQUEIRA, R.; GASPAS, N.; QUINTAS, C.; PARK, J.; OSAILI, T.; SHAKER, R.; JARADAT, Z.; HARTANTYO, S.H.; ABDULLAH SANI, N.; ESTUNINGSIH, S.; FORSYTHE, S.J. International survey of *Cronobacter sakazakii* and others *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. **Int J Food Microbiol.**, v.31, n.2, p.185-8, 2009.

CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL. The impact of a customized MALDI-TOF library for environmental microbial identifications. 2013. Disponível em: <[http://www.criver.com/files/pdfs/emd/accugenix/qc\\_ag\\_d\\_maldi-tof\\_library\\_tech\\_sheet.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/emd/accugenix/qc_ag_d_maldi-tof_library_tech_sheet.aspx)> Acesso em: 10 janeiro 2015.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S.; et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. **J Clin Microbiol**, v.48, p.1169-1175, 2010.

CLAYDON, M.A., DAVEY, S.N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D.B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nat Biotechnol**, v.14, p. 1584-1586, 1996.

CENCIARINI-BORDE, C. et al. Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. **Future Microbiol.**, 4:45-64, 2009.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, p. 840-862, 2004.

COBO, F.; STACEY, G.N.; CORTES, J.L.; CONCHA, A. Environmental monitoring in stem cell banks. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.70, p.651-662, 2006.

COUTO, M. Monitoramento e controle microbiológico. **Revista SBCC**, ed.55, p.10-14, 2011.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Rev**, v.36, p.380-407, 2012.

CUNDELL, A. M. Microbial Identification Strategies in the Pharmaceutical Industry. **PDA J Pharm Sci Technol**, v. 60, n. 2, p. 111-123, 2006.

DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; VACCARO, L.; TORELLI, R.; POSTERARO, P.; RICCIARDI, W.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B. Development and validation of in-house database for MALDI-TOF MS-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. **J Clin Microbiol**, v.52, n.5, 1453-8, 2014.

DENG, J., FU, L., WANG, R., YU, N., DING, X., JIANG, L. FANG, Y., JIANG, C., LIN, L., WANG, Y., CHE, X. Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. **J Thorac Dis**, v.6, p.539-544, 2014.

DHIMAN, N., HALL, L., WOHLFIEL, S.L., BUCKWALTER, S.P., WENGENACK, N.L. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. **J Clin Microbiol**, v.49, p. 1614-1616, 2011.

DIECKMANN, R.; GRAEBER, I.; KAESLER, I.; SZEWZYK, U.; VON DOHREN, H. Rapide screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). **Appl Microbiol Biotechnol**, v.67, p. 539-548, 2005.

DIECKMANN, R., MALORNY, B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. Enterica serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Appl Environ Microbiol**, v.77, p.4136-4146, 2011.

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARLIOZ, A.; MARTELIN, R.; GAYRAL J.P.; RAOULT, D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **J Clin Microbiol**, v. 38, n.10, p. 3623-30, 2000.

DRANCOURT, M; BERGER, P; RAOULT, D. Systematic 16S rRNA Gene Sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 2197-2202, 2004.

DUPONT, C.; SIVADON-TARDY, V.; BILLE, E.; *et al.* Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. **Clin Microbiol Infect**, v.16, p.998-1004, 2010.

EIGNER, U. *et al.* Analysis of the Comparative Workflow and Performance Characteristics of the VITEK 2 and Phoenix Systems. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, p. 3829-3834, 2005.

EL KHECHINE, A.; COUDERC, C.; FLAUDROPS, C.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of *Mycobacteria* in routine clinical practice. **Plos One**, v.6, p.e24720, 2011.

ERCOLINI, D.; RUSSO F., FERROCINO, I.; VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. **Food Microbiol**, v. 26, n.2, p.228-31, 2009.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Biological Test: sterility. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, vol. 1, 2008, p. 155-157.

EUZEBY, J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Int J Syst Bacteriol**, n.47, p. 590-592, 1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>

FENSELAU, C.; DEMIREV, P.A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrom Rev**, v.20, p.157-171, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Vol.1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 808p., 2010. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm). Acesso em: 12 janeiro 2015

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing. 2004. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070342.pdf>>. Acesso em: 15 de setembro de 2010.

FONTANA, C.; FAVARO, M.; PELLICIONI, M.; PISTOIA E.S.; FAVALLI, C. Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n. 2, p.615-9, 2005.

FUNG, D.Y.C. Rapid Method and Automation in Microbiology. **Compr Rev Food Sci Food**, v.1, p.3-32. 2002.

GONÇALVES, J.L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J.R.; BRAGA, P.A.C.; FERREIRA, C.R.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Vet Microbiol**, n.173, p.147-151, 2014.

GUO, L.; YE, L.; ZHAO, Q.; MA, Y.; YANG, J.; LUO, Y. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. **J Thorac Dis**, v.6, p. 534-538, 2014.

HOLLAND, R.D., WILKES, J.G., RAFII, F., *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser

desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v.10,p.1227-1232, 1996.

ISHIKAWA, K. What is total quality control? The japanese way. Prentice Hall, 1985, 240p.

JIMENEZ, L. Rapid methods for the microbiological surveillance of pharmaceuticals. **PDA J Pharm Sci Technol**, v.55, 5):278-285, 2001.

JIMENEZ, L.; SMALLS, S.; JIMENEZ, L.; SMALLS, S. Molecular Detection of *Burkholderia cepacia* in toiletry, cosmetic, and pharmaceutical raw materials and finished products. **J AOAC Int.**, v.83, p. 963-6, 2000.

KAWAI, M.; YAMAGISHI, N.; YAMAGUCHI, N.; TANI, K.; NASU, M. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **J Appl Microbiol**, v. 97, n.6, p.1123-31, 2004.

KIM, M.; HEO, S.R.; CHOI, S.H.; KWON, H.; PARK, J.S.; SEONG, M.W.; LEE, D.H.; PARK, K.U.; SONG, J.; KIM, E.C. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative Staphylococci. **BMC Microbiol**, v. 23, n.8, p.233, 2008.

KULAKOV, L.A. et al. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial system. **Appl Environ Microbiol**, v.68, n.4, p.1548-55, 2002.

LAY JR, J.O. MALDI-TOF Mass Spectrometry of Bacteria. **Mass Spectrom Rev.**, v. 20, p. 172-94, 2001.

LEE, T-F.; LEE, H.; CHEN, C-M.; DU, S-H.; CHENG, Y-C.; HSU, C-C.; CHUNG, M-Y.; TENG, S-H.; TENG, L-J.; HSUEH, P-R. Comparison of the accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with that of other commercial identification systems for identifying *Staphylococcus saprophyticus* in urine. **J Clin Microbiol**, v.51, n.5, p. 1563-1566, 2013.

LI, Y., GU, B.; LIU, G.; XIA, W.; FAN, K.; MEI, Y.; HUANG, P.; PAN, S. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. **J Thorac Dis**, v.6, n.5, p. 517-523, 2014.

LIN, Y. Use of potassium hydroxide technique for the differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Brew. Dig.**, v.55, p.36-37, 1980.

LPSN BACTERIO.NET. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>> Acesso em: 20 de outubro de 2014.

MANJI, R.; BYTHROW, M.; BRANDA, J.A.; BURNHAM, C.A.D.; FERRARO, M.J.; GARNER, O.B.; JENNEMANN, R.; LEWINSKI, M.A.; MOCHON, A.B.; PROCOP, G.W.; RICHTER, S.S.; RYCHERT, J.A.; SERCIA, L.; WESTBLADE,

L.F.; GINOCCHIO, C.C. Multi-center evaluation of the VITEK® MS system for mass spectrometric identification of non-*Enterobacteriaceae* Gram-negative bacilli. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.33, p. 337-346, 2014.

MARKO, D.C.; SAFFERT, R.T.; CUNNINGHAM, S.A.; HYMAN, J.; WALSH, J.; ARBEFEVILLE, S.; HOWARD, W.; PRUESSNER, J.; SAFWAT, N.; COCKERILL, F.R.; BOSSLER, A.D.; PATEL, R.; RICHTER, S.S. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting Gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol**, v.50, n.6, p. 2034-2039, 2012.

MARTIN, P.G.; GONZÁLEZ, M.B.; MARTÍNEZ, A.R.; LARA, V.G.; NAVEROS, B.C. Isolation and characterization of the environmental bacterial and fungi contamination in a pharmaceutical unit of mesenchymal stem cell for clinical use. **Biologicals**, v.40, p. 330-337, 2012.

MATTOSO, J.M.V.; MEDEIROS, L.M.; FRAZÃO, A.M.; CRUZ, F.V.; NASCIMENTO, L.G.; BASTOS, L.C.C.; BRAGA, L.M.P.S.; SANTOS, P.S.G.; RIBEIRO, N.C.; TRAVASSOS, A.R.; SILVA, W.R.C.; COSTA, C.C.; SERODIO, L.R.; HOKAMA, D.A.; VIEIRA, V.V.; SILVA, M. Cepas autóctones no Controle de Qualidade: o exemplo de Bio-Manguinhos. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, 2011.

MEDEIROS, L.M.; FRAZÃO, A.M.; MATTOSO, J.M.V.; CRUZ, F.V.; BASTOS, L.C.C.; NASCIMENTO, L.G.; BRAGA, L.M.P.S.; RIBEIRO, N.C.; SANTOS, P.S.G.; SILVA, W.R.C.; REIS, C.M.F.; MARTINS, L.D.; ASSINY, D.; SERODIO, L.R. Padrões autóctones usados no Controle de Qualidade de Imunobiológicos. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012.

MEDEIROS, L.M.; FRAZÃO, A.M.; MATTOSO, J.M.V.; CRUZ, F.V.; NASCIMENTO, L.G.; BASTOS, L.C.C.; BRAGA, L.M.P.S.; SANTOS, P.S.G.; RIBEIRO, N.C.; TRAVASSOS, A.R.; SILVA, W.R.C.; COSTA, C.C.; SERODIO, L.R.; HOKAMA, D.A.; VIEIRA, V.V.; SILVA, M. A Bacterioteca de Bio-Manguinhos: estudo da biodiversidade em áreas limpas e sua aplicação na qualidade. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, 2011<sub>a</sub>.

MEDEIROS, L.M.; FRAZÃO, A.M.; MATTOSO, J.M.V.; CRUZ, F.V.; NASCIMENTO, L.G.; BASTOS, L.C.C.; BRAGA, L.M.P.S.; SANTOS, P.S.G.; RIBEIRO, N.C.; SILVA, W.R.C.; TRAVASSOS, A.R.; COSTA, C.C.; SERODIO, L.R.; HOKAMA, D.A.; VIEIRA, V.V. Primeira coleção de espécimes isolados de áreas controladas: a Bacterioteca de Bio-Manguinhos e sua aplicação na qualidade. In: II Simpósio Internacional de Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2011<sub>b</sub>.

MEDEIROS, L.M.; FRAZÃO, A.M.; MATTOSO, J.M.V.; CRUZ, F.V.; OLIVEIRA, L.A.; NASCIMENTO, L.G.; SANTOS, P.S.G.; RIBEIRO, N.C.; TRAVASSOS, A.R.; SILVA, W.R.C.; SERODIO, L.R.; HOKAMA, D.A.; COSTA, C.C. Introdução de cepas bacterianas e fúngicas autóctones na promoção de

crescimento em meios de cultura utilizados em Bio-Manguinhos. In: V Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária (V SIMBRAVISA), Belém, 2010.

MIGNARD, S & FLANDROIS, J. P. 16S rRNA Sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **J Microbiol Methods**, v. 67, n. 3, p. 574–581, 2006.

MOREIRA, B.M. *et al.* *Ralstonia pickettii* and *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infections related to infusion of contaminated water for injection. **J Hosp Infect**, v. 60, p. 51-55, 2005.

MUNOZ, R.; LOPEZ-LOPEZ, A.; URDIAIN, M., MOORE, E.R.B., ROSSELLO-MORA, R. Evaluation of MALDI-TOF whole cell profiles to assess the culturable diversity of aerobic and moderately halophilic prokaryotes thriving in solar saltern sediments. **Syst Appl Microbiol**, v.34, p. 69-74, 2011.

NAVAS, M.; PINCUS, D.H.; WILKEY, K.; SERCIA, L.; LASALVIA, M.; WILSON, D.; PROCOP, G.W.; RICHTER, S.S. Identification of aerobic Gram-Positive Bacilli by use of VITEK MS. **J Clin Microbiol**, v.52, n.4, p.1274-1277, 2014.

NGUYEN, D.T.; VAN HOORDE, K.; CNOCKAERT, M.; DE BRANDT, E.; *et al.* Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. **Lett Appl Microbiol**, v.55,p.265-273, 2012.

OECD. 2007. Organisation for Economic Co-operation and Development Best practice guidelines for Biological Resource Centres. OECD Secretary-General. 115pp.

PAVLOVIC, M.; HUBER, I.; KONRAD, R.; BUSCH, U. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. **Open Microbiol J**, v. 7, p.135-141, 2013.

PEREIRA, C.C. Identificacao da microbiota presente em áreas classificadas de produção de uma indústria farmacêutica. **Monografia de Especializacao – Programa de Pos-graduacao em Microbiologia, UFMG**. 67p. 2009. Disponível em: <<http://microbiologia.icb.ufmg.br/monografias/127.pdf>> Acesso em: 30 dezembro 2014.

PETTI, C; A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clin Infect Dis**, v. 15, n.44, p. 1108-1114. 2007.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Controle Biológico de Qualidade e Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.3 ed., São Paulo: Atheneu editora, 2010.

PONCE, B.C. *et al.* Calidad microbiológica del aire de una unidad de preparados farmacéuticos estériles. **Rev Chil Infect**, n.28, p.14-18, 2011.

RIBOT, E.M. *et al.* Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Path Dis.**,v.3, n.1, p.56-67. 2006.

RICHTER, S.S.; SERCIA, L.; BRANDA, J.A.; BURNHAM, C.A.D.; BYTHROW, M.; FERRARO, M.J.; GARNER, O.B.; GINOCCHIO, C.C.; JENNEMANN, R.; LEWINSKI, M.A.; MANJI, R.; MOCHON, A.B.; RYCHERT, J.A.; WESTBLADE, L.F.; PROCOP, G.W. Identification of *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, p. 1571-1578, 2013.

RODRIGUES, P.; SANTOS, C.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Species identification of *Aspergillus* section Flavi isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **J Appl Microbiol**, v. 111, p. 877-92; 2011.

RODRIGUEZ-SANCHEZ, B.; MARIN, M.; SANCHEZ-CARRILLO, C.; CERCENADO, E.; RUIZ, A.; RODRIGUEZ-CREIXEMS, M.; BOUZA, E. Improvement of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of difficult-to-identify bacteria and its impact in the workflow of a clinical microbiology laboratory. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.79, n.1, p.1-6, 2014.

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.

RYCHERT, J.A.; *et al.* Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. **J Clin Microbiol**, v.51, n.7, p. 2225-2231, 2013.

RYZHOV, V. & FENSELAU, C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. **Anal Chem**, v.73, p.746-750, 2001.

SANDLE, T. A review of cleanroom microflora: types, trends, and patterns. **PDA J Pharm Sci Technol**, v.65, n.4, p.392-403, 2011.

SANTOS, C.; LIMA, N.; SAMPAIO, P.; PAIS, C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.71, p.304-8, 2011.

SENG, P., DRANCOURT, M., GOURIET, F. *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin Infect Dis**, v.49, p.543-551, 2009.

SETTE, L.D. CUPOLILLO, E., TIGANO, M.S., VAZOLLER, R.F. & CANHOS, V.P. Recomendações para operação e gerenciamento de coleções de culturas de microrganismos. **Microbiologia in foco.**, v.2, p.49-55, 2007.

SHEBARA, , N.S., YASSIN, A.S., AMIN, M.A. High-throughput molecular identification of *Staphylococcus* spp. isolated from a clean room facility in a environmental monitoring program. **BMC Research Notes**, v.3, p.278, 2010.

SOGAWA, K.; WATANABE, .; SATO, K.; SEGAWA, S.; MIYABE, A.; MURATA, S.; SAITO, T.; NOMURA, F. Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry: improved performance by incorporation of in-house spectral data into a comercial database. **Anal Bioanal Chem**, n.403, p.1811-1822, 2012.

SOUTO, C.R. Avaliação dos Medicamentos Injetáveis encaminhados ao INCQS no período de janeiro de 2000 a junho de 2006 pelas vigilâncias sanitárias municipais, estaduais e Anvisa. **Dissertação mestrado profissional. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2008.**

SPARBIER, K.; WELLER, U.; BOOGEN, C.; KOSTRZEWA, M. Rapid detection of *Salmonella* sp. by means of a combination of selective enrichment broth and MALDI-TOF MS. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.31, p.767-773, 2012.

STEENSELS, D.; VERHAEGEN, J. LAGROU, K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. **Acta Clin Belg**, v.66, p.267-273, 2011.

SUN,J.F.; SHI, Z.X.; GUO, H.C.; LI, S.; TU, C.C. Proteomic analysis of Swine Serum following highly virulent classical swine fever virus infection. **Virology**, v.8, p.8-107; 2011.

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

TAN, K.E., ELLIS, B.C., LEE, R., STAMPER, P.D., ZHANG, S.X., CARROLL, K.C. Prospective evaluation of a Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. **J Clin Microbiol**, v.50, n.10, p. 3301-3308, 2012.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, n. 33, p. 2233-2239, 1995.

TEKIPPE, E.M. & BURNHAM, C-A.D. Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or

difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.33, p. 2163-2171, 2014.

THEEL, E.S.; SCHMITT, B.H.; HALL, L.; CUNNINGHAM, S.A.; WALCHAK, R.C.; PATEL, R.; WENGENACK, N.L. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v.50, n.9, p.3093-3095, 2012.

TOKAJIAN, S.; HASHWA, F. Phenotypic and genotypic identification of *Aeromonas* spp. isolated from a chlorinated intermittent water distribution system in Lebanon. **J Water Health**, v.2, n.2, p.115-22, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 37. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention. Disponível em: <http://www.usp.org> Acesso em 2014.

UTESCHER, C.L.A.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R.; GAMBALE, V. Microbial monitoring of clean rooms in development of vaccines. **Braz J Microbiol.**, v.38, n.4, p.710-716, 2007.

VAN VEEN, S.Q.; CLAAS, E.C.; KUIJPER, E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **J Clin Microbiol**, v.48, p.900-907, 2010.

VILA, J., JUIZ, P.; SALAS, C.; ALMELA, M.; DE LA FUENTE, C.G.; ZBOROMYRSKA, Y.; NAVAS, J.; BOSCH, J.; AGÜERO, J.; DE LA BELLACASA, J.P.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Identification of Clinically Relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **J Clin Microbiol**, v.50, n.5, p.1745-1747, 2012.

WEBER, E.; CARLOTTI, A.; FURTADO, M.R. Microbial identification using a sequencing-based system: bacterial and fungal case studies. **EJPPS**, v.11, n.2, p.45-52, 2006.

WELKER, M.; MOORE, E.R.B. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. **Syst Appl Microbiol**, n. 34, p. 2-11, 2011.

WHO. Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities Draft document: Points to consider for manufacturers of human vaccines, 37p., Eighth draft, 27 February, 2011.

WHO. Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities. Points to consider for manufacturers of human vaccines, 37p., November, 2012. Disponível em: [http://www.who.int/immunization\\_standards?vaccine\\_quality/env\\_monitoring\\_cleanrooms\\_final.pdf](http://www.who.int/immunization_standards?vaccine_quality/env_monitoring_cleanrooms_final.pdf)

WFCC. World Federation for Culture Collections guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. Belgium: WFCC Secretariat. 3ed. 19pp, 2010.

WU, G.; LIU, X. Characterization of predominant bacteria isolates from clean rooms in a pharmaceutical production unit. **J Zhejiang Univ Sc B**, v.8, n.9, p.666-72, 2007.

XAVIER, M.P.; VIEIRA, A.A.R.M.; SILVA, A.S.S.; XAVIER, M.A.S.; XAVIER, A.R.E.O. Importância do monitoramento ambiental em áreas classificadas. **Rev Biologia e Farmácia**, v.9, n.4, p.1-12, 2013.

XIAO, D.; YE, C.; ZHANG, H.; KAN, B.; LU, J.; XU, J.; JIANG, X.; ZHAO, F.; YOU, Y.; YAN, X.; WANG, D.; HU, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, J. The construction and evaluation of reference spectra for the identification of human pathogenic microorganisms by MALDI-TOF MS. **Plos One**, v.9, p.1-10, e106312, 2014.

## APÊNDICE A – Modelo de ficha para catálogo de identificação

Gênero ou Espécie

Fotos das Culturas em placas de Agar Sangue de Carneiro a 5%

Foto 1

Foto 2

Descrição da colônia

Fotos das Culturas em placas de Agar Triptona de Soja

Foto 1

Descrição da colônia

Fotos dos esfregaços corados pelo Gram

Descrição do Gram

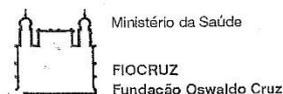
Perfil bioquímico VITEK 2

Perfil de Espectros (VITEK MS RUO)

Sequencia FASTA

Observações

## APÊNDICE B – Instrução de trabalho (IT) nº4989 “Técnica do KOH para diferenciação entre bactérias Gram negativo e Gram positivo



### INSTRUÇÃO DE TRABALHO

TÍTULO: TÉCNICA DO KOH PARA DIFERENCIAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVO E GRAM POSITIVO

UO/ELABORADORA:  
SEPIN

NÚMERO: 4989

#### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.
01	Itens: 7, 8.
02	Item: 12.

#### 2- OBJETIVOS

Descrever o método do KOH de diferenciação de bactérias *Gram* positivo e negativo sem o uso de corantes.

#### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a Seção de Esterilidade, Processos e Insumos - SEPIN.

#### 4- SIGLAS

KOH - Hidróxido de Potássio  
SEPIN - Seção de Esterilidade, Processos e Insumos

#### 5- REFERÊNCIAS

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*, Oct. 1995, p. 3756-3758  
CARLONE, G.M.; VALADEZ, M.J.; PICKETT, M.J. Methods for Distinguishing Gram-Positive from Gram-negative Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, Dec. 1983, p. 1157-1159  
BUCK, J.D. Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. 1982, p. 992-993  
GRAEVENITZ, A.V.; BUCHER, C. Accuracy of the KOH and Vancomycin Tests in Determining the Gram Reaction of Non-Enterobacterial Rods. *Journal of Clinical Microbiology*, Oct. 1983, p. 983-985  
FLUHARTY, D.M.; PACKARD, W.L. Differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria without staining. *Am. J. Vet. Clin. Pathol.* 1:31-35. 1967

#### 6- DEFINIÇÕES

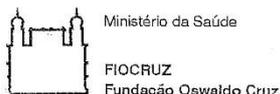
Não aplicável.

#### 7- PRÉ-REQUISITOS

##### 7.1- Materiais e equipamentos

- Acendedor elétrico ou fósforos
- Alça bacteriológica
- Bico de *bunsen*
- Cronômetro ou relógio com ponteiro de segundos
- Cultura fresca (menos de 24 horas) e pura do microrganismo a ser identificado em placa de agar nutriente ou outro meio de enriquecimento
- Frasco com solução aquosa de hidróxido de sódio a 3%
- Frascos contendo álcool a 70 % estéril
- Lâminas de vidro tamanho 25 x 75 x 1 mm, em frasco com álcool
- Lápis dermatográfico

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
17/10/2015	17/04/2018	02	01/04



## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

- Pêra ou pipetador automático
- Pinça anatômica (com ranhuras)
- Pipeta graduadas (1 mL) ou conta-gotas
- Recipiente para descarte de material perfuro-cortante
- Toalhinha descartável (*wiper*) própria para uso em sala limpa

### 8- PROCEDIMENTOS

Limpar a bancada com uma toalhinha embebida em álcool a 70% e descartá-la. Acender, em seguida, o bico de *Bunsen*.

Com o auxílio de uma pinça anatômica, retirar uma lâmina de vidro do frasco e secá-la (utilizar a chama do bico de *Bunsen* ou uma toalhinha).

Identificar a lâmina com o número da amostra, utilizando o lápis dermatográfico.

Abrir o frasco da solução de KOH a 3%. Utilizando uma pipeta, retirar uma alíquota e pingar uma gota sobre a lâmina de vidro.

Com uma alça bacteriológica previamente flambada, retirar uma quantidade visível da cultura em placa (uma "alçada") e misturar à gota de KOH na lâmina.

Misturar, continuamente, com a alça bacteriológica. A área da mistura deve ser de um a dois centímetros quadrados.

Durante a mistura, levantar a alça (no máximo a um centímetro da lâmina) e observar se há a formação de um "fio" viscoso. Este procedimento deverá ser repetido várias vezes, num período máximo de 60 segundos.

Após a formação do "fio" viscoso, ou após o tempo do teste, descartar a lâmina na caixa de descarte para perfuro-cortante.

Anotar o resultado no protocolo correspondente.

#### 8.1- Interpretação dos resultados

Caso haja a formação de um "fio" viscoso em menos de 60 segundos, a reação é considerada positiva (KOH positivo) e a bactéria é considerada Gram negativa. A viscosidade representa a dissolução da membrana externa, lipídica, da parede celular deste grupo de bactérias.

Caso não haja a presença de viscosidade (ausência de "fio") em até 60 segundos, o resultado é considerado negativo e a bactéria testada Gram positiva.

Os resultados após 60 segundos não são válidos, devendo o teste ser repetido.

### 9- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS

SEPIN.

#### 9.1- UO incluídas nesta revisão

Não aplicável.

#### 9.2- UO excluídas nesta revisão

Não aplicável.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 4989	Revisão 02	Página 02/04
-------------------------	----------------	---------------	-----------------



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
em Imunobiológicos  
Bio-Manguinhos

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 10- TREINAMENTO

Teórico e prático.

#### 10.1- Multiplicadores

Elaboradores, verificador, aprovador e todos os treinados na revisão vigente deste DI e DI-1083 – Treinamento para Qualificação em Serviço.

### 11- ANEXOS

Não aplicável.

CÓPIA NÃO CONTROLADA

/ FOLHA DE APROVAÇÃO

UO Elaboradora SEPIN	Numero 4989	Revisão 02	Página 03/04
-------------------------	----------------	---------------	-----------------



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
em Imunobiológicos  
Bio-Manguinhos

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 12- FOLHA DE APROVAÇÃO

	NOME	ASSINATURA
ELABORADO	Luciane Martins Medeiros	<u>Luciane Martins Medeiros</u>
ELABORADO	Adriana Marques Frazão	<u>Adriana Marques Frazão</u>
ELABORADO	Nilson Cesar Ribeiro	<u>Nilson C. Cesar Ribeiro</u>
VERIFICADO	Fernanda Ventura Cruz	<u>Fernanda Ventura Cruz</u>
CONFERIDO	Ricardo dos Santos de Oliveira	<u>Ricardo Oliveira</u>
APROVADO	Simone Cascardo Frota	<u>Simone Cascardo Frota</u>

CÓPIA NÃO CONTROLADA

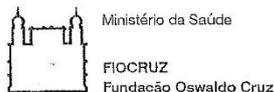
UO Elaboradora  
SEPIN

Numero  
4989

Revisão  
02

Página  
04/04

## APÊNDICE C – Instrução de Trabalho (IT) n° 7673 “Uso do aparelho para coloração de Gram SLIDEINK HEMOGRAM”



### INSTRUÇÃO DE TRABALHO

TÍTULO: USO DO APARELHO PARA COLORAÇÃO DE GRAM SLIDEINK HEMOGRAM

UNIDADE ELABORADORA:  
SEPIN

NÚMERO: 7673

#### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.
01	Item: 12.

#### 2- OBJETIVOS

Descrever a metodologia a ser seguida para utilização do equipamento de coloração de Gram *SlideInk HemoGram*.

#### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a Seção de Esterilidade, Processos e Insumos - SEPIN.

#### 4- SIGLAS

DI	- Documento Interno
LACOM	- Laboratório de Controle de Microbiológico
SEPIN	- Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
UO	- Unidade Organizacional

#### 5- REFERÊNCIAS

DI 4990 - Coloração de Gram  
Manual corador automático de lâminas *SlideInk HemoGram*  
FRIEDLY, G. *Importance of bacterial stains in the diagnosis of infectious disease. J Med Technol* 1:823-833, 1985.  
KONEMAN, E.W. Et al. *Diagnóstico Microbiológico – texto e atlas colorido – 5ª. Edição – MEDSI Editora médica e científica, 2001*

#### 6- DEFINIÇÕES

Não aplicável.

#### 7- PRÉ-REQUISITOS

##### 7.1- Material e equipamentos

- Luva descartável
- Pinça anatômica (com ranhuras)
- Toalhinha descartável estéril própria para uso em sala limpa
- Frascos contendo álcool 70% estéril
- Lâminas de vidro tamanho 25 x 75 x 1mm, em frasco com álcool
- Bico de Bunsen
- Alça bacteriológica
- Lápis dermatográfico
- Recipiente para descarte de perfuro-cortante
- Óleo de imersão
- Cultura fresca (menos de 24 horas) e pura do micro-organismo a ser identificado em placa de ágar nutriente ou outro meio de enriquecimento
- Acendedor elétrico ou fósforo
- Pipetas graduadas (1 mL) ou conta-gotas

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
17/04/2015	17/04/2018	01	01/04

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

- Pêra ou pipetador automático
- Seringa descartável estéril (3 ou 5 mL)
- Bombona para descarte de resíduo químico
- Microscópio óptico
- Corador de lâminas *SlideInk HemoGram*

### 7.2- Meios de cultura e soluções

- Solução salina a 0,85%
- *Kit* de coloração para uso em corador automático Colorgram Microbiologia *SlideInk*
- Solução de Álcool 70%

### 7.3- Documento interno

- DI 4990 - Coloração de Gram

## 8- PROCEDIMENTOS

### 8.1- Preparo dos esfregaços em lâminas

Limpar a bancada com toalhina embebida em álcool a 70% e descartá-la. Acender, em seguida o bico de Bunsen.

Com o auxílio de uma pinça anatômica, retirar uma lâmina de vidro do frasco e secá-la (utilizar a chama do bico de Bunsen ou uma toalhina).

Identificar a lâmina com o número da amostra, utilizando um lápis dermatográfico.

Se a cultura estiver em meio sólido (ágar), retirar um pequeno volume de solução salina (aproximadamente 0,1 mL) com o uso de seringa estéril e dispor uma gota sobre a lâmina. Com uma alça bacteriológica previamente flambada e resfriada, retirar uma pequena quantidade da cultura em ágar e misturá-la com a gota sobre a lâmina, homogeneizando por alguns segundos.

Se a cultura estiver em caldo, com o auxílio de pipetador, retirar uma pequena quantidade e dispor uma ou duas gotas da cultura sobre a lâmina.

Deixar a lâmina com o esfregaço da cultura secar ao ar.

Quando o esfregaço estiver seco, fixar a lâmina com o calor, passando de quatro a seis vezes pela chama do bico de Bunsen.

### 8.2- Corador de lâminas *slideink hemogram*

Ligar o equipamento, pressionar o botão "Pulso" para ativar a máquina e preencher as mangueiras com os reagentes, preparando-o para utilização. Utilizar uma toalhina embebida em álcool a 70% para limpeza dos reagentes sobre a mesa de coloração, sempre no sentido da direita para esquerda para não danificar os sensores.

Posicionar as lâminas com a face voltada para o lado esquerdo do operador na espiral de locomoção do equipamento.

A mesa de coloração irá controlar o tempo e a saída dos reagentes em cada etapa do processo.

Após a passagem das lâminas pela mesa de coloração, essas serão armazenadas no canto inferior esquerdo, o depósito com capacidade de até 100 lâminas.

Utilizar uma toalhina embebida em álcool a 70% para limpeza dos resíduos de reagentes sobre a mesa de coloração e suas ranhuras, no sentido da direita para esquerda para não danificar os sensores.

UO Elaboradora SEPIN
-------------------------

Numero 7673
----------------

Revisão 01
---------------

Página 02/04
-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

Retirar o tanque de escoamento localizado na parte frontal, abaixo da mesa, para descarte do excedente de reagente utilizado no processo em bombonas de descarte de resíduos químicos.

### 8.3- Observação das lâminas ao microscópio óptico

Seguir instruções conforme DI 4990.

### 8.4- Interpretação dos resultados

Seguir instruções conforme DI 4990.

### 8.5- Substituição do *kit* colorgram microbiologia *SlideInk*

O equipamento possui um sensor que indica a necessidade de troca do *kit* Colorgram Microbiologia. A luz de nível localizada acima da tecla Pulso irá acender quando for necessária a substituição.

Desligar o equipamento. Remover as tampas com as cinco cânulas e o *kit* Colorgram Microbiologia que está vazio. Colocar o novo *kit*, observando a posição dos recipientes na ordem apropriada, inserindo as tampas com as cânulas em cada reagente.

### 8.6- Procedimento de limpeza do equipamento *SlideInk HemoGram*

Remover as cânulas dos reagentes e deixá-las em álcool a 70%. Pressionar a tecla "Pulso" para que o álcool seja bombeado através das cânulas e mangueiras e a limpeza seja realizada.

## 9- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS

SEPIN.

### 9.1- UO incluídas nesta revisão

Não aplicável.

### 9.2- UO excluídas nesta revisão

Não aplicável.

## 10- TREINAMENTO

Teórico e Prático.

### 10.1- Multiplicadores

Elaboradores, verificador, aprovador e todos os treinados na revisão vigente deste DI e DI 1083 – Treinamento para Qualificação em Serviço.

## 11- ANEXOS

Não aplicável.

### / FOLHA DE APROVAÇÃO

UO Elaboradora	Número	Revisão	Página
SEPIN	7673	01	03/04



Ministério da Saúde  
 FIOCRUZ  
 Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
 em Imunobiológicos  
 Bio-Manguinhos

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

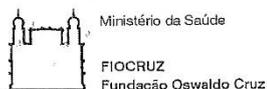
### 12- FOLHA DE APROVAÇÃO

	NOME	ASSINATURA
ELABORADO	Luciane Martins Medeiros	<u>Luciane Martins Medeiros</u>
ELABORADO	Lygia Maria Paulo da Silva Braga	<u>Lygia Maria Paulo da Silva Braga</u>
VERIFICADO	Fernanda Ventura Cruz	<u>Fernanda Ventura Cruz</u>
CONFERIDO	Marcus Vinicius dos Santos Pinto	<u>Marcus Vinicius dos Santos Pinto</u>
APROVADO	Simone Cascardo Frota	<u>Simone Cascardo Frota</u>

CÓPIA NÃO CONTROLADA

UO Elaboradora SEPIN	Numero 7673	Revisão 01	Página 04/04
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## APÊNDICE D – Instrução de Trabalho (IT) n° 7672 “Identificação de isolados bacterianos a partir do sistema VITEK 2 Compact”



### INSTRUÇÃO DE TRABALHO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS A PARTIR DO SISTEMA VITEK 2 COMPACT

UO ELABORADORA:  
SEPIN

NÚMERO: 7672

#### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.
01	Item: 12.

#### 2- OBJETIVOS

Descrever a metodologia para o preparo de amostras a serem submetidas ao sistema de identificação bioquímica VITEK 2 Compact, para identificação de isolados bacterianos das áreas de produção de Bio-Manguinhos.

#### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a Seção de Esterilidade, Processos e Insumos – SEPIN, do Laboratório de Controle de Microbiológico – LACOM.

#### 4- SIGLAS

DI	- Documento Interno
LACOM	- Laboratório de Controle de Microbiológico
mL	- mililitro
SEMEC	- Seção de Meio de Cultura
SEPIN	- Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
UO	- Unidade Organizacional

#### 5- REFERÊNCIAS

Manual VITEK 2 Compact  
Anotações realizadas durante o treinamento sobre o Sistema VITEK 2 Compact (Maio/2012)

#### 6- DEFINIÇÕES

Não aplicável.

#### 7- PRÉ-REQUISITOS

##### 7.1- Material

- Luva descartável
- Alça bacteriológica de níquel cromo, de platina ou descartável
- Cartões de identificação VITEK 2 Compact BCL
- Cartões de identificação VITEK 2 Compact GP
- Cartões de identificação VITEK 2 Compact GN
- Tubos plásticos de acrílico específicos do sistema VITEK 2 Compact
- Swabs estéreis
- Álcool a 70% estéril
- Toalhinha estéril tipo Wiper
- Sacos para descarte de material biológico
- Estantes para cartões
- Dispensette

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
14 / 04 / 2015	27 / 04 / 2018	01	01/05

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 7.2- Soluções e reagentes

- Solução salina a 0,45% estéril
- Soluções de calibração do *DensiChek*

### 7.3- Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica
- Incinerador bacteriológico
- *DensiChek*
- *VITEK 2 Compact*

### 7.4- Amostras a serem identificadas

- Somente poderão ser submetidas a este procedimento as amostras caracterizadas previamente pela coloração de Gram e pelo teste de KOH a 3%, em acordo com as DI 4990 e DI 4989, respectivamente

### 7.5- Documentos internos

- DI 4990 - Coloração de *Gram*
- DI 4989 - Técnica do KOH para Diferenciação entre Bactérias Gram Negativo e Gram Positivo

## 8- PROCEDIMENTOS

### 8.1- Preparo da amostra

Separar o número de tubos de acrílico de acordo com o número de amostras a serem submetidas a identificação pelo sistema *VITEK 2 Compact* e colocar na posição desejada no cassete de cartões.

Elaborar uma lista com a posição das amostras em cada cassete, discriminando o número da cassete e o tipo de classificação segundo o Gram.

Distribuir, no interior de uma cabine de segurança biológica e com o auxílio do Dispensette, três mL de solução salina a 0,85% estéril em cada tubo.

Realizar o preparo da suspensão bacteriana a ser testada, com o auxílio de um *swab* estéril ou de uma alça bacteriológica. Verificar a faixa de turvação desejada, de acordo com o resultado do Gram (quadro 1).

Quadro 1

Resultado do Gram	Faixa de turvação
Bastonete Gram positivo produtor de esporo	1,8 a 2,20
Bastonete ou Coco Gram positivo não produtor de esporo	0,5 a 0,63
Bastonete ou Coco Gram negativo	0,5 a 0,63

De acordo com a ordem da lista das amostras, colocar o cartão correspondente na posição de cada tubo de acrílico com a suspensão preparada, conforme o quadro 2. O capilar acoplado ao cartão deverá ser introduzido no tubo de acrílico correspondente.

Quadro 2

Resultado do Gram	Tipo de cartão <i>VITEK</i>
Bastonete Gram positivo produtor de esporo	BCL
Bastonete ou Coco Gram positivo não produtor de esporo	GP
Bastonete ou Coco Gram negativo	GN

UO Elaboradora SEPIN	Numero 7672	Revisão 01	Página 02/05
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 8.2- Introdução do cassete na câmara de vácuo

Levar o cassete até o *VITEK 2 Compact*. Observar na tela do aparelho se a opção "OK" aparece no *status*. Em caso afirmativo, abrir a porta da Câmara de Vácuo e introduzir um cassete. Caso não esteja, verificar se há um ícone de ponto de exclamação no canto da tela, indicando um problema (ver Item 8.8).

Fechar a porta da Câmara de Vácuo (posicionada na parte superior à esquerda) e selecionar a opção "Iniciar Enchimento" na tela do aparelho.

Aguardar o término do procedimento, onde poderá ser visualizada o *status* "Concluído" na tela. A partir deste momento, aparecerá um ícone de relógio, indicando o próximo procedimento deverá ser realizado em menos de dez minutos. Esta é uma etapa crítica do processo: caso não seja realizada dentro deste prazo, o cassete (com todas as amostras) deverá ser desprezado e todo o processo, reinicializado.

### 8.3- Introdução do cassete na câmara de carregamento

Abrir a porta da Câmara de vácuo, retirar o cassete e fechar a porta. Realizar a transferência do cassete para a Câmara de Carregamento (posicionada na parte inferior à direita).

Abrir a porta da Câmara de Carregamento e introduzir o cassete. Fechar a porta. Imediatamente, o aparelho fará a leitura dos códigos de barra, selagem dos cartões e introdução destes no carrossel de leitura.

Aguardar o término do procedimento, que será indicado pelo comando "Remove" na tela do aparelho. Abrir a porta da Câmara de Vácuo e retirar o cassete. Desprezar os tubos de acrílicos utilizados e os capilares em saco específico para descarte de material biológico.

### 8.4- Introdução dos dados das amostras no software do sistema VITEK 2

Na tela do computador do Sistema *VITEK 2*, dar um duplo clique no ícone "*VITEK 2 SYSTEM*"

Uma tela de "*login*" será aberta. Introduzir "ID do utilizador" (usuário) e "palavra passe" (senha).

A tela do *VITEK 2* será aberta. Dar um duplo clique no ícone Cassete e procurar, entre as pastas apresentadas, o cassete que foi introduzido e ainda não foi identificado (estará em vermelho). No caso de terem sido introduzidos vários cassetes, procurar pelo número e pelo horário.

Selecionar o cassete desejado. Aparecerá um quadro representando as dez posições do cassete, onde pode-se observar em cada posição o tipo de cartão utilizado e o seu respectivo código de barras.

Clicar em cima da posição onde deseja-se inserir os dados (ficará azul escuro). Clicar no ícone Bloco com Lápis e digitar o número da amostra. Clicar OK ao final.

Repetir o passo anterior para todas as amostras. Após o preenchimento de todas as posições, clicar no ícone Disquete para salvar os dados.

### 8.5- Aquisição dos resultados

Na tela do *VITEK 2*, clicar no ícone Gerir Informações dos Resultados (Planilha). Irá abrir uma nova tela.

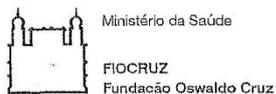
Selecionar a opção DATA DO TESTE no campo "ver por".

No campo "Filtrar por", selecionar a opção MOSTRAR TUDO.

Ir para a pasta do dia correspondente e verificar a necessidade de revisão ou de reanálise. Observa o status de cada amostra e verificar a cor do quadrado relacionado. Se estiver verde, a análise está concluída. Se estiver amarelo/vermelho, reavaliar o resultado (*Slashline/Low Discrimination*) e refazer a análise.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 7672	Revisão 01	Página 03/05
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## APÊNDICE C – Instrução de Trabalho (IT) n° 7673 “Uso do aparelho para coloração de Gram SLIDEINK HEMOGRAM”



### INSTRUÇÃO DE TRABALHO

TÍTULO: USO DO APARELHO PARA COLORAÇÃO DE GRAM SLIDEINK HEMOGRAM

UNIDADE ELABORADORA:  
SEPIN

NÚMERO: 7673

#### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.
01	Item: 12.

#### 2- OBJETIVOS

Descrever a metodologia a ser seguida para utilização do equipamento de coloração de Gram *SlideInk HemoGram*.

#### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a Seção de Esterilidade, Processos e Insumos - SEPIN.

#### 4- SIGLAS

DI	- Documento Interno
LACOM	- Laboratório de Controle de Microbiológico
SEPIN	- Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
UO	- Unidade Organizacional

#### 5- REFERÊNCIAS

DI 4990 - Coloração de Gram  
Manual corador automático de lâminas *SlideInk HemoGram*  
FRIEDLY, G. *Importance of bacterial stains in the diagnosis of infectious disease. J Med Technol* 1:823-833, 1985.  
KONEMAN, E.W. Et al. *Diagnóstico Microbiológico – texto e atlas colorido – 5ª. Edição – MEDSI Editora médica e científica, 2001*

#### 6- DEFINIÇÕES

Não aplicável.

#### 7- PRÉ-REQUISITOS

##### 7.1- Material e equipamentos

- Luva descartável
- Pinça anatômica (com ranhuras)
- Toalhinha descartável estéril própria para uso em sala limpa
- Frascos contendo álcool 70% estéril
- Lâminas de vidro tamanho 25 x 75 x 1mm, em frasco com álcool
- Bico de Bunsen
- Alça bacteriológica
- Lápis dermatográfico
- Recipiente para descarte de perfuro-cortante
- Óleo de imersão
- Cultura fresca (menos de 24 horas) e pura do micro-organismo a ser identificado em placa de ágar nutriente ou outro meio de enriquecimento
- Acendedor elétrico ou fósforo
- Pipetas graduadas (1 mL) ou conta-gotas

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
17/04/2015	17/04/2018	01	01/04

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

- Pêra ou pipetador automático
- Seringa descartável estéril (3 ou 5 mL)
- Bombona para descarte de resíduo químico
- Microscópio óptico
- Corador de lâminas *SlideInk HemoGram*

### 7.2- Meios de cultura e soluções

- Solução salina a 0,85%
- *Kit* de coloração para uso em corador automático Colorgram Microbiologia *SlideInk*
- Solução de Álcool 70%

### 7.3- Documento interno

- DI 4990 - Coloração de Gram

## 8- PROCEDIMENTOS

### 8.1- Preparo dos esfregaços em lâminas

Limpar a bancada com toalhina embebida em álcool a 70% e descartá-la. Acender, em seguida o bico de Bunsen.

Com o auxílio de uma pinça anatômica, retirar uma lâmina de vidro do frasco e secá-la (utilizar a chama do bico de Bunsen ou uma toalhina).

Identificar a lâmina com o número da amostra, utilizando um lápis dermatográfico.

Se a cultura estiver em meio sólido (ágar), retirar um pequeno volume de solução salina (aproximadamente 0,1 mL) com o uso de seringa estéril e dispor uma gota sobre a lâmina. Com uma alça bacteriológica previamente flambada e resfriada, retirar uma pequena quantidade da cultura em ágar e misturá-la com a gota sobre a lâmina, homogeneizando por alguns segundos.

Se a cultura estiver em caldo, com o auxílio de pipetador, retirar uma pequena quantidade e dispor uma ou duas gotas da cultura sobre a lâmina.

Deixar a lâmina com o esfregaço da cultura secar ao ar.

Quando o esfregaço estiver seco, fixar a lâmina com o calor, passando de quatro a seis vezes pela chama do bico de Bunsen.

### 8.2- Corador de lâminas *slideink hemogram*

Ligar o equipamento, pressionar o botão "Pulso" para ativar a máquina e preencher as mangueiras com os reagentes, preparando-o para utilização. Utilizar uma toalhina embebida em álcool a 70% para limpeza dos reagentes sobre a mesa de coloração, sempre no sentido da direita para esquerda para não danificar os sensores.

Posicionar as lâminas com a face voltada para o lado esquerdo do operador na espiral de locomoção do equipamento.

A mesa de coloração irá controlar o tempo e a saída dos reagentes em cada etapa do processo.

Após a passagem das lâminas pela mesa de coloração, essas serão armazenadas no canto inferior esquerdo, o depósito com capacidade de até 100 lâminas.

Utilizar uma toalhina embebida em álcool a 70% para limpeza dos resíduos de reagentes sobre a mesa de coloração e suas ranhuras, no sentido da direita para esquerda para não danificar os sensores.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 7673	Revisão 01	Página 02/04
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

Retirar o tanque de escoamento localizado na parte frontal, abaixo da mesa, para descarte do excedente de reagente utilizado no processo em bombonas de descarte de resíduos químicos.

### 8.3- Observação das lâminas ao microscópio óptico

Seguir instruções conforme DI 4990.

### 8.4- Interpretação dos resultados

Seguir instruções conforme DI 4990.

### 8.5- Substituição do *kit* colorgram microbiologia *Slidelnk*

O equipamento possui um sensor que indica a necessidade de troca do *kit* Colorgram Microbiologia. A luz de nível localizada acima da tecla Pulso irá acender quando for necessária a substituição.

Desligar o equipamento. Remover as tampas com as cinco cânulas e o *kit* Colorgram Microbiologia que está vazio. Colocar o novo *kit*, observando a posição dos recipientes na ordem apropriada, inserindo as tampas com as cânulas em cada reagente.

### 8.6- Procedimento de limpeza do equipamento *Slidelnk HemoGram*

Remover as cânulas dos reagentes e deixá-las em álcool a 70%. Pressionar a tecla "Pulso" para que o álcool seja bombeado através das cânulas e mangueiras e a limpeza seja realizada.

## 9- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS

SEPIN.

### 9.1- UO incluídas nesta revisão

Não aplicável.

### 9.2- UO excluídas nesta revisão

Não aplicável.

## 10- TREINAMENTO

Teórico e Prático.

### 10.1- Multiplicadores

Elaboradores, verificador, aprovador e todos os treinados na revisão vigente deste DI e DI 1083 – Treinamento para Qualificação em Serviço.

## 11- ANEXOS

Não aplicável.

### / FOLHA DE APROVAÇÃO

UO Elaboradora	Numero	Revisão	Página
SEPIN	7673	01	03/04



Ministério da Saúde  
 FIOCRUZ  
 Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
 em Imunobiológicos  
 Bio-Manguinhos

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

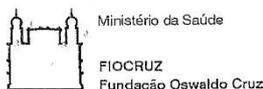
### 12- FOLHA DE APROVAÇÃO

	NOME	ASSINATURA
ELABORADO	Luciane Martins Medeiros	<u>Luciane Martins Medeiros</u>
ELABORADO	Lygia Maria Paulo da Silva Braga	<u>Lygia Maria Paulo da Silva Braga</u>
VERIFICADO	Fernanda Ventura Cruz	<u>Fernanda Ventura Cruz</u>
CONFERIDO	Marcus Vinicius dos Santos Pinto	<u>Marcus Vinicius dos Santos Pinto</u>
APROVADO	Simone Cascardo Frota	<u>Simone Cascardo Frota</u>

CÓPIA NÃO CONTROLADA

UO Elaboradora SEPIN	Numero 7673	Revisão 01	Página 04/04
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## APÊNDICE D – Instrução de Trabalho (IT) n° 7672 “Identificação de isolados bacterianos a partir do sistema VITEK 2 Compact”



### INSTRUÇÃO DE TRABALHO

**TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS A PARTIR DO SISTEMA VITEK 2 COMPACT**

**UO ELABORADORA:  
SEPIN**

**NÚMERO: 7672**

#### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.
01	Item: 12.

#### 2- OBJETIVOS

Descrever a metodologia para o preparo de amostras a serem submetidas ao sistema de identificação bioquímica *VITEK 2 Compact*, para identificação de isolados bacterianos das áreas de produção de Bio-Manguinhos.

#### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a Seção de Esterilidade, Processos e Insumos – SEPIN, do Laboratório de Controle de Microbiológico – LACOM.

#### 4- SIGLAS

DI	- Documento Interno
LACOM	- Laboratório de Controle de Microbiológico
mL	- mililitro
SEMEC	- Seção de Meio de Cultura
SEPIN	- Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
UO	- Unidade Organizacional

#### 5- REFERÊNCIAS

Manual *VITEK 2 Compact*  
Anotações realizadas durante o treinamento sobre o Sistema *VITEK 2 Compact* (Maio/2012)

#### 6- DEFINIÇÕES

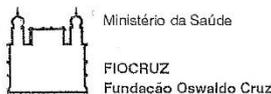
Não aplicável.

#### 7- PRÉ-REQUISITOS

##### 7.1- Material

- Luva descartável
- Alça bacteriológica de níquel cromo, de platina ou descartável
- Cartões de identificação *VITEK 2 Compact* BCL
- Cartões de identificação *VITEK 2 Compact* GP
- Cartões de identificação *VITEK 2 Compact* GN
- Tubos plásticos de acrílico específicos do sistema *VITEK 2 Compact*
- Swabs estéreis
- Álcool a 70% estéril
- Toalhinha estéril tipo *Wiper*
- Sacos para descarte de material biológico
- Estantes para cartões
- Dispensette

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
14 / 04 / 2015	17 / 04 / 2018	01	01/05



## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 7.2- Soluções e reagentes

- Solução salina a 0,45% estéril
- Soluções de calibração do *DensiChek*

### 7.3- Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica
- Incinerador bacteriológico
- *DensiChek*
- *VITEK 2 Compact*

### 7.4- Amostras a serem identificadas

- Somente poderão ser submetidas a este procedimento as amostras caracterizadas previamente pela coloração de Gram e pelo teste de KOH a 3%, em acordo com as DI 4990 e DI 4989, respectivamente

### 7.5- Documentos internos

- DI 4990 - Coloração de *Gram*
- DI 4989 - Técnica do KOH para Diferenciação entre Bactérias Gram Negativo e Gram Positivo

## 8- PROCEDIMENTOS

### 8.1- Preparo da amostra

Separar o número de tubos de acrílico de acordo com o número de amostras a serem submetidas a identificação pelo sistema *VITEK 2 Compact* e colocar na posição desejada no cassete de cartões.

Elaborar uma lista com a posição das amostras em cada cassete, discriminando o número da cassete e o tipo de classificação segundo o Gram.

Distribuir, no interior de uma cabine de segurança biológica e com o auxílio do Dispensette, três mL de solução salina a 0,85% estéril em cada tubo.

Realizar o preparo da suspensão bacteriana a ser testada, com o auxílio de um swab estéril ou de uma alça bacteriológica. Verificar a faixa de turvação desejada, de acordo com o resultado do Gram (quadro 1).

Quadro 1

Resultado do Gram	Faixa de turvação
Bastonete Gram positivo produtor de esporo	1,8 a 2,20
Bastonete ou Coco Gram positivo não produtor de esporo	0,5 a 0,63
Bastonete ou Coco Gram negativo	0,5 a 0,63

De acordo com a ordem da lista das amostras, colocar o cartão correspondente na posição de cada tubo de acrílico com a suspensão preparada, conforme o quadro 2. O capilar acoplado ao cartão deverá ser introduzido no tubo de acrílico correspondente.

Quadro 2

Resultado do Gram	Tipo de cartão <i>VITEK</i>
Bastonete Gram positivo produtor de esporo	BCL
Bastonete ou Coco Gram positivo não produtor de esporo	GP
Bastonete ou Coco Gram negativo	GN

UO Elaboradora SEPIN	Numero 7672	Revisão 01	Página 02/05
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 8.2- Introdução do cassete na câmara de vácuo

Levar o cassete até o *VITEK 2 Compact*. Observar na tela do aparelho se a opção "OK" aparece no *status*. Em caso afirmativo, abrir a porta da Câmara de Vácuo e introduzir um cassete. Caso não esteja, verificar se há um ícone de ponto de exclamação no canto da tela, indicando um problema (ver Item 8.8).

Fechar a porta da Câmara de Vácuo (posicionada na parte superior à esquerda) e selecionar a opção "Iniciar Enchimento" na tela do aparelho.

Aguardar o término do procedimento, onde poderá ser visualizada o *status* "Concluído" na tela. A partir deste momento, aparecerá um ícone de relógio, indicando o próximo procedimento deverá ser realizado em menos de dez minutos. Esta é uma etapa crítica do processo: caso não seja realizada dentro deste prazo, o cassete (com todas as amostras) deverá ser desprezado e todo o processo, reinicializado.

### 8.3- Introdução do cassete na câmara de carregamento

Abrir a porta da Câmara de vácuo, retirar o cassete e fechar a porta. Realizar a transferência do cassete para a Câmara de Carregamento (posicionada na parte inferior à direita).

Abrir a porta da Câmara de Carregamento e introduzir o cassete. Fechar a porta. Imediatamente, o aparelho fará a leitura dos códigos de barra, selagem dos cartões e introdução destes no carrossel de leitura.

Aguardar o término do procedimento, que será indicado pelo comando "Remove" na tela do aparelho. Abrir a porta da Câmara de Vácuo e retirar o cassete. Desprezar os tubos de acrílicos utilizados e os capilares em saco específico para descarte de material biológico.

### 8.4- Introdução dos dados das amostras no software do sistema VITEK 2

Na tela do computador do Sistema *VITEK 2*, dar um duplo clique no ícone "*VITEK 2 SYSTEM*"

Uma tela de "*login*" será aberta. Introduzir "ID do utilizador" (usuário) e "palavra passe" (senha).

A tela do *VITEK 2* será aberta. Dar um duplo clique no ícone Cassete e procurar, entre as pastas apresentadas, o cassete que foi introduzido e ainda não foi identificado (estará em vermelho). No caso de terem sido introduzidos vários cassetes, procurar pelo número e pelo horário.

Selecionar o cassete desejado. Aparecerá um quadro representando as dez posições do cassete, onde pode-se observar em cada posição o tipo de cartão utilizado e o seu respectivo código de barras.

Clicar em cima da posição onde deseja-se inserir os dados (ficará azul escuro). Clicar no ícone Bloco com Lápis e digitar o número da amostra. Clicar OK ao final.

Repetir o passo anterior para todas as amostras. Após o preenchimento de todas as posições, clicar no ícone Disquete para salvar os dados.

### 8.5- Aquisição dos resultados

Na tela do *VITEK 2*, clicar no ícone Gerir Informações dos Resultados (Planilha). Irá abrir uma nova tela.

Selecionar a opção DATA DO TESTE no campo "ver por".

No campo "Filtrar por", selecionar a opção MOSTRAR TUDO.

Ir para a pasta do dia correspondente e verificar a necessidade de revisão ou de reanálise. Observa o status de cada amostra e verificar a cor do quadrado relacionado. Se estiver verde, a análise está concluída. Se estiver amarelo/vermelho, reavaliar o resultado (*Slashline/Low Discrimination*) e refazer a análise.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 7672	Revisão 01	Página 03/05
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 8.6- Descarte dos cartões

Ao final de cada leitura, retirar a gaveta de descarte, retirar os cartões já lidos e despreza-los em sacos para descarte de material biológico.

### 8.7- Limpeza do sistema óptico do aparelho *VITEK 2 Compact*

Selecionar o primeiro comando do aparelho *VITEK 2* (segundo comando acima do ícone ponto de exclamação). Selecionar a opção MANUTENCAO.

Selecionar a opção LIMPEZA DO SISTEMA OPTICO. Surgirá uma pergunta: "Limpar o sistema óptico?". Selecionar a opção SIM.

Abrir a porta de acesso ao sistema (porta frontal), acessar o sistema óptico e limpá-lo com cuidado, através de um *wiper* limpo.

Colocar o sistema óptico de volta na posição correta e fechar a porta frontal. Irá aparecer uma mensagem; "Auto teste do sistema óptico: PASSOU". Clicar em OK.

Selecionar novamente o primeiro comando (o segundo acima do ícone ponto de exclamação).

### 8.8- Verificação e resolução de erros no aparelho *VITEK 2 Compact*

Apertar duas vezes o ícone ponto de exclamação.

Ler as mensagens, selecionando-as através dos ícones das setas. Caso necessite alguma intervenção, ligar para a Central de Atendimento Técnico (CAT) da Empresa *DiagPrime* e relatar o código do erro que aparece no visor. O telefone do CAT se encontra ao lado do aparelho *VITEK 2*.

## 9- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS

SEPIN.

### 9.1- UO incluídas nesta revisão

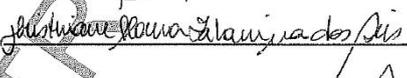
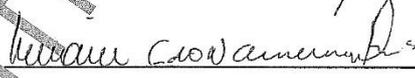
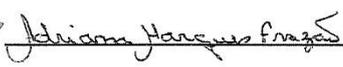
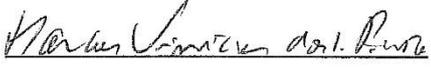
Não aplicável.

### 9.2- UO excluídas nesta revisão

Não aplicável.

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 12- FOLHA DE APROVAÇÃO

	NOME	ASSINATURA
ELABORADO	Luciane Martins Medeiros	
ELABORADO	Cristhiane Moura Falavina dos Reis	
ELABORADO	Luciane Gomes do Nascimento	
VERIFICADO	Adriana Marques Frazão	
CONFERIDO	Marcus Vinicius dos Santos Pinto	
APROVADO	Simone Cascardo Frota	

CÓPIA NÃO CONTROLADA

## APÊNDICE E – Protocolo e relatório de validação para o sistema VITEK 2 Compact



Ministério da Saúde  
**FlOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
 em Imunobiológicos  
**Bio-Manguinhos**

### PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

TÍTULO: VALIDAÇÃO DO TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ATRAVÉS DO SISTEMA VITEK 2 COMPACT

UNO ELABORADORA:  
 SEVAN

NÚMERO: 8398

#### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.

#### 2- OBJETIVOS

Definir diretrizes e critérios para realização da validação do método de identificação dos espécimes bacterianos pelo sistema VITEK 2 COMPACT (BioMerieux) de forma a demonstrar a correta execução do procedimento e que o mesmo conduza a resultados confiáveis e adequados à qualidade exigida pelas BPF e BPL.

#### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à Seção de Esterilidade, Processos e Insumos - SEPIN.

#### 4- SIGLAS

AS	- Agar sangue de carneiro
ATCC	- American Type Culture Collection
BCL	- Bastonetes Gram Positivo produtores de esporos
BPF	- Boas Práticas de fabricação
BPL	- Boas Práticas de Laboratório
DI	- Documento Interno
DIBOP	- Divisão de Boas Práticas
GN	- Bastonetes e Cocos Gram Negativo
GP	- Cocos e Bastonetes não esporulados Gram Positivo
LAMEV	- Laboratório de Metrologia e Validação
SEPIN	- Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
SEVAN	- Seção de Validação Analítica
TSA	- Agar Tripticase de Soja

#### 5- REFERÊNCIAS

ANVISA - RE 899, de 29 de maio de 2003

#### 6- DEFINIÇÕES

**ESPECIFICIDADE** - é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (RE 899, de 29 de maio de 2003 - ANVISA).

#### 7- RESPONSABILIDADES

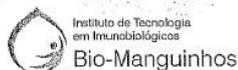
##### 7.1- Da SEVAN

Atender o cronograma acertado com o cliente.

Elaborar o protocolo e o relatório de validação em conjunto com a SEPIN.

Acômpañhar os testes de validação.

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
25/10/2014	25/10/2017	00	01/15



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

Assegurar que os dados foram cuidadosamente analisados, registrados em formulários aprovados, datados e assinados.

### 7.2- Da SEPIN

Elaborar o protocolo e o relatório de validação em conjunto com a SEVAN.

Assegurar que os dados de controle dos insumos utilizados foram cuidadosamente registrados em formulários aprovados, datados e assinados.

Providenciar pessoal devidamente treinado para a execução da validação.

Assegurar que os procedimentos sejam realizados corretamente segundo as DI específicas.

Assegurar que o material envolvido na validação do método seja identificado de modo que estas informações possam ser registradas no relatório de validação.

Providenciar o material necessário à validação do método.

Garantir que os equipamentos que participam da validação do método estejam calibrados e/ou qualificados.

Executar os experimentos de validação propriamente ditos.

### 7.3- Do LAMEV

Aprovar o protocolo e o relatório de validação.

### 7.4- Da DIBOP

Aprovar o protocolo de validação.

## 8- PRÉ-REQUISITOS

### 8.1- Documentos internos

- DI 0002 – Notificação e gerenciamento de desvios / não conformidades utilizando o sistema *Starnet Pharma* - usuário (Disponível para consulta *on line*)
- DI 0646 - Preparo e preservação de lote trabalho de cepa de micro-organismo
- DI 4990 - Coloração de Gram
- DI 7672 - Identificação de isolados bacterianos a partir do sistema *VITEK 2 COMPACT*

### 8.2 - Materiais e equipamentos

- Materiais e equipamentos relacionados aos DI 7672, DI 4990 e DI 0646
- Qualificação/calibração dos equipamentos críticos envolvidos no método
- No relatório deve conter todos os materiais, reagentes, instrumentos e equipamentos utilizados na validação, assim como suas devidas calibrações, prazos de validade e números de lotes

UO Elaboradora SEVAN	Numero 8398	Revisão 00	Página 02/15
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### 8.3- Classificação do método

#### Categoria: IV - Teste de especificidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetitividade	Sim	Sim	Não	Sim
		Intermediária	**	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\* se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

**Categoria I:** Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

**Categoria II:** Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.

**Categoria III:** Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).

**Categoria IV:** Testes de Identificação.

### 8.4- Reagentes

- Reagentes relacionados nos DI 7672, 0646 e 4990

### 8.5- Pessoal

- Pessoal devidamente treinado para a execução do procedimento

## 9- PROCEDIMENTO

### 9.1- Princípio do método

O Sistema VITEK 2 COMPACT consiste num conjunto de equipamentos, insumos e softwares que permite a identificação de bactérias e fungos leveduriformes a partir da utilização enzimática de determinados substratos (identificação bioquímica). Cada micro-organismo deverá ser caracterizado previamente através da técnica de Coloração de Gram (DI4990) e a partir deste resultado será escolhido o cartão de identificação apropriado a cada grupo.

### 9.2- Aspectos gerais

Os técnicos que irão participar da execução do presente protocolo de validação estão aptos nos DI específicos.

Todos os equipamentos utilizados nesta validação estão dentro do prazo de validade de calibração/qualificação.

O processo está de acordo com os DI específicos.

Serão utilizadas cepas bacterianas, de identificação reconhecida e assegurada, representantes dos grupos morfo tintoriais utilizados pelo sistema VITEK 2 COMPACT: Bastonetes e Cocos Gram Negativo (GN), Cocos e Bastonetes não esporulados Gram Positivo (GP) e Bastonetes Gram Positivo produtores de esporos (BCL).

UO Elaboradora	Numero	Revisão	Página
SEVAN	8398	00	03/15

## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

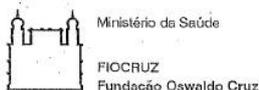
As cepas bacterianas a serem utilizadas como amostras neste protocolo de validação foram determinadas com base no Protocolo de validação desenvolvido pela BioMerieux e na incidência dos principais gêneros identificados a partir de produtos, insumos, monitoramento ambiental e de águas. São cepas de identificação conhecida, oriundas de Coleções de Micro-organismos de Referência e da Coleção de Cultivos Bacterianos de Bio-Manguinhos (cepas autóctones identificadas por sequenciamento de genes conservados).

Todas as cepas serão caracterizadas previamente pela técnica da Coloração de Gram para confirmação de aspectos morfo-tintoriais e em seguida submetidas ao Sistema VITEK 2 COMPACT. As cepas a serem utilizadas estão listadas no Quadro abaixo:

As cepas utilizadas deverão ser avaliadas quanto a Pureza (presença de somente uma espécie) e quanto a Viabilidade (crescimento da espécie em questão) do seu cultivo, conforme a DI 0646.

Cepa	Coleção	Espécie	Gram	Tipo de Cartão
B-1102	Bacterioteca Bio	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Coco Gram negativo	GN
B-1048	Bacterioteca Bio	<i>Bacillus megaterium</i>	Bastonete Gram positivo produtor de esporos	BCL
B-1403	Bacterioteca Bio	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Coco Gram positivo	GP
B-934	Bacterioteca Bio	<i>Micrococcus luteus</i>	Coco Gram positivo	GP
ATCC 61	ATCC	<i>Bacillus circulans</i>	Bastonete Gram positivo produtor de esporos	BCL
ATCC 51663	ATCC	<i>Brevibacillus agri</i>	Bastonete Gram positivo produtor de esporos	BCL
ATCC 64	ATCC	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Bastonete Gram positivo produtor de esporos	BCL
ATCC 8509	ATCC	<i>Paenibacillus macerans</i>	Bastonete Gram positivo produtor de esporos	BCL
ATCC 7070	ATCC	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Bastonete Gram positivo produtor de esporos	BCL
ATCC 14576	ATCC	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	Bastonete Gram positivo produtor de esporos	BCL
ATCC BAA-747	ATCC	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Coco Gram negativo	GN
ATCC 23355	ATCC	<i>Enterobacter cloacae</i>	Bastonete Gram negativo	GN
ATCC 700324	ATCC	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Bastonete Gram negativo	GN
ATCC BAA-749	ATCC	<i>Ochrobactrum anthropi</i>		GN
ATCC 6380	ATCC	<i>Proteus vulgaris</i>	Bastonete Gram negativo	GN
ATCC 25931	ATCC	<i>Shigella sonnei</i>	Bastonete Gram negativo	GN
ATCC 17666	ATCC	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bastonete Gram negativo	GN
ATCC 700327	ATCC	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Coco Gram positivo	GP
ATCC BAA-752	ATCC	<i>Kocuria kristinae</i>	Coco Gram positivo	GP
ATCC BAA-751	ATCC	<i>Listeria monocytogenes</i>	Coco Gram positivo	GP
ATCC 29213	ATCC	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>	Coco Gram positivo	GP
ATCC BAA-750	ATCC	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Coco Gram positivo	GP
ATCC 43079	ATCC	<i>Streptococcus equi ssp zooepidemicus</i>	Coco Gram positivo	GP

Somente serão consideradas aptas ao ensaio as cepas que apresentarem pureza e viabilidade de cultivo nos dois meios testados (TSA e AS), assim como as características morfo-tintoriais esperadas para cada espécie analisada pela coloração de Gram.



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### 9.3- Desenho experimental

#### 9.3.1- Controles negativo do teste

Os controles negativos do ensaio serão os insumos utilizados no ensaio. Cada tipo de cartão de identificação (GN, GP e BCL) terá uma unidade inoculada com a solução salina "Air Life 0,45% Sodium Chloride – Inhalation Solution (CareFusion)", utilizada no preparo das suspensões bacterianas; que será introduzido como amostra no Sistema.

Será retirada uma alíquota da solução salina (1 mL), que deverá ser inoculada em um tubo contendo 10 mL de caldo caseína de lote previamente aprovado, incubado em estufa bacteriológica a 30-35°C por 48h, para verificar esterilidade da solução utilizada no ensaio.

Um dos swabbs estéreis, necessários ao preparo da suspensão bacteriana, será inoculado em um tubo contendo 10 mL de caldo caseína de lote previamente aprovado, incubado em estufa bacteriológica a 30-35°C por 48h, para verificar esterilidade do "swabb" utilizado no ensaio.

#### 9.3.2- Controle positivo do teste

O controle positivo do teste serão as próprias amostras, uma vez que são cepas bacterianas conhecidas, oriundas de Coleções de cultivos e previamente identificadas por métodos bioquímicos e outros, sendo aptas a identificação por este tipo de metodologia.

Cada cepa será semeada simultaneamente em uma placa de Agar sangue de carneiro a 5% (AS) e em duas placas de Agar Tripticase de Soja (TSA), de lotes de meio de cultivo previamente aprovados. Todas as placas serão incubadas em estufa bacteriológica a 30-35°C. A cultura semeada em placa de AS será utilizada para avaliação de viabilidade, pureza e de caracterização morfo-tintorial pela coloração de Gram, que deverão ser avaliadas em 24 e 48 horas após a semeadura em placa. Os resultados destas avaliações indicarão se a cepa em questão estará apta ou não a participar do ensaio. Uma das duas placas de TSA incubadas será utilizada para o teste com 24 horas e a outra placa será utilizada para o teste com 48 horas de incubação.

#### 9.3.3- Teste de especificidade

Os testes para cada tipo de cartão do sistema VITEK 2 COMPACT serão realizados em períodos distintos, sendo uma semana de duração para cada um; na primeira semana, serão preparadas e avaliadas as cepas para GN e o ensaio para este tipo de cartão será realizado nesta semana; na segunda semana, será realizado o teste para cartão GP, sendo o preparo das cepas necessárias também nesta semana; e o teste para cartões BCL será realizado na terceira semana, assim como o preparo das cepas relacionadas a este teste.

Após a finalização da parte prática (ensaios para cada grupo de cartão), será confeccionado um relatório final da validação.

##### 9.3.3.1- Realização do teste em cartões GN

Para a validação dos cartões GN, serão utilizadas as seguintes cepas bacterianas: B-1102, ATCC BAA-747, ATCC 700324, ATCC BAA-749, ATCC 6380, ATCC 25931, ATCC 17666, ATCC 23355.

A partir de cada cultivo em placa de TSA, serão realizadas suspensões com a solução Air Life 0,45% Sodium Chloride – Inhalation Solution (CareFusion), na turvação na faixa indicada para o cartão GN (0,5 a 0,63), em triplicata. A turvação deverá ser verificada através do aparelho DensiCheck. Este procedimento será realizado com 24 horas e com 48 horas de cultivo. No total, serão preparadas seis suspensões por cepa (três a partir do cultivo em 24h e três a partir do cultivo em 48h). Cada suspensão será associada a um cartão GN e deverá ser registrada como amostra individual no Sistema VITEK 2 COMPACT.

Proceder o preparo da amostra e introdução no aparelho segundo instruções descritas na DI 7672.

UO Elaboradora SEVAN	Numero 8398	Revisão 00	Página 05/15
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### 9.3.3.2- Realização do teste em cartões GP

Para a validação dos cartões GP, serão utilizadas as seguintes cepas bacterianas: B-1403, B-934, ATCC 700327, ATCC BAA-752, ATCC BAA-751, ATCC 29213, ATCC BAA-750, ATCC 43079.

A partir de cada cultivo em placa de TSA, serão realizadas suspensões com a solução *Air Life 0,45% Sodium Chloride – Inhalation Solution (CareFusion)*, na turvação na faixa indicada para o cartão GP (0,5 a 0,63), em triplicata. A turvação deverá ser verificada através do aparelho *DensiCheck*. Este procedimento será realizado com 24 horas e com 48 horas de cultivo. No total, serão preparadas seis suspensões por cepa (três a partir do cultivo em 24h e três a partir do cultivo em 48h). Cada suspensão será associada a um cartão GP e deverá ser registrada como amostra individual no Sistema *VITEK 2 COMPACT*.

Proceder o preparo da amostra e introdução no aparelho segundo instruções descritas na DI 7672.

### 9.3.3.3- Realização do teste em cartões BCL

Para a validação dos cartões BCL, serão utilizadas as seguintes cepas bacterianas: B-1048, ATCC-51663, ATCC-64, ATCC-8509, ATCC-7070, ATCC-14576, ATCC 61.

A partir de cada cultivo em placa de TSA, serão realizadas suspensões com a solução *Air Life 0,45% Sodium Chloride – Inhalation Solution (CareFusion)*, na turvação na faixa indicada para o cartão BCL (1,8 a 2,2), em triplicata. A turvação deverá ser verificada através do aparelho *DensiCheck*. Este procedimento será realizado com 24 horas e com 48 horas de cultivo. No total, serão preparadas seis suspensões por cepa (três a partir do cultivo em 24h e três a partir do cultivo em 48h). Cada suspensão será associada a um cartão GP e deverá ser registrada como amostra individual no Sistema *VITEK 2 COMPACT*.

Proceder o preparo da amostra e introdução no aparelho segundo instruções descritas na DI 7672.

### 9.4- Critério de aceitação

Será demonstrado que o método é adequado para determinar a identificação dos espécimes bacterianos testados, conforme os seguintes parâmetros:

Quadro 1: Parâmetros de Aceitação

Cartão	Cepa	Critério de Aceitação	
		Coleção/	Espécie
GN	B-1102	Bacterioteca Bio	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>
	ATCC BAA-747	ATCC	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	ATCC 23355	ATCC	<i>Enterobacter cloacae</i>
	ATCC 700324	ATCC	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	ATCC BAA-749	ATCC	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
	ATCC 6380	ATCC	<i>Proteus vulgaris</i>
	ATCC 25931	ATCC	<i>Shigella sonnei</i>
	ATCC 17666	ATCC	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
GP	B-1403	Bacterioteca Bio	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	B-934	Bacterioteca Bio	<i>Micrococcus lutes</i>
	ATCC 700327	ATCC	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
	ATCC BAA-752	ATCC	<i>Kocuria kristinae</i>
	ATCC BAA-751	ATCC	<i>Listeria monocytogenes</i>
	ATCC 29213	ATCC	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>
	ATCC BAA-750	ATCC	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	ATCC 43079	ATCC	<i>Streptococcus equi ssp zoepidemicus</i>

UO Elaboradora	Numero	Revisão	Página
SEVAN	8398	00	06/15

## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

Cartão BLC	Cepa	Critério de Aceitação Coleção/ Espécie	
	B-1048	Bacterioteca Bio	<i>Bacillus megaterium</i>
ATCC 61	ATCC	<i>Bacillus circulans</i>	
ATCC 51663	ATCC	<i>Brevibacillus agri</i>	
ATCC 64	ATCC	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	
ATCC 8509	ATCC	<i>Paenibacillus macerans</i>	
ATCC 7070	ATCC	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	
ATCC 14576	ATCC	<i>Virgibacillus pantothenticus</i>	

Insumo/Teste	Critério de Aceitação		
	Teste GN	Teste GP	Teste BCL
Solução Salina	Ausência de	Ausência de	Ausência de
Cartão sem inóculo	crescimento no meio	crescimento no meio	crescimento no meio
Swabb	de cultura	de cultura	de cultura

Cada um dos desvios observados durante a validação deverá ser tratado conforme o DI 0002 e investigados em relação à causa raiz e impacto no processo/produto. A conclusão do relatório de validação só se dará após a abertura do relatório de não-conformidade correspondente e a validação só poderá ser considerada conforme após a identificação da causa e a conclusão de que esta não representa risco ao processo/produto.

### 10- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUIDAS

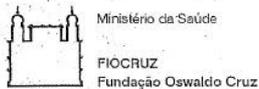
SEPIN, SEVAN.

### 11- ANEXOS

A - Relatório de validação

### ANEXO A

UO Elaboradora	Numero	Revisão	Página
SEVAN	8398	00	07/15



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### ANEXO A

#### Relatório de validação

RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO ANALÍTICA			
UO	Data	Nome	Assinatura
		Realizado por:	
		Verificado por:	
		Aprovado por:	

<b>A. Identificação</b>	
TAG:	UO:

<b>B. Histórico</b>	
Validado desde:	
Última Validação:	Relatório n.º:
Atual Validação – Início:	Relatório n.º:
Atual Validação – Final:	
Próxima Validação:	
Categoria do Método:	

<b>C. Alterações</b>		
Item	Alteração	Data

/Continuação

UO Elaboradora SEVAN	Numero 8398	Revisão 00	Página 08/15
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### ANEXO A /Continuação

TÍTULO: VALIDAÇÃO DO TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTERIAS ATRAVÉS DO SISTEMA VITEK 2 COMPACT	PÁGINAS: 2/7
REVISÃO: 00	

#### SUMÁRIO

CONTEÚDO	PÁGINA
1-DESCRIÇÃO DA VALIDAÇÃO.....	3
2-CONCLUSÃO.....	3
2.1-Resumo dos resultados.....	3
2.2-Comentários.....	3
2.3-Resultado final.....	3
3-RELATÓRIO DE DESVIOS.....	4
3.1-Desvios observados.....	4
3.2- Impacto no método.....	4
3.3-Justificativa de aceitação.....	4
4-RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	5
4.1- Documentação técnica.....	5
4.2-Analistas.....	5
4.3-Equipamentos e/ou instrumentos.....	5
4.4-Reagentes.....	5
5- RESULTADOS.....	6
5.1-Especificidade.....	6
6-ANEXOS.....	7

/Continuação

UO Elaboradora SEVAN	Numero 8398	Revisão 00	Página 09/15
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### ANEXO A /Continuação

TÍTULO: VALIDAÇÃO DO TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTERIAS ATRAVÉS DO SISTEMA VITEK 2  
COMPACT  
REVISÃO: 00 PÁGINAS: 3/7

#### 1- DESCRIÇÃO DA VALIDAÇÃO

\_\_\_\_\_

#### 2- CONCLUSÃO

##### 2.1- Resumo dos resultados

##### 2.1.1- Controles Negativos

Insumo/Teste	Teste GN	Teste GP	Teste BCL	Critério de Aceitação
Solução Salina				Ausência de crescimento no meio de cultura
Cartão sem inóculo				Ausência de crescimento no meio de cultura
Swabb				Ausência de crescimento no meio de cultura

##### 2.2.2- Especificidade

Cartão GN	Cepa	Tempo 24H	Tempo 48H	Critério de Aceitação	
				Bacterioteca Bio	Coleção/ Espécie
	B-1102			Bacterioteca Bio	<i>Acinetobacter lwoffi</i>
	ATCC BAA-747			ATCC	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	ATCC 23356			ATCC	<i>Enterobacter cloacae</i>
	ATCC 700324			ATCC	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	ATCC BAA-749			ATCC	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
	ATCC 6390			ATCC	<i>Proteus vulgaris</i>
	ATCC 25931			ATCC	<i>Shigella sonnei</i>
	ATCC 17666			ATCC	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Cartão GP	Cepa	Tempo 24H	Tempo 48H	Critério de Aceitação	
				Bacterioteca Bio	Coleção/ Espécie
	B-1403			Bacterioteca Bio	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	B-634			Bacterioteca Bio	<i>Mitrococcus luteus</i>
	ATCC 700327			ATCC	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
	ATCC BAA-752			ATCC	<i>Kocuria kristinae</i>
	ATCC BAA-751			ATCC	<i>Listeria monocytogenes</i>
	ATCC 28213			ATCC	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>
	ATCC BAA-750			ATCC	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	ATCC 43079			ATCC	<i>Streptococcus equi ssp zooepidemicus</i>

Cartão BLC	Cepa	Tempo 24H	Tempo 48H	Critério de Aceitação	
				Bacterioteca Bio	Coleção/ Espécie
	B-1049			Bacterioteca Bio	<i>Bacillus megaterium</i>
	ATCC 61			ATCC	<i>Bacillus circulans</i>
	ATCC 61963			ATCC	<i>Brevibacillus agri</i>
	ATCC 64			ATCC	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
	ATCC 8509			ATCC	<i>Paenibacillus maosraris</i>
	ATCC 7070			ATCC	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	ATCC 14578			ATCC	<i>Virgibacillus parviflavus</i>

#### 2.2- Comentários

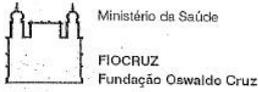
\_\_\_\_\_

#### 2.3- Resultado final

Conforme  Não conforme  
Elaborado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_  
Revisado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_

/Continuação

UO Elaboradora	Numero	Revisão	Página
SEVAN	8398	00	10/15



**PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO**

ANEXO A  
/Continuação

TÍTULO: VALIDAÇÃO DO TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTERIAS ATRAVÉS DO SISTEMA VITEK 2 COMPACT
REVISÃO: 00 <span style="float: right;">PÁGINAS: 4/7</span>

**3 -RELATÓRIO DE DESVIOS**

**3.1-Desvios observados**


**3.2-impacto no método**


**3.3- Justificativa de aceitação**


Elaborado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_  
 Revisado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_

CÓPIA NÃO CONTROLADA

/Continuação

UO Elaboradora SEVAN	Número 8308	Revisão 00	Página 4445
-------------------------	----------------	---------------	----------------



Ministério da Saúde  
 FIOCRUZ  
 Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
 em Imunobiológicos  
 Bio-Manguinhos

## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### ANEXO A /Continuação

TÍTULO: VALIDAÇÃO DO TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ATRAVÉS DO SISTEMA VITEK 2  
 COMPACT

REVISÃO: 00

PÁGINAS: 5/7

#### 4 – RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 4.1 – Documentação técnica

Descrição	Identificação	Local de Arquivo	Status

##### 4.2 – Analistas

Nº	Nome	Local
1		
2		

##### 4.3 – Equipamentos e/ou instrumentos

Nome	Patrimônio/TAG/Série	Fabricante/Modelo	Local	Data de Qualificação/ Calibração/ Nº do Certificado

##### 4.4 – Reagentes

Reagentes	Marca/Lote	Data de fabricação/ liberação	Validade

Elaborado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_

Revisado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_

/Continuação

UO Elaboradora  
SEVAN

Numero  
8398

Revisão  
00

Página  
12/15



Ministério da Saúde  
 FIOCRUZ  
 Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
 em Imunobiológicos  
 Bio-Manguinhos

## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### ANEXO A /Continuação

TÍTULO: VALIDAÇÃO DO TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTERIAS ATRAVÉS DO SISTEMA VITEK 2 COMPACT	PÁGINAS: 6/7
REVISÃO: 00	

#### 5-RESULTADOS

##### 5.1- Especificidade

##### 5.1.1-Controles Negativos

Insumo/Teste	Teste GN	Teste GP	Teste BCL
Solução Salina			
Cartão sem inóculo			
Swab			

##### 5.1.2- Resultados das cepas para o cartão GN com cultivos de 24 horas

Cepa	Cartão 1	Cartão 2	Cartão 3
B-1102			
ATCC BAA-747			
ATCC 23385			
ATCC 706324			
ATCC BAA-749			
ATCC 8380			
ATCC 25931			
ATCC 17866			

##### 5.1.3- Resultados das cepas para o cartão GP com cultivos de 24 horas

Cepa	Cartão 1	Cartão 2	Cartão 3
B-1403			
B-934			
ATCC 700327			
ATCC BAA-752			
ATCC BAA-751			
ATCC 29213			
ATCC BAA-750			
ATCC 43079			

##### 5.1.4- Resultados das cepas para o cartão BCL com cultivos de 24 horas

Cepa	Cartão 1	Cartão 2	Cartão 3
B-1048			
ATCC 81			
ATCC 51663			
ATCC 84			
ATCC 8509			
ATCC 7670			
ATCC 14576			

Elaborado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_

Revisado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_

/Continuação

UO Elaboradora SEVAN	Numero 8398	Revisão 00	Página 13/15
-------------------------	----------------	---------------	-----------------



Ministério da Saúde  
 FIOCRUZ  
 Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
 em Imunobiológicos  
 Bio-Manguinhos

## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### ANEXO A /Continuação

TÍTULO: VALIDAÇÃO DO TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTERIAS ATRAVÉS DO SISTEMA VITEK 2  
 COMPACT  
 REVISÃO: 00

PÁGINAS: 7/7

#### 5.1.5- Resultados das cepas para o cartão GN com cultivos de 48 horas

Cepa	Cartão 1	Cartão 2	Cartão 3
B-1102			
ATCC BAA-747			
ATCC 23355			
ATCC 700524			
ATCC BAA-749			
ATCC 8360			
ATCC 25931			
ATCC 17868			

#### 5.1.6- Resultados das cepas para o cartão GP com cultivos de 48 horas

Cepa	Cartão 1	Cartão 2	Cartão 3
B-1403			
B-934			
ATCC 700327			
ATCC BAA-752			
ATCC BAA-751			
ATCC 29213			
ATCC BAA-750			
ATCC 43079			

#### 5.1.7- Resultados das cepas para o cartão BCL com cultivos de 48 horas

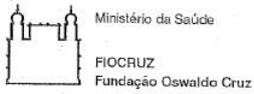
Cepa	Cartão 1	Cartão 2	Cartão 3
B-1048			
ATCC 61			
ATCC 51063			
ATCC 84			
ATCC 8509			
ATCC 7070			
ATCC 14576			

#### 6-ANEXOS


Elaborado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_  
 Revisado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_

#### / FOLHA DE APROVAÇÃO

UO Elaboradora SEVAN	Numero 8398	Revisão 00	Página 14/15
-------------------------	----------------	---------------	-----------------



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

### 12- FOLHA DE APROVAÇÃO

	NOME	ASSINATURA
ELABORADO	Luciane Martins Medeiros	<u>Luciane Martins Medeiros</u>
ELABORADO	Fernanda Ventura Cruz	<u>Fernanda Ventura Cruz</u>
ELABORADO	Cristhiane Moura Falavina dos Reis	<u>Cristhiane Moura Falavina dos Reis</u>
ELABORADO	Victor de Oliveira Silva Ferreira	<u>Victor de Oliveira Silva Ferreira</u>
VERIFICADO	Ester Ribeiro de Figueiredo	<u>Ester Ribeiro de Figueiredo</u>
VERIFICADO	Carina Cantelli Pacheco de Oliveira	<u>Carina Cantelli P. Oliveira</u>
CONFERIDO	Marcio Moreira da Silva	<u>Marcio Moreira da Silva</u>
APROVADO	Leonardo Teixeira Rodrigues	<u>Leonardo T. Rodrigues</u>
APROVADO	Henriana Landrini	<u>Henriana Landrini</u>

CÓPIA NÃO CONTROLADA

UO Elaboradora SEVAN	Numero 8398	Revisão 00	Página 15/15
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## APÊNDICE F – Instrução de Trabalho (IT) n° 9046 “Identificação de bactérias e de fungos através do sistema VITEK MS (BioMérieux)”



### INSTRUÇÃO DE TRABALHO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ATRAVÉS DO SISTEMA VITEK MS (BioMérieux)

UNIDADE ELABORADORA:  
SEPIN

NÚMERO: 9046

#### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.

#### 2- OBJETIVOS

Definir a metodologia de identificação de micro-organismos (bactérias e fungos) isolados pelo Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos, utilizando a análise proteômica por MALDI-TOF, através do sistema comercial VITEK MS (Bio-Mérieux).

#### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a Seção de Esterilidade, Processos e Insumos (SEPIN), do Laboratório de Controle de Microbiológico – LACOM.

#### 4- SIGLAS

AS	- Agar Sangue
ATCC	- American Type Culture Collection
BDA	- Agar Batata Dextrose
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LACOM	- Laboratório de Controle de Microbiológico
MALDI-TOF	- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
RPM	- Rotações por Minuto
SEPIN	- Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
TSA	- Agar Tripticase Soja
VITEK MS	- Sistema Comercial Espectrometria de Massa Bio-Mérieux

#### 5- REFERÊNCIAS

Manual do VITEK MS (Bio-Mérieux)

#### 6- DEFINIÇÕES

Não aplicável.

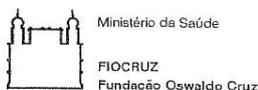
#### 7- PRÉ-REQUISITOS

##### 7.1- Origem das cepas e condições de cultivo

As culturas a serem submetidas à identificação podem apresentar diversas origens, como:

- Linhagem ATCC, INCQS, ou outra Coleção de Cultura
- Monitoramento Ambiental de áreas controladas
- Monitoramento de Águas
- Simulação de envase (*Media Fill*)
- Ensaios de Validação
- Insumos
- Produtos

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
08 / 04 / 2015	08 / 04 / 2018	00	01/07



## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

- Outras fontes de contaminação
- Serão realizados cultivos em placas de TSA com incubação em estufa a 30°-35°C por 24-48 horas (culturas bacterianas) ou em placas de BDA com incubação em estufa a 20°-25°C por três a cinco dias (culturas fúngicas)

### 7.2- Materiais

- Álcool 70%
- Alça descartável estéril 1µL
- Becker para descarte
- Luvas estéreis
- Luvas de procedimento (não estéreis) sem talco
- Micropipetas graduáveis de 0,1 a 2µL
- Ponteiras descartáveis para 0,1 a 10µL
- Saco plástico autoclavável para descarte de material
- Tubo tipo Eppendorf de 2 mL
- Tubo tipo Eppendorf de 0,5 mL (tipo MicroAmp)
- Lâminas (slides) descartáveis para o sistema VITEK MS (BioMerieux)

### 7.3- Equipamentos

- Agitador de tubos (Vortex)
- Estufas bacteriológicas com temperaturas de 20° - 25°C e 30° -35°C
- Cabine de segurança biológica
- Geladeira
- VITEK MS

### 7.4- Meios de cultura, Soluções e Reagentes

- Agar Trípico de Soja (TSA)
- Agar Sangue de Carneiro a 5% (AS)
- Matriz CHCA (Bio-Merieux)
- Solução FA (Bio-Merieux)
- Agar Batata dextrose (BDA)

### 7.5- Microrganismos utilizados no Controle Positivo

- *Escherichia coli* ATCC 8739

### 7.6- Documentos internos

- DI 7671 - Preparo de Lâmina de Fungo Filamentoso para Observação Direta ao Microscópio
- DI 4990 - Coloração de Gram
- DI 7673 - Uso do Aparelho para Coloração de Gram *SlidInk Hemogram*

## 8- PROCEDIMENTOS

### 8.1- Preparo das amostras nas lâminas (slides)

Utilizando o mapa de lâminas (*slides*) para o VITEK MS (Anexo A), anotar cada amostra em duplicata. Reservar as posições G3 e G4 de cada lâmina para o controle positivo. Preencher o cabeçalho do mapa, conforme as informações solicitadas.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9046	Revisão 00	Página 02/07
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### a) Amostras de bactérias

A partir de cultivos de 24h em placa de TSA, realizar esfregaço com alça de 1µL em um poço (spot). Em seguida, aplicar 1µL da solução matriz CHCA e esperar cristalizar. Realizar cada amostra em duplicata, seguindo o mapa de lâminas elaborado.

### b) Amostras de fungos filamentosos

### c) Amostras de bactérias de difícil ruptura de parede celular

Realizar o mesmo procedimento descrito para fungos filamentosos, conforme o item 8.1.b.

**Nota:** Utilizar, em todas as lâminas, a linhagem ATCC 8739 (*E. coli*) como controle positivo, nas posições G3 e G4. Este cultivo deverá ser realizado em placas de AS, em estufa bacteriológica de 30 a 35°C, por 24 horas.

### 8.2- Cadastro das amostras

a) Entrar no software *SARAMIS Target Manager* e selecionar a opção *New Plate*. Na tela *Plate-Number*, inserir o número da lâmina ou utilizar a leitora de código de barras. Pressionar "OK";

b) Automaticamente, irá abrir uma nova tela (*Description*). Inserir informações sobre a lâmina e pressionar "OK";

c) Automaticamente, irá abrir uma nova tela (*Method*). Selecionar a opção *Microrganisms in Alpha-cyano* e clicar em OK.

d) Será aberta uma tela com uma réplica da lâmina. Preencher os dados de cada amostra, seguindo a posição determinada no mapa de lâminas para o VITEK MS previamente. Após a inserção dos dados de cada amostra pressionar *Save Position*. Após o cadastro de todas as amostras, pressionar *Save Plate*. Se somente uma lâmina for cadastrada, ir para o item 8.2.f.

e) Caso sejam necessárias outras lâminas, pressionar *New Plate* e repetir os procedimentos descritos do item 8.2. e ao item 8.2.d.

f) Finalizado o cadastro de todas as lâminas, pressionar *New Project*.

g) Abrirá automaticamente uma nova tela ("Project-Name"). Inserir a data do ensaio e, caso necessário, informações pertinentes.

h) Selecionar cada lâmina criada e "arrastá-la" para a posição correspondente à posição previamente determinada no mapa de lâminas para o VITEK MS.

i) Selecionar *Export Experiment Genie*. Abrirá uma tela de confirmação da exportação para o diretório. Pressionar OK e sair do *SARAMIS Target Manager*.

### 8.3- Introdução dos slides no VITEK MS, alinhamento da bandeja de lâminas e verificação dos pontos de controle G3 e G4

a) Dar um duplo clique no ícone *Shimadzu Biotech MALDI-MS* na área de trabalho do computador. Cinco telas se abrirão automaticamente.

b) Na tela *Aquisition-Linear\_SARAMIS*, selecionar a aba *Exp. Tech.*. Selecionar a opção de modo *Standby* e em seguida selecionar a opção *Open Door*. Aparecerá uma tela pedindo a confirmação da abertura. Clicar em YES. A porta do equipamento se abrirá.

c) Com luvas sem talco, retirar a bandeja de lâminas do equipamento e colocar cada lâmina na posição correspondente à posição previamente determinada no mapa de lâminas para o VITEK MS. Inserir a bandeja no equipamento.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9046	Revisão 00	Página 03/07
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

d) Na tela *Aquisition-Linear\_SARAMIS*, na aba *Exp. Tech.*, selecionar a opção *Close Door*. A porta do equipamento se fechará.

e) Selecionar a aba *Slide*. Em seguida, selecionar a opção *Align plate...* Abrirá automaticamente uma outra tela (*Align Sample Plate*), onde estarão discriminados os pontos de referência do alinhamento. Selecionar cada ponto, verificar (através da câmera do equipamento, tela *Camera viewer*) se está bem centralizado e, em caso afirmativo, selecionar o ícone de confirmação ("V" de cor verde). Caso não esteja centralizado, ajustar com ajuda do *mouse* e selecionar o ícone de confirmação ("V" de cor verde). Repetir o procedimento para cada ponto de referência. Clicar *OK*.

f) Na tela *Aquisition-Linear\_SARAMIS*, selecionar a aba *Firing*. Posicionar o cursor em cima do quadrado amarelo (destaque da posição das lâminas na bandeja) e, com o botão direito do "mouse", selecionar a opção *Goto location...*

g) Abrirá a tela *Goto well centre (or plate location)*. Nesta, digitar o primeiro controle (1g3) e selecionar *OK* em seguida.

h) A câmera do aparelho irá se direcionar para o local selecionado. Na tela *Aquisition-Linear\_SARAMIS*, na aba *Firing*, selecionar o botão *FIRE*.

i) Na tela "<Untitled> - MALDI-MS", verificar se os picos apresentam porcentagem de intensidade ("% int") entre 20 e 100 mV e somatório ("sum") maior que 3000 mV. Se estes aspectos não estiverem adequados, repetir o procedimento. Se estiverem adequados, selecionar a aba *Processing*. Em seguida, selecionar a opção *Calibration* e uma tela *Calibration* se abrirá automaticamente.

j) Na tela *Calibration*, selecionar o botão *List references* e uma tela (*Reference files:*) se abrirá automaticamente. Selecionar o arquivo "bmx\_sample\_CHCA.pos\_ref" na pasta *References* e selecionar o botão *Open*.

l) Na tela *Calibration*, clicar duas vezes no botão *Calibrate*. Verificar se as massas esperadas para este padrão foram encontradas, em especial os seguintes valores: 4365,40-5096,80-6255,40-9742,00. Após a verificação, clicar em *Load* e depois em *Save*. Fechar a tela.

### 8.4- Aquisição dos perfis de espectros das amostras

a) Na tela "<Untitled> - MALDI-MS", selecionar a opção *Automation* e, em seguida, *Auto Experiment*.

b) Uma janela se abrirá (*Auto Experiment*): nesta, clicar no ícone *Pasta (Select Plate Type)*.

c) Abrirá automaticamente uma nova tela (*Select Plate*). Selecionar o arquivo "4x48-fleximass-ds-to-43r00.plt" e clicar em *Open*.

d) Na tela *Auto Experiment*, selecionar o ícone *Import Experiment Genie*. Uma nova tela se abrirá (*Import Genie*);

e) Na tela *Import Genie*, selecionar o arquivo a ser importado (na opção *Import File*, verificar a listagem oferecida) e o método a ser utilizado (na opção *Method File*, selecionar o arquivo "bmx\_sample\_CHCA.mtd") e clicar em "OK".

f) Na tela *Auto Experiment*, selecionar o ícone *Run experiment*. O aparelho irá iniciar o processamento das amostras submetidas.

### 8.5- Obtenção de resultados pelo SARAMIS Premium

Entrar no software *SARAMIS Premium* e selecionar a opção *Status*.

Os resultados serão exibidos imediatamente após o processamento da amostra. Procurar a amostra desejada através da coluna *Sample*. Ao observar o resultado, verificar também a morfologia colonial da placa de origem e o resultado da morfologia microscópica (DI 7671 para fungos filamentosos e DI 4990 e DI 7673 para bactérias), para identificar discrepâncias na identificação.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9046	Revisão 00	Página 04/07
-------------------------	----------------	---------------	-----------------



## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 8.6- Liberação de resultados

Os resultados obtidos através do *SARAMIS Premium* serão adicionados ao Caderno da Coleção de Culturas, ao Banco de Dados (em Excel) da Coleção de Culturas e aos referidos laudos.

### 9- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS

LACOM e SEPIN.

#### 9.1- UO incluídas nesta revisão

Não aplicável.

#### 9.2- UO excluídas nesta revisão

Não aplicável.

### 10- TREINAMENTO

Teórico e prático.

#### 10.1- Multiplicadores

Elaboradores, verificador, aprovador e todos da SEPIN treinados na revisão vigente deste DI e DI 1083 – Treinamento para Qualificação em Serviço.

### 11- ANEXOS

A- Mapa de lâminas (slides) para o VITEK-MS

#### ANEXO A

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9046	Revisão 00	Página 05/07
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

**INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**ANEXO A**

**Mapa de lâminas (slides) para o VITEK MS**

	1	2	3	4		1	2	3	4
A					A				
B					B				
C					C				
D					D				
E					E				
F					F				
G			E.coli	E.coli	G			E.coli	E.coli
H					H				
I					I				
J					J				
K					K				
L					L				
	1	2	3	4		1	2	3	4
A					A				
B					B				
C					C				
D					D				
E					E				
F					F				
G			E.coli	E.coli	G			E.coli	E.coli
H					H				
I					I				
J					J				
K					K				
L					L				

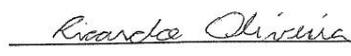
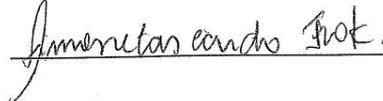
COPIA NÃO CONTROLADA

**/ FOLHA DE APROVAÇÃO**

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9046	Revisão 00	Página 06/07
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

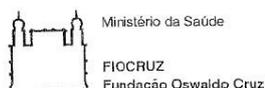
## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 12- FOLHA DE APROVAÇÃO

	NOME	ASSINATURA
ELABORADO	Luciane Martins Medeiros	
ELABORADO	Fernanda Ventura Cruz	
VERIFICADO	Adriana Marques Frazão	
CONFERIDO	Ricardo dos Santos de Oliveira	
APROVADO	Simone Cascardo Frola	

CÓPIA NÃO CONTROLADA

## APÊNDICE G – Instrução de Trabalho (IT) n° 9083 “Identificação de bactérias e de fungos isolados na rotina a partir do kit MICROSEQ (Life Technologies)”



### INSTRUÇÃO DE TRABALHO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)

UNIDADE ELABORADORA:  
SEPIN

NÚMERO: 9083

#### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.

#### 2- OBJETIVOS

Define a metodologia de identificação de micro-organismos utilizando kits comerciais que amplificam e sequenciam regiões específicas do DNA microbiano (DNAr 16S para bactérias e subunidade D2 do DNAr 18S para fungos).

#### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a Seção de Esterilidade, Processos e Insumos - SEPIN, do Laboratório de Controle de Microbiológico - LACOM. Este procedimento se aplica aos três kits utilizados: MICROSEQ 500 (para identificação, em geral, de bactérias); MICROSEQ FULL GENE (para isolados bacterianos que necessitam de uma identificação mais minuciosa); e MICROSEQ D2 LSU (para fungos filamentosos).

#### 4- SIGLAS

ATCC	- American Type Culture Collection
DI	- Documento interno
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LACOM	- Laboratório de Controle de Microbiológico
RPM	- Rotações por Minuto
SEPIN	- Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
TSA	- Agar Trypticase Soja

#### 5- REFERÊNCIAS

Manual do Kit MicroSeq (Life Technologies)

#### 6- DEFINIÇÕES

Não aplicável.

#### 7- PRÉ-REQUISITOS

##### 7.1- Origem das cepas

- Linhagem ATCC (INCQS)
- Monitoramento Ambiental de áreas controladas
- Monitoramento de Águas
- Identificação de Contaminantes

##### 7.2- Materiais

- Álcool 70%
- Alça descartável estéril 10µL
- Becker para descarte
- Caixa com divisórias para conservação dos criotubos

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
16/01/2015	16/01/2018	00	01/0

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

- Criotubos de capacidade 2mL
- Estante para tubos
- Luvas estéreis
- Luvas de procedimento (não estéreis) sem talco
- Micropipetas graduáveis de 10 $\mu$ L - 200 $\mu$ L e 200 $\mu$ L - 1000 $\mu$ L
- Ponteiras descartáveis e estéreis para 10 $\mu$ L, 200 $\mu$ L e 1000 $\mu$ L
- Saco plástico autoclavável para descarte de material
- Tubo tipo Eppendorf de 2 mL (microtubos)
- Tubo tipo Eppendorf de 0,5 mL (tipo MicroAmp)
- Placa de 96 orifícios
- Cartucho para limpeza Micro Seq (colunas em gel para purificação)

### 7.3- Equipamentos

- Agitador de tubos (Vortex)
- Estufas bacteriológicas com temperaturas de 20° - 25°C e 30° -35°C
- Cabine de segurança biológica
- Cabine de preparo de reagente para amplificação
- Cabine de amplificação
- Freezer de -20°C (-17,5  $\pm$  2,5 ou -15°a -20°C)
- Geladeira
- Mini centrífuga
- Banho-seco a 100°C
- Termociclador (placa)

### 7.4- Meios de cultura, Soluções e Reagentes

- Agar Peptona Caseína soja (Agar Casoy)
- Caldo Peptona Caseína soja
- Agar Batata Dextrose
- Enzima EXO-SAP
- Kit MicroSEQ 500 ou Full Gene ou D2 LSU (PCR e Sequenciamento)
- Kit de Extração de DNA PrepMax Ultra

### 7.5- Microrganismos utilizados

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- Microrganismos oriundos da Identificação de Contaminantes que não tenham sido identificados pelas metodologias utilizadas na rotina da SEPIN, crescidas em placas de TSA ou AN

## 8- PROCEDIMENTOS

De acordo com o tipo de microrganismo e com a dificuldade de identificação, escolher um dos três kits: MICROSEC 500; MICROSEC FULL GENE e MICROSEC D2 LSU. Os kits são compostos por duas caixas: uma de PCR e outra de Sequenciamento.

### 8.1- Preparo das amostras

Culturas em placas de TSA ou AN. Não pode ser em Agar Sangue nem outro meio com cromógenos. Cuidado também com pigmentos de colônias fúngicas: usar colônia recente, para não ter tanta pigmentação.

### 8.2- Extração do DNA

Identificar os tubos tipo *Eppendorf*. Em uma cabine exclusiva para preparo de reagente de amplificação, distribua alíquotas de 100  $\mu$ L de reagente PrepMan Ultra. Com o auxílio de uma alça bacteriológica, pegar uma pequena quantidade da cultura e colocar no respectivo tubo com o reagente.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9083	Revisão 00	Página 02/06
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

Passar no agitador de tubos (*Vortex*) rapidamente (5 a 10 s) e deixar por 10 min a 100 °C em banho seco.

Centrifugar por três minutos a 13-14 mil RPM/temperatura ambiente em mini centrífuga.

Identificar outra fileira de tubos tipo *Eppendorf*. Distribuir alíquotas de 495 µL de água estéril (Nuclease-Free Water) nos tubos. Quando acabar a centrifugação, transferir 5 µL de cada amostra (sobrenadante) para os tubos com 495 µL para realizar uma diluição 1:100. Guardar em duas caixas: uma de "DNA BRUTO" e outra com o "DNA PRONTO PARA USO".

### 8.3- Amplificação

Distribuir 15 µL do reagente para PCR MasterMix (Kit PCR) nos tubos tipo MicroAmp em área separada, isenta de DNA. Depois, levar a estante com estes tubinhos para outra sala e distribuir 15 µL de cada amostra na seguinte ordem: CONTROLE NEGATIVO (Água isenta de DNA), CONTROLE POSITIVO (Vem com o kit, *E. coli*), AMOSTRAS (na ordem numérica). Homogeneizar (com pipeta) quando colocar a amostra. Volume final: 30µL

Colocar no termociclador. Selecionar programa específico no visor do aparelho (descrito abaixo):

HOLD	95 °C/10 segundos	
CYCLE	MELT	95 °C/30 segundos
	ANNEAL	60 °C/30 segundos
	EXTENSION	72 °C/45 segundos
HOLD	72 °C/1 minuto	
(FINAL STEP)	4 °C/∞	

Purificação do *Amplicon*: Pegar nova fileira de tubinhos e, para cada amostra, separar 2: um FORWARD (FF) e um REVERSE (R). Distribuir 2 µL da enzima EXO-SAP (Exonuclease 1 + Fosfatase Alcalina) em cada um. Como é muito sensível, usar cooler (estante gelada). Usar a enzima e voltar a guardar no freezer (tem que ser muito rápido).

Distribuir 5 µL de cada amostra em cada tubinho (FF e R). Volume final= 7µ

Colocar os tubinhos FF e R com a enzima no termociclador a 37 °C/15 min. Depois, colocar a 80 °C por 15 min (inativar a enzima). Este processo é o mesmo para fungos e bactérias.

### 8.4- Sequenciamento

Preparo do *amplicon* purificado para o sequenciamento: Colocar 13 µL do reagente de sequenciamento FF no tubinho com *amplicon* FF e 13 µL do reagente de sequenciamento R no tubinho com *amplicon* R. Volume final: 20 µL por tubinho (FF e R).

Colocar tubinhos no termociclador e selecionar programa específico (descrito abaixo):

HOLD	96 °C/1 minuto	
CYCLE	MELT	96 °C/10 segundos
	ANNEAL	50 °C/5 segundos
	EXTENSION	60 °C/1 minuto e 15 segundos
(FINAL STEP)	4 °C/∞	

Purificação do produto de sequenciamento. Abrir o "Cartucho para limpeza MICROSEQ ID", que são colunas para purificação. Centrifugar por 3 min a 3000 rpm para retirar água (a coluna vem hidratada).

Transferir a coluna seca (após centrifugação) para outro tubo tipo *Eppendorf* 2 mL seco. A transferência é realizada com a mão (com luva), pegando o suporte móvel da coluna.

Transferir 20 µL do produto de sequenciamento para estes tubos com coluna. Colocar bem no meio da coluna sem encostar no gel (NÃO PODE FURAR O GEL).

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

Centrifugar por 5 min a 3000 rpm. Após, retirar a coluna e descartá-la. Transferir os 20 µL centrifugados (no fundo do tubo) para a placa. Observar a ordem de colocada das amostras: na vertical (1ª coluna, 2ª coluna, etc), Controle Positivo/Controle negativo/Amostras, primeiro o FF e depois o R. Preencher os poços vazios com água estéril (depende de quantos capilares tiver o seqüenciador).

Colocar a placa na centrífuga de placas. Não pode haver nenhuma bolha no fundo nem respingo na parede.

Colocar um tapetinho (SEPTA) sobre a placa (a "bolinha" é para baixo). Centrifugar rapidamente. Quando chegar a 800 rpm, já podemos desligar a centrífuga.

Após rápida centrifugação, retirar septa e levar para o seqüenciador.

Colocar o septa no seqüenciador, que irá vedar a placa, deixando somente o orifício central para passagem do capilar. A vedação deve ocorrer do meio para as pontas, para evitar que os poços fiquem sem a borracha encaixada.

Encaixar a placa na caçapa do seqüenciador. Observar o "buraco" da caçapa, que tem posição certa para encaixar na plataforma do seqüenciador. Quando a caçapa estiver bem encaixada, o aparelho a reconhece. Na tela do monitor, o que estava em cinza aparece em amarelo (superfície reconhecida).

Depois de encaixada a placa, selecionar as condições de sequenciamento, discriminar também amostras e placa. Dar início a leitura pelo seqüenciador (Usar o seqüenciador da Plataforma Tecnológica da FIOCRUZ ou do LATER/Bio-Manguinhos).

### 8.5- Análise das seqüências obtidas

Colocar as sequencias no modelo FASTA, edita-las e compara-las com outras no Gene Bank.

### 8.6- Liberação de resultados

Os resultados obtidos através da análise das sequencias serão adicionados ao Caderno da Coleção de Culturas, ac Banco de Dados (em Excel) da Coleção de Culturas e aos referidos laudos.

## 9- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS

SEPIN, LACOM.

### 9.1- UO incluídas nesta revisão

Não aplicável.

### 9.2- UO excluídas nesta revisão

Não aplicável.

## 10- TREINAMENTO

Teórico e prático.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9083	Revisão 00	Página 04/06
-------------------------	----------------	---------------	-----------------



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
em Imunobiológicos  
Bio-Manguinhos

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 10.1- Multiplicadores

Elaborador, verificador, aprovador e todos os treinados na revisão vigente deste DI e DI 1083 – Treinamento para Qualificação em Serviço.

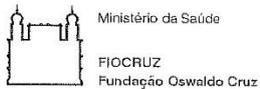
### 11- ANEXOS

Não aplicável.

CÓPIA NÃO CONTROLADA

### / FOLHA DE APROVAÇÃO

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9083	Revisão 00	Página 05/06
-------------------------	----------------	---------------	-----------------



## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 12- FOLHA DE APROVAÇÃO

	NOME	ASSINATURA
ELABORADO	Luciane Martins Medeiros	
VERIFICADO	Fernanda Ventura Cruz	
CONFERIDO	Ricardo dos Santos de Oliveira	
APROVADO	Simone Cascardo Frota	

CÓPIA NÃO CONTROLADA

APÊNDICE H – Relatório de investigação de Fontes de Contaminação  
utilizando o Banco de Dados, a Bacterioteca e atécnica de PFGE

Ministério da Saúde  
Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz

RELATORIO  
CONFIDENCIAL

Investigação da presença de [REDACTED] no ponto denominado [REDACTED]  
[REDACTED]/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ: identificação dos isolados, mapeamento dos locais  
de incidência e rastreamento molecular por PFGE

(Parte da Tese de doutorado intitulada "Criação da Coleção de Microrganismos de Bio-  
Manguinhos e Caracterização dos isolados bacterianos e fúngicos de áreas controladas  
e de contaminantes envolvidos na produção de imunobiológicos, reativos e  
biofármacos", sob orientação das dras. Veronica Viana Vieira e Manuela da Silva)

Por Luciane Martins Medeiros,

Com a colaboração de Veronica Viana Vieira, Erica Louro da Fonseca, Cristhiane  
Moura Falavina dos Reis, Adriana Marques Frazao e Fernanda Ventura Cruz

## APÊNDICE I – Relatório cepas autóctones

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTOCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIO-MANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 1 de 10

### I - INTRODUÇÃO

A eficácia dos meios de cultura em promover crescimentos bacteriano e fúngico pode ser avaliada através da inoculação de cepas microbianas de referência.

Até recentemente, os meios de cultura utilizados na produção e controle de qualidade de Bio-Manguinhos eram desafiados somente com cepas de micro-organismos estipulados pelas Farmacopéias em vigência (Tabela 1).

**Tabela 1- Meios de cultura líquidos e seus respectivos micro-organismos de desafio**

Meios de Cultura Líquidos	Micro-organismos 10-100 UFC/mL	Cepa (ATCC)
Caldo BHI	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
Caldo Lactose	<i>Escherichia coli</i>	8739
Caldo Nutriente	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
Caldo Peptona Caseína Soja	<i>Aspergillus niger</i>	16404
	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
	<i>Candida albicans</i>	10231
Meio Fluido de Tioglicolato	<i>Clostridium sporogenes</i> <sup>1</sup>	11437
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>2</sup>	9027
	<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	6538
Caldo Müller Hinton	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
Água Peptonada	<i>Escherichia coli</i>	8739

<sup>1</sup>Uma alternativa para *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 é *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482.

<sup>2</sup>Uma alternativa para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 é *Micrococcus luteus* ATCC 9341

<sup>3</sup>Uma alternativa para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 é *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

USP XXXI <71> STERILITY TESTS - GROWTH PROMOTION TEST

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTOCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIO-MANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 2 de 10

Segundo harmonização das normas internacionais de Boas Práticas de Fabricação (BPF), e considerando as recomendações das últimas inspeções da OMS e ANVISA, a promoção de crescimento nos meios de cultura utilizados nas validações dos processos de fabricação de injetáveis (*media fill*), assim como nos testes de controle de qualidade, deve contemplar a microbiota característica de cada unidade industrial. Portanto, torna-se imprescindível a introdução de micro-organismos autóctones (*in house*) como padrões secundários no procedimento de promoção de crescimento realizado no Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos.

## II – OBJETIVO

- Isolar os micro-organismos com maior incidência nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos.
- Selecionar inicialmente cinco desses micro-organismos que abrangessem características morfológicas distintas, sendo um coco Gram positivo, três bastonetes Gram negativos e um fungo filamentoso (**primeira etapa**)
- Selecionar os gêneros bacterianos de maior incidência nas Seções de Envase (SEVLI e SEVLQ) para o preparo de novos lotes semente trabalho (**segunda etapa**)

## III – Setor responsável pela realização do método na rotina

SEPIN / LACOM

## IV - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Álcool a 70%
- Alças descartáveis estéreis de 10 µL
- Bateria de corantes de Gram
- Caneta "pilot"
- Criotubos com micro-organismos de referência ATCC
- Estantes para tubos
- Lâminas de vidro para microscopia
- Luvas de látex estéril
- Micropipetas graduáveis de 0 - 50 µL, 10 µL - 200 µL e 100 µL - 1000 µL
- Pipetas descartáveis de borossilicato estéreis de 5 mL, 10 mL e 25mL
- Placas de Petri estéril de 90 x 15 mm
- Ponteiras descartáveis estéreis para 200 µL e 1000 µL
- Protocolo de anotações

Rio de janeiro, 14 de fevereiro de 2011

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTÓCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIOMANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 3 de 10

- Saco plástico autoclavável para descarte de material
- Seringas com agulha estéreis de 5 mL
- Tesouras estéreis
- Toalhas descartáveis
- Tubos de centrifuga descartáveis de 15 mL e 50 mL
- Uniforme completo (gorro, máscara e avental)
- Agitador de tubos
- Bico de Bunsen
- Contador de colônia
- Estufas bacteriológicas com temperatura de 20-25°C e 30-35°C
- Cabine de Segurança Biológica – Classe II
- Freezer (-20°C e/ou -70°C)
- Banho-maria a 100°C
- Centrifuga
- Meios de cultivo (TSA e TSB)
- Geladeira (2 a 8°C)
- Microscópio óptico
- Pipetador automático
- Termômetro de máxima e mínima
- Kit comercial BBL Crystal™ (Becton, Dickinson and Co)
- Kit Fast MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification; Fast MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification (Applied Biosystems)™.
- Água deionizada
- Água estéril e livre de RNA/DNA

#### V - PROCEDIMENTO

Os isolados microbianos selecionados estão ilustrados nas tabelas 2 e 3. As cepas foram caracterizadas fenotipicamente através de observação morfotintorial (Gram), teste de KOH, catalase, oxidase e indol.

**Tabela 2 - Micro-organismos selecionados para a primeira etapa**

Identificação dos isolados	Procedência	Microscopia
B-287	Suspensão Viral	BGN
B-357	Monitoramento do Ar	BGN
B-358	Monitoramento do Ar	CGP
B-359	Monitoramento do Ar	BGN
FF	Monitoramento do Ar	Fungo filamentosos

BGN=Bastonete Gram negativo; CGP=Coco Gram positivo; FF=Fungo filamentosos

Rio de Janeiro, 14 de fevereiro de 2011

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTOCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIO-MANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 4 de 10

**Tabela 3 - Micro-organismos selecionados para a segunda etapa**

Identificação dos isolados	Procedência	Microscopia
B-614	Monitoramento do Ar/SEVLI	CGP
B-726	Monitoramento do Ar/SEVLQ	BGP
B-985	Monitoramento do Ar/SEVLI	CGP
B-1024	Monitoramento do Ar/SEVLQ	BGP
B-1063	Monitoramento do Ar/SEVLQ	BGP

BGP=Bastonete Gram positivo; CGP=Coco Gram positivo

Na primeira etapa, foram utilizadas cinco cepas. A cepa B-287 foi isolada de uma suspensão viral de febre amarela enviada pelo Laboratório de Produção de Vacina Febre Amarela (LAFAM) e reprovada por esterilidade. Os outros quatro micro-organismos foram obtidos de placas de monitoramento ambiental das áreas de produção do departamento de vacinas virais e Departamento de Processamento Final (DEPFI).

As cinco cepas selecionadas para a segunda etapa foram isoladas no monitoramento ambiental (Monitoramento do ar e de operadores) nas Seções de Vacinas Líquidas (SEVLQ) e de Vacinas Liofilizadas (SEVLI), pertencentes ao DEPFI. A escolha das cepas foi baseada na incidência dos micro-organismos isolados em cada seção. Na SEVLI, os gêneros mais incidentes foram *Micrococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Corynebacterium* sp e *Kytococcus* sp. Na SEVLQ, *Staphylococcus* sp foi o gênero de maior incidência, sendo seguido por *Micrococcus* sp e *Corynebacterium* sp.

A identificação foi obtida através do kit comercial BBL Crystal™ (Becton, Dickinson and Co); o fungo filamentoso foi identificado presumidamente, através da observação a fresco em lâmina e das características da cultura (verso e reverso).

Todos os cinco micro-organismos da primeira etapa foram submetidos à identificação genética, utilizando-se o kit Fast MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification™ e Fast MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification™ (Applied Biosystems), que consiste na amplificação e no sequenciamento de parte do gene 16S, com posterior comparação de homologia com acervo de

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTÓCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIOMANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 5 de 10

sequências conhecidas em *software* exclusivo. Esta etapa da identificação foi realizada no Centro de Treinamento da Applied corporation, em São Paulo, com a presença de nossa Técnica responsável pelo isolamento.

As cepas da segunda etapa também foram submetidas à identificação genética por sequenciamento do gene 16S. Entretanto, a identificação não foi realizada através do kit comercial (Fast MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification™) utilizado na identificação das cepas da primeira etapa, mas sim pela metodologia tradicional. Esta etapa foi desenvolvida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, no Setor de Identificação Bacteriana, pela nossa Técnica responsável pelo isolamento e pela equipe deste Setor. Como já houve o sequenciamento de uma cepa de *Staphylococcus* sp isolada a partir do monitoramento ambiental na primeira etapa, optou-se pelo sequenciamento dos outros gêneros comuns às duas seções (*Micrococcus* sp e *Corynebacterium* sp).

As suspensões dos micro-organismos a serem utilizados como padrão secundário ou lote semente trabalho foram distribuídas em 50 alíquotas, misturadas com 20% de glicerol, e então armazenadas à temperatura de -70° C.

Os isolados autóctones, assim como as cepas de referência tradicionalmente preconizadas pelas Farmacopéias, foram inseridos no teste de promoção de crescimento em meios de cultura líquidos utilizados em simulações de envase (*media fill*) e no teste de esterilidade bacteriana e fúngica.

## VI - RESULTADOS

Nos dois kits de identificação bioquímica não foi possível identificar dois isolados (B-357 e B-359). Os resultados fenotípicos estão ilustrados na tabela 4 (primeira etapa) e 5 (segunda etapa).

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTÓCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIOMANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 6 de 10

Tabela 4 - Caracterização e identificação fenotípica das cepas bacterianas na primeira etapa

Cepas isoladas	KOH	Catalase	Oxidase	Indol	BBL
B-287	+	+	-	-	<i>Providencia stuartii</i>
B-357	+	+	-	-	Não identificado
B-358	-	+	-	-	<i>Staphylococcus sp</i>
B-359	+	+	-	-	Não identificado

- =Negativo; +=Positivo

Tabela 5 - Caracterização e identificação fenotípica das cepas bacterianas na segunda etapa

Cepas isoladas	KOH	Catalase	Oxidase	Indol	BBL
B-614	-	+	-	-	<i>Micrococcus luteus</i>
B-726	-	+	-	-	<i>Corynebacterium sp</i>
B-985	-	+	-	-	<i>Micrococcus lylae</i>
B-1024	-	+	-	-	<i>Corynebacterium sp</i>
B-1063	+	+	-	-	<i>Corynebacterium sp</i>

- =Negativo; +=Positivo

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam que foi possível a identificação genotípica das amostras analisadas na primeira etapa pelo kit MicroSeq ID. O software exclusivo do sistema MicroSeq ID gerou um relatório impresso de cada cepa analisada, com dados referentes ao grau de similaridade, avaliação da qualidade da análise, tamanho do fragmento amplificado/sequenciado, entre outras informações (Anexo A).

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTÓCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIO-MANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 7 de 10

**Tabela 6 - Identificação genotípica das cinco cepas candidatas pelo sistema MicroSeq ID**

<b>Cepas isoladas</b>	<b>Identificação MicroSeq ID</b>
B-287	<i>Providencia stuartii</i>
B-357	<i>Moraxella osloensis</i>
B-358	<i>Staphylococcus cohnii urealyticum</i>
B-359	<i>Moraxella osloensis</i>
FF	<i>Penicillium citrinum</i>

Nos meios de cultura desafiados com as cepas da primeira etapa, foram utilizadas as cepas B-287, B-357 e B-358. O crescimento microbiano foi detectado para os três micro-organismos, embora uma espécie bacteriana (B-357) tenha apresentado uma turvação mais discreta dos meios testados. Essa turvação, entretanto, foi suficiente para a leitura do teste e o número de células viáveis se apresentou na faixa indicada para desafio (10-100 UFC). Os laudos gerados foram anexados ao relatório (Anexo B).

Os resultados referentes ao sequenciamento das cepas da segunda etapa estão alocados na tabela 7. Em relação aos resultados fenotípicos e genotípicos, as cepas B-985, B-1024 e B-1063 apresentaram identificações distintas. Diferenças entre os dois métodos de identificação já eram esperadas, uma vez que espécimes ambientais se apresentam como Gram variáveis, com alterações morfológicas e bioquímicas. Como o sequenciamento é a técnica mais fidedigna para identificação da seqüência (e conseqüentemente do micro-organismo), optamos pelo resultado obtido através desta técnica.

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTÓCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIO-MANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 8 de 10

**Tabela 7 - Identificação genotípica das cinco cepas pelo sequenciamento tradicional**

Cepas isoladas	Identificação Sequenciamento
B-614	<i>Micrococcus sp</i>
B-726	<i>Corynebacterium sp</i>
B-985	<i>Staphylococcus sp</i>
B-1024	<i>Staphylococcus sp</i>
B-1063	<i>Acinetobacter sp</i>

Na promoção de crescimento, foram utilizadas as cepas B-614 e B-985. O crescimento microbiano foi considerado satisfatório, onde se observou a turvação dos meios desafiados, assim como o crescimento dentro da faixa preconizada (10 a 100 UFC). Os laudos gerados foram anexados ao relatório (Anexo B).

#### **VII – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

A consistência de resultados torna viável o preparo de lotes semente trabalho de cada espécie estudada, e o emprego dos mesmos para determinar a eficácia dos meios de cultivo utilizados no controle de qualidade de vacinas e biofármacos produzidos em Bio-Manguinhos.

A continuidade do projeto, através do seqüenciamento de mais espécies bacterianas e fúngicas já isoladas, permitirá o estudo da incidência das mesmas e sua significância. Deste modo, novas cepas podem ser incluídas na promoção de crescimento do meio de cultivo utilizado na validação de processos assépticos de envase (*media fill*), de uma maneira contínua e de acordo com a variação da incidência.

Rio de Janeiro, 14 de fevereiro de 2011

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTÓCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIOMANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 9 de 10

<b>VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- European Pharmacopoeia 6.0. 01 2008:20601. 2.6.1. Sterility. pag 155-159.</li> <li>- Japanese Pharmacopoeia Fourteenth Edition, pag 1309.</li> <li>- United States Pharmacopoeia XXXII.</li> <li>- Guidance for Industry – Sterile Drug Products produced by aseptic processing - Current good Manufacturing Practice. Setembro de 2004.</li> <li>- DI 4990 – Coloração de Gram</li> <li>- DI 4989 – Técnica do KOH para Diferenciação entre Bactérias Gram Negativo e Gram Positivo.</li> <li>- DI 4991 – Teste para Verificação de Presença da Enzima Catalase em Bactérias.</li> <li>- DI 0182 – Identificação de Contaminantes.</li> <li>- DI 0207 – Promoção de Crescimento em Meios de Cultura.</li> </ul>
<b>IX - ANEXOS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>I - Resumo das planilhas geradas pelo sistema MicroSeqID – Library Search Report. Applied Biosystems.</li> <li>II – Laudos gerados de Promoção de Crescimento.</li> </ul>

Rio de janeiro, 14 de fevereiro de 2011

<b>PROJETO: INTRODUÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS AUTÓCTONES NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM BIOMANGUINHOS</b>			
<b>RELATÓRIO FINAL</b>			
Departamento: DEQUA	Laboratório: LACOM	Setor: SEPIN	Página 10 de 10

**Responsáveis pelo Relatório:**

ELABORADO	Luciane Martins Medeiros	
ELABORADO	Líliã Seródio Ribeiro	
VERIFICADO	Josiane Machado Vieira Mattoso	
VERIFICADO	Cláudia Maria Dias	
APROVADO	Darcy Akemi Hokama	

Rio de Janeiro, 14 de fevereiro de 2011

APÊNDICE J – Ficha catálogo *Micrococcus luteus****Micrococcus luteus***  
(B934/2010)

Fotos das Culturas em placas de Agar Sangue de Carneiro a 5%



Descrição da colônia

Colônias redondas, lisas, brilhosas, cor amarela, bordo regular.

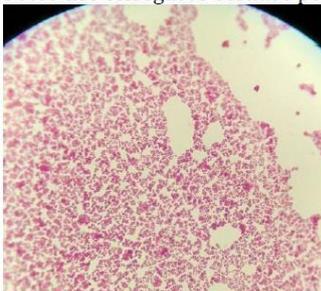
Fotos das Culturas em placas de Agar Trypticase de Soja



Descrição da colônia

Colônias redondas, lisas, brilhosas, cor amarela, bordo regular.

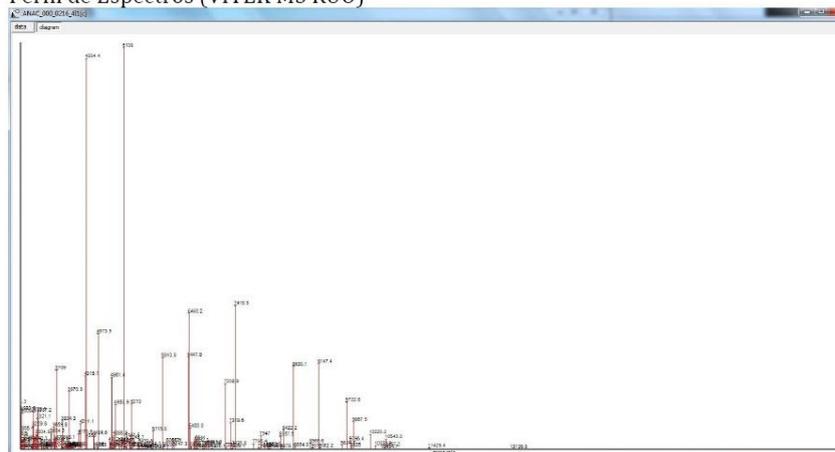
Fotos dos esfregacos corados pelo Gram



## Perfil bioquímico VITEK 2 (Cartão GP)

AMY	-	PIPLC	-	dXYL	-	ADH1	-	BGAL	-	AGLU	+
APPA	+	CDEX	-	AspA	-	BGAR	-	AMAN	-	PHOS	-
LeuA	+	Proa	+	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	+	BGUR	-
AlaA	+	TyrA	+	dSOR	-	URE	-	POLYB	-	dGAL	-
dRIB	-	ILATk	-	LAC	-	NAG	-	dMAL	-	BACI	-
NOVO	-	NC6.5	-	dMAN	-	dMNE	-	MBdG	-	PUL	-
dRAF	-	O129R	-	SAL	-	SAC	-	dTRE	-	ADH2s	-
OPTO	-										

## Perfil de Espectros (VITEK MS RUO)



## Sequencia

B934

```

CTGCGGTACCGTCCTTTCGCTTCTTCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAGGCCGTCAT
CCCTCACGGCGGCGTGCCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAGTATCCCCACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTCAACCCTCTCAGGCCGGC
TACCCGTGCTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGGAGTCCAT
CCAAAACCGATAAATCTTCCAACACCACCATGCGGTGGACGCTCCTATCCGGTATTAG
ACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAGAGTTAAGGGCAGGTTACTCACGTGTTACTACCCG
TTCGCCACTAATCCACCAGCAAGCTGGGCTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCAC
GCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAGCCTTC

```

## Observações

---



---



---

APÊNDICE K – Ficha catálogo *Streptomyces* spp.***Streptomyces* spp.**  
(B1047/2010)

Fotos das Culturas em placas de Agar Sangue de Carneiro a 5%



Descrição da colônia

Crescimento lento (acima de 72 horas), colônia fortemente aderida ao meio, de aspecto ressecado. Inicialmente bege e mais úmida, mas com o tempo de cultivo vai ressecando e assumindo aspecto ressecado e coloração mais esbranquiçada.

Fotos das Culturas em placas de Agar Trypticase de Soja



Descrição da colônia

Crescimento lento (acima de 72 horas), colônia fortemente aderida ao meio, de aspecto ressecado. Inicialmente bege e mais úmida, mas com o tempo de cultivo vai ressecando e assumindo aspecto ressecado e coloração mais esbranquiçada.

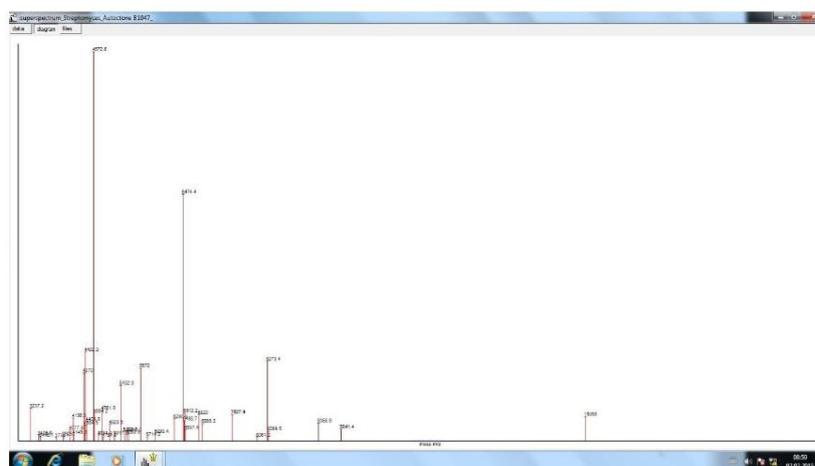
Foto do esfregaço corado pelo Gram



## Perfil bioquímico VITEK 2 (Cartão GP)

AMY	-	PIPLC	(-)	dXYL	-	ADH1	-	BGAL	(-)	AGLU	+
APPA	+	CDEX	-	AspA	-	BGAR	-	AMAN	-	PHOS	-
LeuA	+	Proa	+	BGURr	-	AGAL	+	PyrA	-	BGUR	-
AlaA	+	TyrA	+	dSOR	-	URE	-	POLYB	-	dGAL	(+)
dRIB	-	ILATk	-	LAC	-	NAG	-	dMAL	-	BACI	-
NOVO	-	NC6.5	-	dMAN	-	dMNE	-	MBdG	-	PUL	-
dRAF	-	O129R	-	SAL	-	SAC	-	dTRE	-	ADH2s	-
OPTO	-										

## Perfil de Espectros (VITEK MS RUO)



## Sequencia

B1047

```

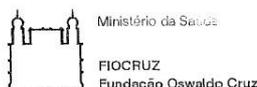
TTTTGCTTCTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCG
TCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATATTTCCCACTGCCTCCCGTAGGAGTC
TGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCCG
CTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGGGCTCATCCTGCACCCGCGG
AGCTTTCGATCACCAAGGATGCCCAAGATGATCAGTATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCA
GGGCTTGTCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTACCCGTTCCGACTAATC
CCCACCGAAGTGGTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCT
GAGCCAGGATCAAA

```

## Observações

Difícil obtenção de perfil de espectros pelo VITEK MS (uso de ácido fórmico ou método alternativo de preparo de amostra).

## APÊNDICE L – Instrução de Trabalho (IT) n° 9081 para investigação de origens de contaminação utilizando a técnica de PFGE



### INSTRUÇÃO DE TRABALHO

TÍTULO: USO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO (PFGE) NO RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO

UO ELABORADORA:  
SEPIN

NÚMERO: 9081

#### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.

#### 2- OBJETIVOS

Descrever a metodologia da técnica de PFGE na avaliação das relações entre isolados microbianos envolvidos em contaminações de processo e/ou produtos nas UO de Bio-Manguinhos.

#### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a Seções de Esterilidade, Processos e Insumos - SEPIN do Laboratório de Controle de Microbiológico - LACOM.

#### 4- SIGLAS

DI	- Documento interno
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
LACOM	- Laboratório de Controle de Microbiológico
mL	- Mililitro
uL	- Microlitro
PFGE	- Eletroforese em Campo Pulsado ( <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> )
SEPIN	- Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
SKG	- <i>Agarose SeaKem Gold</i>
UO	- Unidade Organizacional

#### 5- REFERÊNCIAS

RIBOT, E.M. *et al.* Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.3, n.1, p. 59-67, 2006.  
 TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D.H. SWAMINATHAN, B. *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.* *Journal of Clinical Microbiology*, n. 33, p. 2233-2239, 1995.  
 TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. *How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists.* *Infection Control and Hospital Epidemiology*, n. 18, p. 426-439, 1997.  
 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

#### 6- DEFINIÇÕES

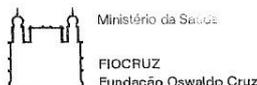
Não aplicável.

#### 7- PRÉ-REQUISITOS

##### 7.1- Material

- Luva descartável
- Alça bacteriológica descartável, de níquel cromo ou de platina
- Tubos estéreis de polipropileno de 15 e de 50 mL
- Termômetros para controle de temperaturas dos aparelhos

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
16/01/2015	16/01/2018	00	01/0



## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

**TÍTULO: USO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO (PFGE) NO RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO**

**UO ELABORADORA:  
SEPIN**

**NÚMERO: 9081**

### 1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.

### 2- OBJETIVOS

Descrever a metodologia da técnica de PFGE na avaliação das relações entre isolados microbianos envolvidos em contaminações de processo e/ou produtos nas UO de Bio-Manguinhos.

### 3- CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a Seções de Esterilidade, Processos e Insumos - SEPIN do Laboratório de Controle de Microbiológico - LACOM.

### 4- SIGLAS

DI	- Documento interno
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
LACOM	- Laboratório de Controle de Microbiológico
mL	- Mililitro
uL	- Microlitro
PFGE	- Eletroforese em Campo Pulsado ( <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> )
SEPIN	- Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
SKG	- <i>Agarose Seakem Gold</i>
UO	- Unidade Organizacional

### 5- REFERÊNCIAS

RIBOT, E.M. *et al.* Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.3, n.1, p. 59-67, 2006.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D.H. SWAMINATHAN, B. *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.* *Journal of Clinical Microbiology*, n. 33, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. *How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists.* *Infection Control and Hospital Epidemiology*, n. 18, p. 426-439, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

### 6- DEFINIÇÕES

Não aplicável.

### 7- PRÉ-REQUISITOS

#### 7.1- Material

- Luva descartável
- Alça bacteriológica descartável, de níquel cromo ou de platina
- Tubos estéreis de polipropileno de 15 e de 50 mL
- Termômetros para controle de temperaturas dos aparelhos

Data de Aprovação	Data de Validade	Revisão	Página
16/01/2015	16/01/2018	00	01/0

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

- Moldes para *plugs* (blocos) de agarose
- Molde para gel de PFGE
- Pentes para gel de PFGE (10, 15 ou 20 dentes)
- Micropipetas de 1000  $\mu$ L
- Micropipetas de 10-100  $\mu$ L
- Pipetador automático
- Pipetas descartáveis de 2 mL
- Ponteiras estéreis de 100  $\mu$ L e de 1000  $\mu$ L
- Toalhinhas descartáveis tipo *wipper*
- Tubo de microcentrifuga *Eppendorf*

### 7.2- Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica
- Agitador de tubos
- Banho-maria com agitação ou incubadora orbital com agitação
- Sistema de eletroforese CHEF MAPPER XA (ou CHEF DR III)
- Incinerador bacteriológico
- Transiluminador
- Incubadoras com temperatura de 32,5 +/- 2,5°C
- Aparelho de captura de imagens
- *DensiCheck*
- Refrigerador (temperatura de 2° a 8°C)

### 7.3- Meios de cultura e cultivos de amostras

- *Agarose Seakem Gold* (SKG)
- Amostras dos cultivos de interesse em Agar Tripticase de Soja (TSA), com tempo e temperatura de incubação específicos a cada gênero e previamente identificadas
- Caldo Tripticase de Soja (TSB)

### 7.4- Soluções, tampões, padrões, enzimas e reagentes

- Enzimas de restrição
- Tampão de Suspensão Celular (CSB)
- SDS a 1%
- Tampão de Lise Celular (CLB)
- Proteinase K
- Lisostafina
- Lisozima
- Tampão TRIS-EDTA (TE)
- Tampão TRIS-BORATO-EDTA (TBE)
- Brometo de Etídio
- Cepa de *Salmonella* son. Braenderup H9812 (ATCC BAA-664)
- Água purificada estéril

## 8- PROCEDIMENTOS

### 8.1- Preparo dos blocos (*plugs*) de agarose

Inocular, a partir de cada cultura a ser submetida a técnica de PFGE crescida em placas de TSA, um tubo estéril de polipropileno (capacidade de 15 mL) contendo dois mL de Tampão de Suspensão Celular (CSB). Para tal, utiliza uma alça bacteriológica previamente flambada e transferir uma quantidade de cultivo suficiente para obter uma suspensão de turvação aproximada a 0,5 da Escala de McFarland (de 0,48 a 0,52).

Transferir 400  $\mu$ L da suspensão e transferir para um tubo de micro centrifuga contendo 20  $\mu$ L de Proteinase K Homogeneizar delicadamente.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9081	Revisão 00	Página 02/06
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

Adicionar a suspensão 400  $\mu$ L de agarose Seakem Gold a 1% (previamente fundida e mantida a temperatura de 54-56 °C) ao tubo contendo a suspensão e homogeneizar delicadamente com a micropipeta, sugando e eliminando o conteúdo da ponteira por três vezes. Imediatamente após o último movimento de homogeneização, preencher o molde para os blocos (plugs) de agarose.

Deixar os blocos solidificarem dentro dos moldes a temperatura ambiente por 10 minutos ou em refrigerador por cinco minutos. Após a solidificação, remover os blocos do molde e transferi-los para um tubo de polipropileno (capacidade de 50 mL) contendo cinco mL de Tampão de Lise Celular (CLB). Incubar os tubos com os blocos em incubadora com agitação orbital (ECOTRON) por duas horas, em temperatura de 54°C, com velocidade de 150-175 RPM (RPM não é unidade de medida, mas eu não sei qual é o correspondente. Tem que pesquisar no SI).

Após o período de incubação, retirar da incubação e descartar o CLB. Rinsar rapidamente os blocos com 10 mL de água purificada estéril para remoção dos resíduos do tampão de lise celular.

Lavar os blocos com 15 mL de água estéril previamente aquecida a 50°C, em incubadora com agitação orbital (ECOTRON) a 50°C por 15 minutos. Repetir este procedimento mais uma vez.

Em seguida, lavar os blocos com 15 mL de tampão TE estéril previamente aquecido a 50°C, através do uso de incubadora com agitação orbital (ECOTRON) a 50°C por 15 minutos. Repetir este procedimento mais três vezes.

Após a última lavagem descrita no item anterior, desprezar o tampão. Adicionar cinco mL de tampão TE estéril a temperatura ambiente. A partir desta etapa, os blocos poderão ser estocados (neste tampão, em refrigerador) ou serem submetidos ao tratamento enzimático (item 8.2). Registrar todas as observações no caderno de dados.

### 8.2- Tratamento enzimático para fragmentação do cromossomo

Retirar três blocos de agarose de cada amostra e transferir para um tubo de micro centrífuga estéril (tipo *Eppendorf*) contendo 200  $\mu$ L solução tampão para a enzima de restrição desejada. Os blocos devem permanecer imersos na solução. Incubar a 37°C por 10 minutos. Realizar este mesmo procedimento para os blocos da cepa padrão de *S. Braenderup* (utilizar três plugs por gel a realizar).

Após o período de incubação, substituir a solução tampão por 200  $\mu$ L da solução da enzima de restrição (50 U por bloco: 150 U, então) e incubar a 37°C por duas horas.

Em seguida, substituir a solução da enzima de restrição por 200  $\mu$ L de solução TBE a 0,5X. Deixar os blocos saturando neste tampão por cinco minutos. Registrar todas as observações no caderno de dados.

### 8.3- Eletroforese em gel em campo pulsado

Colocar dois litros (2 L) de tampão TBE 0,5X na cuba do sistema de PFGE e ligar o aparelho. Ligar a bomba e *chiller* (unidade refrigeradora) do sistema e ajusta-lo a 14°C (ou a outra temperatura, dependendo do protocolo usado e do gênero bacteriano envolvido). Deixar o tampão circulando por 60 minutos;

Ajustar as condições de corrida, segunda a tabela abaixo:

Parâmetro	Valor
Tempo inicial ( <i>Initial Switch Time</i> )	2,16 segundos
Tempo final ( <i>Final Switch Time</i> )	63,8 segundos
Tempo de Corrida ( <i>Run Time</i> )	18-19 h
Gradiente de Voltagem	6 V/cm
Angulo	120°

Preparar um gel com SKG a 1% e colocar os blocos com a cepa padrão *S. Braenderup* no primeiro, no central e o último poço do gel. Colocar um bloco de cada amostra nos poços restantes. Registrar todas as observações no caderno de dados.

Selar os poços com SKG a 1%, mantida a 55-60°C.

UO Elaboradora  
SEPIN

Numero  
9081

Revisão  
00

Página  
03/06

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

Remover o excesso de líquido e de agarose no entorno do gel, utilizando uma toalhinha estéril (tipo *Wiper*).

Introduzir o gel na cuba do equipamento, tendo-se o cuidado de não deixar nenhuma bolha de ar entre. Apertar o botão *Start* para dar início a corrida eletroforetica.

Ao final do período estipulado para a corrida, desligar a unidade refrigeradora (*Chiller*), a bomba e a unidade principal.

### 8.4.- Aquisição de Imagem e análise do perfil de restrição

Retirar o gel da cuba e transferi-lo para um recipiente contendo solução de brometo de etídio (40 µg/mL). A quantidade de solução de brometo de etídio deve ser suficiente para cobrir o gel totalmente. Deixar por 20 minutos, sob agitação gentil.

Apos este período, descorar o gel. Para isso, desprezar a solução de brometo de etídio em bombona específica e adicionar um volume de água deionizada suficiente para cobrir o gel. Deixar por 20 minutos, sob gentil agitação. Repetir este procedimento por duas vezes.

Observar o gel em um transiluminador, sob luz Ultra-Violeta (UV), utilizando um óculos específico para tal comprimento de onda.

Em seguida, capturar a imagem digital gerada, através do equipamento. Salvar o arquivo e imprimir uma foto do gel. Registrar todas as observações no caderno de dados e colar a foto do gel no lugar correspondente no caderno.

### 8.5- Interpretação dos resultados

A análise da imagem obtida através do gel deverá ser analisada através do software BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) e usando os critérios determinados por Tenover *et al.* (1995).

TABLE 2. Criteria for interpreting PFGE patterns

Category	No. of genetic differences compared with outbreak strain	Typical no. of fragment differences compared with outbreak pattern	Epidemiologic interpretation
Indistinguishable	0	0	Isolate is part of the outbreak
Closely related	1	2-3	Isolate is probably part of the outbreak
Possibly related	2	4-6	Isolate is possibly part of the outbreak
Different	≥3	≥7	Isolate is not part of the outbreak

## 9- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS

SEPIN.

### 9.1- UO incluídas nesta revisão

Não aplicável.

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9081	Revisão 00	Página 04/06
-------------------------	----------------	---------------	-----------------

## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 9.2- UO excluídas nesta revisão

Não aplicável.

### 10- TREINAMENTO

Teórico e prático.

#### 10.1- Multiplicadores

Elaborador, verificador, aprovador e todos os treinados na revisão vigente deste DI e DI 1083 – Treinamento para Qualificação em Serviço.

### 11- ANEXOS

Não aplicável.

CÓPIA NÃO CONTROLADA

/ FOLHA DE APROVAÇÃO

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9081	Revisão 00	Página 05/06
-------------------------	----------------	---------------	-----------------



## INSTRUÇÃO DE TRABALHO

### 12- FOLHA DE APROVAÇÃO

	NOME	ASSINATURA
ELABORADO	Luciane Martins Medeiros	<u><i>Luciane Martins Medeiros</i></u>
VERIFICADO	Fernanda Ventura Cruz	<u><i>Fernanda Ventura Cruz</i></u>
CONFERIDO	Ricardo dos Santos de Oliveira	<u><i>Ricardo Oliveira</i></u>
APROVADO	Simone Cascardo Frota	<u><i>Simone Cascardo Frota</i></u>

CÓPIA NÃO CONTROLADA

UO Elaboradora SEPIN	Numero 9081	Revisão 00	Página 06/06
-------------------------	----------------	---------------	-----------------