

PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE

Juliana Marques Reis

**CONTROLE DA ESTABILIDADE DOS LOTES DE *Staphylococcus aureus* E
Pseudomonas aeruginosa DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA
EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA - CMRVS DO INCQS/FIOCRUZ**

Rio de Janeiro

2017

Juliana Marques Reis

**CONTROLE DA ESTABILIDADE DE LOTES DE *Staphylococcus aureus* E
Pseudomonas aeruginosa DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA
EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA - CMRVS DO INCQS/FIOCRUZ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito final para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Preceptora: Catia Aparecida Chaia de Miranda

Tutora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

2017

Juliana Marques Reis

**CONTROLE DA ESTABILIDADE DE LOTES DE *Staphylococcus aureus* E
Pseudomonas aeruginosa DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA
EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA – CMRVS DO INCQS/FIOCRUZ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito final para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Preceptora: Catia Aparecida Chaia de Miranda

Tutora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rafael Lawson Ferreira (Mestre)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Carla de Oliveira Rosas (Mestre)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar e iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, minha eterna gratidão pelo incentivo e apoio incondicional e a minha mãe em especial, agradeço por ter colocado a minha educação sempre como prioridade.

A minha avó Sonja (*in memoriam*), pelo exemplo de vida cristã, ternura e carinho compartilhado ao longo de sua vida.

A minha preceptora (Dra. Catia Chaia), agora minha grande amiga, agradeço imensamente por ter me aceitado como residente, certamente, ter sido sua aluna foi o maior legado dessa residência. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, confiança, e claro, pelas muitas risadas que demos ao longo desses dois anos. Sou sua fã número um.

A minha tutora (Dra. Maysa Mandetta), pela oportunidade, atenção e confiança.

Ao Dr. Ivano pelo suporte e gentileza em ajudar sempre que fosse preciso.

As minhas parceiras e amigas de laboratório: Aline, Talita, Jandira, Nathalia, Claudinha, Gisele, Nathércia, Suellen e Magno (nosso agregado), por terem tornado essa jornada mais leve, pelo apoio e incentivo, pela paciência e compreensão com minhas variações de humor e pelos momentos maravilhosos de alegria. Foi mais fácil encontrar o equilíbrio com a ajuda de vocês.

Aos meus amigos residentes, pela companhia sempre saudável. Que possamos mostrar nosso valor.

Aos membros da banca Rafael Lawson e Carla Rosas, por aceitarem o convite e se mostrarem sempre solícitos.

Aos amigos Andressa, Mayara, Rafael, Julia, Danielle, Henrique, Patricia, Marco, Guilherme, Pedro e Isabela obrigada por permanecerem na minha vida e por todos os momentos agradáveis que me proporcionaram. Amo vocês.

A todos do Laboratório de Hemostase e Câncer do Instituto de Bioquímica Médica, por terem me recebido ainda adolescente como membro do Projeto Jovens Talentosos, por terem compartilhado com paciência e maestria todo conhecimento sobre o assunto e ter guiado minha decisão em ser Farmacêutica.

A Luize e ao Prof. Leopoldo de Meis (*in memoriam*), idealizador e fundador do Projeto Jovens Talentosos, não seria o que sou hoje se não os tivesse conhecido. Obrigada por me proporcionarem a oportunidade de ser mais do que eu poderia ser.

RESUMO

Materiais de referência são definidos na ABNT ISO GUIA 30:2011 como materiais suficientemente homogêneos e estáveis com relação a uma ou mais propriedades específicas, estabelecidas, que justificam sua utilização numa medição ou exame qualitativo. São empregados para dar suporte a grandezas e a propriedades qualitativas e, quando certificados, podem ser utilizados no controle da precisão ou na avaliação de métodos de medição. Na área da microbiologia destacam-se os microrganismos de referência que podem ser utilizados no controle de qualidade de análises microbiológicas de produtos e insumos de saúde, como padrões em ensaios de identificação fenotípica e molecular de microrganismos, dentre outras atividades. Estes microrganismos são mantidos e fornecidos por coleções de cultura de referência, como a Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do INCQS - FIOCRUZ. Na CMRVS as cepas são preservadas, principalmente, pelo processo da liofilização que é um método de preservação capaz de manter a integridade da maioria dos microrganismos por períodos prolongados. Estas cepas são regularmente fornecidas para instituições públicas e privadas e assim, demandam a produção de novos lotes a partir de cepas originais. Os novos lotes devem ser produzidos e preservados sob rigoroso controle de qualidade, a fim de conservar a viabilidade e características bioquímicas, morfológicas e genéticas. Os procedimentos de preparo podem gerar contaminação microbiana e/ou alterações genéticas das culturas que inviabilizam um lote. O objetivo desse estudo foi avaliar onze lotes de *Staphylococcus aureus* INCQS00039 (ATCC 6538) e dez lotes de *Pseudomonas aeruginosa* INCQS00025 (ATCC 15442) em relação a viabilidade, pureza, identidade fenotípica e genotípica e autenticidade genética. A viabilidade foi determinada pelo método “Spread Plate” e a identidade fenotípica por provas bioquímicas convencionais e automatizadas (VITEK 2). A identificação genotípica e a autenticidade dos microrganismos de referência ocorreram através da utilização de métodos moleculares, dentre eles: a amplificação dos espaços entre os genes codificadores de tRNA pela PCR (tDNA-PCR), a amplificação dos espaços entre os genes 16S-23S do *operon* de rRNA (ITS-PCR) e entre as sequências consenso repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR). Dentre os 21 lotes das duas espécies analisadas, cinco não foram viáveis e dentre os lotes que apresentaram crescimento, a concentração de células variou de 10^{12} a 10^5 UFC/mL, sendo a maior queda de concentração apresentada por um lote de *P. aeruginosa*. A identificação automatizada apresentou variações bioquímicas entre o primeiro e o último lote das duas espécies

analisadas. Quatro lotes de *P. aeruginosa* apresentaram colônias com morfologias distintas. No entanto, tanto os lotes com perfis bioquímicos diferentes como aqueles contendo colônias com morfologias diferenciadas apresentaram perfis de bandas idênticos pela tDNA-PCR e ERIC-PCR, descartando a presença de contaminantes. Os resultados obtidos nos permitem concluir que os lotes não viáveis podem ter sofrido efeitos deletérios durante o processo de armazenamento e que as variações das atividades bioquímicas encontradas entre os lotes mais antigos e mais recentes alerta para a necessidade da verificação das características analisadas no estudo. Ainda assim, a maioria dos lotes produzidos pela CMRVS apresentaram condições satisfatórias em relação à identidade, viabilidade e pureza, o que reflete a qualidade do trabalho realizado pela mesma.

Palavras-Chave: microrganismos de referência, preservação, identificação

ABSTRACT

Reference materials are defined by ABNT ISO GUIA 30:2011 as materials sufficiently homogeneous and stable regarding to one or more specific properties, established, that justify the application in a measurement or qualitative exam. They are employed to give support to greatness and qualitative properties and when certificated, can be used in the control of precision or in validation of a measurement method. The highlights in microbiology are reference microorganisms, which can be used in quality control of microbiological analysis of healthy products and inputs, or as patterns in phenotypic and molecular identification assays of microorganisms, among other activities. These microorganisms are maintained and supplied by reference culture collections as the Reference Microorganisms Collection in Sanitary Surveillance (CMRVS) of INCQS – FIOCRUZ. At CMRVS the strains are mainly preserved by the freeze – drying process that is a preservation method able in keeping the integrity of most microorganisms for long periods. They are often supplied to public and private institutions what require the production of new batches from original strains. With this propose, the batches must be made and preserved under rigorous control so as to conserve the viability and the biochemical, morphological and genetics characteristics. The production can lead to microbial contamination and/or genetic changes of the cultures, what derail a batche. The aim of this study was evaluated eleven batches of *Staphylococcus aureus* INCQS 039 (ATCC 6538) and ten batches of *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 025 (ATCC 15442) in terms of viability, purity, phenotypic and genotypic identity and genetic authenticity. The viability was defined by the Spread Plate method and the phenotypic identity through conventional and automated biochemical (VITEK 2) tests. Genotypic identification and authenticity of reference microorganisms was done by molecular methods, in which: the amplification of spaces between the encoder genes of tRNA by PCR (tDNA PCR), amplification of spaces between 23S and 16S of rRNA operon (ITS-PCR) and between the enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC-PCR). Among the twenty-one batches of the two-species analyzed, five of them were not viable and among the batches that showed growth, the concentration of cells ranged of 10^{12} to 10^5 UFC/mL, and the lowest viability was showed by one batch of *P. aeruginosa*. Automated identification revealed variations between the first and the last batch produced of each specie analyzed. Four batches of *P. aeruginosa* exhibited two colonies with distinct morphology. However, both the lots with different biochemical profiles and those with colonies showing distinct morphology produced identical bands profiles by the tDNA-PCR and ERIC-PCR, eliminating the presence

of contamination. The results obtained allow us to conclude that: the batches not viable may have suffered negative effects during the storage, the range of the biochemical activity found between the older and newest batches alert to the necessity of verification in the characteristics analyzed in this study. Even so, most of the batches made by CMRVS revealed right conditions with respect to the identity, viability and purity, what reflects the quality of the work done in this place.

Key Words: reference microorganisms, preservation, identification

LISTA DE SIGLAS

CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
CRB	Centro de Recursos Biológicos
DM	Departamento de Microbiologia
EP	Ensaio de Proficiência
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
FB	Farmacopeia Brasileira
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LCCDM	Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos
LCCDMA	Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos
LMR	Laboratório de Microrganismos de Referência
mL	Mililitros
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMR	Produtores de Material de Referência
POP	Procedimento Operacional Padrão
SBA	Setor de Bactérias e Arqueias
seg	Segundos
SF	Setor de Fungos
SNVS	Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária

tDNA	DNA codificante de RNA transportador
TSA	Ágar Caseína-Soja
TSB	Caldo Caseína-Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA	13
1.2	PRODUÇÃO DE BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA	14
1.2.1	Preparo da Suspensão Bacteriana	15
1.2.2	Liofilização	16
1.2.3	Controle pré – liofilização	17
1.2.4	Controle pós – liofilização	18
1.3	REQUISITOS GERAIS À ACREDITAÇÃO DE PMR QUANTO AO CONTROLE DE QUALIDADE	19
1.4	MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA UTILIZADOS EM ENSAIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE	21
1.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	21
1.4.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.5	MÉTODOS MOLECULARES UTILIZADOS NA TIPIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA	23
1.5.1	t-DNA PCR	23
1.5.2	ITS-PCR	24
1.5.3	ERIC-PCR	25
1.5.4	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA	26
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	ABERTURA DE AMPOLAS	31
4.2	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	32
4.2.1	Provas Bioquímicas Convencionais	32
4.2.2	Sistema Automatizado de Identificação Fenotípica	35
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA	36
4.4	IDENTIFICAÇÃO E TIPIFICAÇÃO MOLECULAR	36
4.4.1	t-DNA PCR	36
4.4.2	ITS – PCR	37
4.4.3	ERIC-PCR	37

4.5 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA	38
5 RESULTADOS	39
5.1 TESTE DA MANUTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS	39
5.2 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	41
5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	43
5.4 TIPIFICAÇÃO MOLECULAR E INTEGRIDADE GENÔMICA	45
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

Em 1954 o presidente Getúlio Vargas aprovou a criação do Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM) que tinha como objetivos: analisar produtos de interesse à saúde pública, aprovar pedidos de licenciamento de novos produtos após análise prévia dos mesmos, favorecer o desenvolvimento técnico-científico da indústria farmacêutica do país, entre outros (BRASIL, 1954).

Em 1961 a análise de alimentos de interesse à saúde pública foi incorporada ao escopo de análises do LCCDM e seu nome, portanto, foi alterado para Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA) (BRASIL, 1961). Embora o LCCDMA estivesse situado dentro do campus da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), ele era administrativamente subordinado à Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS). Isto mudou após a publicação do Decreto 82.201 em 1978, determinando a transferência da administração para a FIOCRUZ, que a partir deste momento deveria trabalhar de forma articulada com a SNVS para assumir integralmente a gestão técnica, administrativa, orçamentária e financeira do laboratório.

Em um ato da Presidência da FIOCRUZ de nº 044 em 1981, o LCCDMA passou a ser denominado Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que foi ao longo dos anos recebendo novas atribuições, como a oferta de atividades de ensino e o controle de qualidade de serviços. Atualmente, atua diretamente na vigilância sanitária como laboratório de referência nacional para o controle da qualidade de produtos e serviços vinculados à Vigilância Sanitária, desempenhando importante papel na proteção da população contra as situações de risco e os fatores nocivos associados à produção e à comercialização de alimentos, medicamentos, cosméticos, saneantes, produtos biológicos, sangue e seus derivados, e outros de uso corrente.

1.1 COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A utilização de sistemas da qualidade em laboratórios fornece credibilidade aos mesmos por garantir a qualidade dos processos que ocorrem desde a amostragem até a liberação dos resultados de análises. A ABNT ISO/IEC 17025:2005 tem sido o sistema da qualidade mais reconhecido e utilizado em laboratórios de ensaios analíticos. Ela descreve os requisitos que os laboratórios de ensaio e de calibração devem atender para demonstrarem competência técnica e capacidade de produzir resultados precisos, confiáveis e rastreáveis. Um dos requisitos da norma é a utilização de materiais de referência para o controle interno das análises (ROSAS et al, 2010).

Segundo a ABNT ISO GUIA 30:2011, material de referência é um material ou substância suficientemente homogênea e estável em relação a uma ou mais propriedades específicas, estabelecidas, para serem utilizados em um processo de medição, ou atribuição de valores a materiais. Um material de referência (MR) deve ser empregado para dar suporte a grandezas e a propriedades qualitativas e pode ser adequado para ser utilizado no controle ou na avaliação de um método de medição, enquanto que o material de referência certificado (MRC) é um MR caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades específicas, acompanhado de um certificado que fornece valor das propriedades, a incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica.

Das normas ISO, especificamente na área de MR, a ABNT ISO GUIA 17034:2016 apresenta os requisitos gerais para as competências de Produtores de Materiais de Referência (PMR). Esta norma descreve as regras com as quais os MR devem ser produzidos, identificados, controlados e disponibilizados, seguindo na íntegra as orientações da norma ISO/IEC 17025:2005, na aplicação dos critérios técnicos. A norma também cita a necessidade de um planejamento de produção detalhadamente documentado e estabelece como requisitos técnicos de controle, a obrigatoriedade da verificação da homogeneidade e da estabilidade dos lotes de materiais produzidos.

De acordo com o Termo de Cooperação nº37 emitido pela ANVISA em parceria com o Ministério da Saúde (MS) e com a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), que trata do Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos, as cepas de referência devem possuir origem confiável e devem ser avaliadas por testes fenotípicos e moleculares que confirmem a sua identidade e o perfil de sensibilidade desses materiais. Este

mesmo termo orienta sobre o sistema da qualidade em laboratórios de análises microbiológicas e sobre o uso das cepas de referência que devem ser empregadas como controle interno de meios de cultura e testes de identificação e sensibilidade, sejam eles manuais ou automatizados.

Na Farmacopeia Brasileira (FB), compêndio oficial de metodologias de análise de insumos farmacêuticos, medicamentos e outros produtos sujeitos a vigilância sanitária, são definidas quais as cepas de referência que devem ser utilizadas nos ensaios microbiológicos de controle da qualidade de produtos.

A exigência do uso destes materiais no Brasil pode ter justificado o aumento da demanda, o que em conjunto com os altos custos e a morosidade nos trâmites de importação, incentivou o INCQS a definir como uma das suas estratégias o estabelecimento de uma Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) e a investir no seu desenvolvimento, buscando a autossuficiência nacional na produção e fornecimento dos mesmos.

Esta coleção possui representantes dos três domínios taxonômicos - Bacteria, Eucarya e Archaea - compreendendo atualmente 667 (69 gêneros), 266 (36 gêneros) e 34 (19 gêneros) linhagens de referência, respectivamente, totalizando 967 cepas de referência. Todas estas cepas são responsabilidade do Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR), composto por dois setores: Setor de Bactérias e Arqueias (SBA) e Setor de Fungos (SF), ambos alocados no Departamento de Microbiologia (DM) do INCQS. Os dois setores são operacionalmente independentes e possuem equipamentos e materiais próprios, como estufas, liofilizador, ultra-freezer e freezers (INCQS, 2015).

1.2 PRODUÇÃO DE BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA

A CMRVS adquire bactérias, arqueias e fungos de referência, principalmente, de três Coleções de Culturas Internacionais: ATCC (Estados Unidos), DSMZ (Alemanha) e NCTC (Inglaterra). Ao receber uma cepa, as ampolas matrizes são estocadas nas temperaturas indicadas pelas instituições até serem abertas para produção de sub-lotes destinados ao fornecimento. Este primeiro sub-lote é considerado a segunda passagem da bactéria e contém geralmente 40 ampolas como produto.

Após a produção do primeiro sub-lote (a partir de uma cepa original), lotes consecutivos são produzidos de maneira sequencial (um lote origina outro), exceto quando um lote apresenta alguma não conformidade, como ausência de viabilidade ou contaminação, neste caso, um novo lote pode ser produzido do anterior, ou seja, do penúltimo lote.

O processo de produção conta com basicamente duas etapas: preparo da suspensão bacteriana em ampolas e a liofilização.

1.2.1 Preparo da Suspensão Bacteriana

A produção de um lote ocorre através da hidratação da ampola, originária de uma coleção de referência ou de um dos sub-lotes produzidos pelo laboratório, com meio de cultura indicado pela instituição fornecedora. A suspensão formada é transferida para placas de Petri, com o meio de cultura indicado, de forma que seja formado um tapete de bactérias após 24 h ou 48 h de incubação em condições indicadas pela instituição fornecedora. Decorrido este tempo, um volume de “Skim Milk” a 10% (agente criopreservador) é adicionado em cada placa e o tapete de bactérias formado é suspenso nesta solução por meio da fricção de uma alça de Drigalski na superfície das placas. Esta suspensão bacteriana é então retirada e diluída em um tubo com “Skim Milk” 10%, para ser então, distribuída em ampolas de vidro estranguladas com auxílio de pipeta Pasteur de ponta longa e afilada. As ampolas contendo a suspensão em criopreservador são congeladas por meio de agitação em um banho de álcool absoluto e gelo seco por aproximadamente 40 segundos ou até que haja congelamento visível. Após este congelamento rápido elas são armazenadas a -70°C por no mínimo 24 h e liofilizadas.

A quantidade de placas utilizadas para se obter um crescimento confluyente de bactérias e o volume de “Skim Milk” empregado depende da quantidade de ampolas que se pretende produzir e não é um valor fixo.

O processo de fechamento das ampolas de vidro exige que a as mesmas sejam estranguladas, por este motivo, as pipetas Pasteur utilizadas no processo devem ser de ponta longa e afilada para que passem pela porção fina da ampola. Não há pipetas Pasteur graduadas e com estas características, logo, a distribuição da suspensão nas ampolas não é homogênea.

1.2.2 Liofilização

A liofilização, segundo Adams (2007) é um procedimento que possibilita a passagem de um produto líquido para o estado sólido sem o emprego de calor. Para isso, ele deve ser congelado e a água retida deve ser retirada por meio de sublimação. No caso de organismos vivos, é importante evitar a formação de cristais de gelo entre as membranas por meio de congelamento rápido, pois os cristais podem inviabilizar as células, levando a ruptura de estruturas vitais.

O processo de liofilização é composto por basicamente três fases: pré-congelamento, primeira secagem (sublimação a vácuo) e segunda secagem. No LMR a fase de pré-congelamento não é realizada no liofilizador, ela ocorre através do congelamento das ampolas em banho de gelo seco e álcool absoluto e posterior armazenamento à -70°C , apesar de haver modelos de liofilizador capazes de realizar todas as etapas do processo em um único equipamento. Na primeira secagem, o vácuo não causa por si só a sublimação da água, mas cria condições favoráveis para que aconteça, já que a sublimação na verdade só ocorre se o material congelado for aquecido ou, se for possível, absorver o calor do ambiente. Nesta etapa grande parte do material congelado é sublimado. Na segunda secagem o resíduo que não foi sublimado na primeira secagem é reduzido a um valor de mais ou menos 1% do produto. Ela pode ser realizada estendendo-se o tempo de liofilização ou transferindo o material para outro sistema com suprimento de calor reduzido, mas com vácuo mantido.

No LMR estas duas últimas fases são realizadas em um único equipamento liofilizador (Edwards e/ou Biotop) por meio da aplicação de vácuo, por no mínimo 18 h, na campânula onde são depositadas as ampolas, refrigerada a -50°C . Para que esta etapa seja bem sucedida a temperatura do condensador deve estar entre -45°C e -60°C e o vácuo, medido em unidades Torr, após algumas horas de liofilização deve atingir 10^{-1} Torr, valor suficiente para uma boa liofilização. Pequenas variações acima ou abaixo desta marca são admissíveis, mas qualquer indício de que o vácuo ideal não esteja sendo atingido, ou mais que 4 horas a 2×10^{-1} ou abaixo, é uma indicação de que pode estar havendo algum vazamento de vácuo em algum ponto do sistema, ou que o material está descongelando, ou ainda, que a quantidade de material a liofilizar é muito maior do que a capacidade do liofilizador. Outro indício de que o material está descongelando logo no início do ciclo, é o borbulhamento do mesmo, o que inviabiliza os microrganismos. Como a medida do vácuo é considerada essencial para o

monitoramento do processo, ela é registrada em intervalos regulares definidos por procedimento interno.

Após 18 a 24 horas, o material está completamente liofilizado e as ampolas podem ser retiradas do aparelho, mas como qualquer material liofilizado se torna altamente higroscópico com grande rapidez e bactérias liofilizadas em contato com oxigênio perdem a viabilidade rapidamente, é preciso que as ampolas sejam seladas sob vácuo. Por este motivo, as ampolas já liofilizadas são retiradas da campânula e colocadas uma a uma nas 52 saídas de tubos de borracha especial do "Manifold" e o vácuo é acionado novamente para atingir, desta vez em poucos minutos, pois não há mais água a ser retirada, o nível de 10^{-1} Torr, permitindo a selagem das ampolas com o auxílio de um maçarico.

A liofilização, apesar de ser amplamente utilizada, possui etapas que são capazes de gerar injúrias ou danos celulares, como alteração na permeabilidade da membrana celular, aumento da fase lag e necessidade de incremento nutricional. Procedimentos de estocagem influenciam na validade do produto liofilizado. Por isso, os que são armazenados em ampolas ou frascos devem ser acondicionados em ambientes de baixa umidade, ao abrigo de luz, oxigênio e contaminantes e sob baixa temperatura (SOLA et al, 2012).

1.2.3 Controle pré – liofilização

1.2.3.1 *Identidade*

A identidade da cepa a ser liofilizada é confirmada após o crescimento do microrganismo a partir da matriz no meio indicado pela instituição de origem. Os testes de identificação consistem em provas bioquímicas convencionais específicas para cada espécie, bem como testes sorológicos (KRIEG; HOLT, 1984; MAC FADDIN, 1985).

1.2.3.2 *Viabilidade e Pureza*

A viabilidade e a pureza são determinadas através da inoculação da suspensão em placa de ágar sangue de carneiro (DIFCO) a 37°C por no mínimo 48 h, para se detectar a presença de possíveis contaminantes na suspensão bacteriana da ampola retirada do lote em produção, antes do congelamento a -70°C.

1.2.4 Controle pós – liofilização

Após a liofilização, são realizados testes similares aos mencionadas nos testes de pré-liofilização (pureza e identidade) e testes de controle da qualidade da liofilização.

1.2.4.1 *Testes visuais*

O primeiro teste é realizado logo após a colocação das ampolas sob a campânula. O vácuo deve começar a subir lentamente e o material nas ampolas não deve descongelar e nem apresentar borbulhamento durante a ação do vácuo. Após 18-24 horas, as ampolas ao serem retiradas devem apresentar o líofilo sob a forma de pó, solto e com a mesma coloração da suspensão inicial, caso contrário, a liofilização pode ter sido ineficiente e a causa deve ser determinada.

1.2.4.2 *Testes de presença de vácuo*

Após o fechamento das ampolas sob vácuo, elas são submetidas uma a uma ao teste de presença de vácuo que é realizado com um aparelho Edwards, chamado "Spart Tester". Este aparelho é um leitor de vácuo ligado à corrente, que dispara uma carga elétrica de alta frequência sobre as ampolas liofilizadas indicando a presença ou não de vácuo. Esta carga

passa pelo interior da ampola e se choca com os gases que normalmente estão na mesma. Em uma ampola sem vácuo a quantidade de gases no interior da mesma é muito grande e por isso a carga elétrica não produz nenhuma mudança, mas quando há poucos gases livres na ampola, os elétrons dispersados pelo “Spart Tester”, se chocam com os gases produzindo uma coloração esverdeada ou azulada segundo o gás em maior quantidade.

Este teste garante que não há orifícios na ampola, que poderiam ter sido geradas durante o fechamento da mesma. Estes possíveis orifícios possibilitam a entrada de oxigênio, sendo altamente prejudicial à viabilidade e pureza da cepa. (ASHWOOD-SMITH; GRANT, 1976; DEWALD, 1966).

1.2.4.3 *Teste de umidade residual*

O teste de Karl Fischer é utilizado para detectar a umidade com ampolas contendo apenas a solução de “Skim Milk”, sem bactérias ou qualquer outro contaminante, e é realizado periodicamente ou sempre que há conserto ou revisão no liofilizador. Uma boa liofilização deve reduzir a umidade residual do líófilo para aproximadamente 3%.

1.3 REQUISITOS GERAIS À ACREDITAÇÃO DE PMR QUANTO AO CONTROLE DE QUALIDADE

Em 2012 foi emitido o guia ABNT ISO Guia 34 que trata dos requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência (PMR). No mesmo ano, foi aprovada a norma NIT DICLA 061, que estabelece os requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaio e dos produtores de materiais de referência dos Centros de Recursos Biológicos (CRB). Esta norma, específica para PMR biológicos, descreve que todos os requisitos obrigatórios devem ser conduzidos em consonância com a ABNT ISO/IEC 17025:2005.

Em 2015, entretanto, foi aprovada uma nova norma, a NIT DICLA 058, dispendo sobre a aplicação dos requisitos da ABNT ISO GUIA 34:2012 por todos os PMR e não somente por produtores de materiais de referência biológicos, como na NIT DICLA 061:2012. Esta nova norma também orienta que os laboratórios atuem em conformidade com

a ABNT ISO/IEC 17025:2005 e aborda de maneira mais ampla, visto que não trata somente de produtores de materiais de referência biológicos, a aplicação dos requisitos exigidos pela ABNT ISO GUIA 34:2012.

Dentre todos os requisitos abordados na NIT DICLA 58:2015, pontuam – se: o treinamento da equipe em todos os procedimentos envolvidos com a produção de materiais de referência e a avaliação crítica do mesmo a cada ano; a participação do próprio laboratório ou de seu subcontratado em ensaios de proficiência (EP) ou comparações interlaboratoriais; a conformidade de instalações e equipamentos, do laboratório ou da subcontratada, às normas de biossegurança em todos os níveis de atividade (manipulação, estudo de homogeneidade, estabilidade ou caracterização) e o controle de documento e informação.

Quanto ao manuseio e estocagem do material e aos métodos de medição, o PMR deve: documentar e implementar procedimentos para o recebimento e armazenamento adequados ao tipo de material biológico manipulado, incluindo um programa de controle periódico do material preservado; realizar ensaios de autenticação e verificar a estabilidade de algumas características chave, as condições de crescimento, e os métodos de manutenção e/ou preservação apropriados ao material biológico mantido, usando tecnologia adequada; quando possível, confirmar a identidade do material biológico após seu recebimento, por pessoa competente; utilizar métodos de preservação e manutenção que garantam alta viabilidade/recuperação, ausência de contaminantes e autenticidade da cultura preservada, bem como a integridade do genoma (análises fenotípica e molecular), quando aplicável (NIT DICLA 58:2015).

Considerando essas medidas, no que concerne aos ensaios de autenticação e estabilidade de características chave, não há definição da técnica a ser empregada e nem a indicação ou a definição das características chave pela norma.

Quanto ao item que trata do método de preservação, a alta viabilidade pode ser determinada por meio da técnica de contagem em placa e a pureza e integridade do genoma podem ser analisadas por técnicas de tipificação.

1.4 MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA UTILIZADOS EM ENSAIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Em microbiologia os materiais de referência são os microrganismos, definidos como culturas de referência ou bactérias de referências. O uso de MR é indicado em diversos documentos normativos, como: a ABNT ISO/IEC 17025:2005, a FB e o Termo de Cooperação nº 37 ANVISA/OPAS.

Como a CMRVS conta com centenas de linhagens de bactérias, neste estudo, foram escolhidas duas espécies diferentes, uma Gram positiva e uma Gram negativa: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias preconizadas pela FB para utilização em controle de qualidade de produtos não estéreis e estéreis, e pela legislação de saneantes (BRASIL, 2010) para avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes de alto nível e desinfetantes de nível intermediário. As cepas *S. aureus* ATCC 6538 (INCQS 039) e *P. aeruginosa* ATCC 15442 (INCQS 025) foram escolhidas para o estudo por serem empregadas nas análises de controle de qualidade do laboratório de saneantes do Departamento de Microbiologia e, no caso do *S. aureus*, por ser indicada também pela FB para outros testes microbiológicos.

1.4.1 *Staphylococcus aureus*

Bactéria presente na microbiota da pele e em mucosas estando estritamente relacionada a infecções tóxicas e feridas hospitalares devido ao uso de dispositivos médicos invasivos como cateteres e marcadores. Forma colônias lisas e amareladas quando cultivadas a temperatura ambiente (entre 30°C e 37°C) e é morfológicamente visualizada como cocos Gram positivos por microscopia óptica. Possuem cápsulas e habilidade de formar biofilmes, sendo hábil para crescer em ambientes aeróbios ou anaeróbios e em altas concentrações de sais. Esta característica halofílica permite selecionar e diferenciar a bactéria quando incubada em ágar manitol-salgado, pois além de sobreviver em alta concentração de sal, é capaz de utilizar o manitol como fonte energética (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

É uma bactéria produtora de catalase (enzima que quebra peróxido de hidrogênio em água e oxigênio) e coagulase (enzima que se liga à uma proteína do soro ativadora de fibrinogênio gerando fibrina). Seu crescimento ocorre facilmente em qualquer meio não seletivo e é capaz de lisar completamente as hemácias presentes em meio ágar sangue, formando colônias beta-hemolíticas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

1.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

É o pseudomonídeo mais frequentemente isolado de amostras clínicas e associado a infecções hospitalares, principalmente as que acometem o trato respiratório inferior. As infecções são geralmente observadas em locais que tendem a acumular umidade: traqueostomias, cateteres permanentes, queimaduras, ouvido externo e feridas cutâneas exsudativas (KONEMAN et al, 2001).

Este microrganismo caracteriza-se como bastonete Gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríqueo (POLLACK, 1995). A pioverdina e a piocianina são pigmentos fluorescentes difusíveis no meio de cultura produzidos por este microrganismo. A pioverdina pode ser produzida também por outras espécies de *Pseudomonas*, mas somente a *P. aeruginosa* é capaz de produzir piocianina.

Para a classificação da espécie, devem ser consideradas algumas características metabólicas. *P. aeruginosa* não é capaz de fermentar carboidratos; é um bastonete móvel, não produtor de indol e H₂S; produz citocromo-oxidase e arginina dehidrolase e utiliza citrato como única fonte de carbono (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

1.5 MÉTODOS MOLECULARES UTILIZADOS NA TIPIIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA

Tipificações baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) são ensaios moleculares rápidos e baratos, como as técnicas: tDNA-PCR (WELSH; MCCLELLAND, 1991), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - PCR (ERIC-PCR) (VERSALOVICK, 1991), ITS-PCR (JENSEN; WEBSTER; STRAUS, 1993) e *Random Amplified Polymorphic DNA* - PCR (RAPD-PCR) (WILSON; SHARP, 2006) e podem ser utilizadas na análise da diversidade genética de diferentes microrganismos tanto no nível inter e intraespecífico.

1.5.1 t-DNA PCR

Genes de tRNA ocorrem em múltiplas cópias ao longo do genoma bacteriano e em alguns casos, podem estar localizados dentro de operons. Em *Escherichia coli*, por exemplo, estima-se haver em torno de 100 genes de tRNA, dos quais 30 já foram sequenciados. O sequenciamento e mapeamento destes genes permitiu o desenvolvimento dos primers T3A, T5A e T5B por Welsh e McClelland (1991), mas devido à grande variabilidade das sequências codificadoras de tRNA entre espécies e aminoácidos, é pouco provável que um primer consenso universal seja desenvolvido. Estes primers, fazem um pareamento perfeito, pelo menos, com cinco bases entre o seu terminal 3' com as sequências dos genes de tRNA (Fig. 1).

Figura 1- T5A consenso x genes de tRNA de Bacillus

Ala	-	-	-	-	-	C	-	-	-	G	*	-	-	-	-	G	-	T	-	C	-	-				
Arg	-	-	-	-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	-	-	G	T	T	T	C	-	-				
Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	T	C	-	G	-				
Asp	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	G	-	T	-	C	-				
Cys	-	-	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	-	G	A	-	-	-				
Glu	-	-	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	-	A	-	-	-	-				
Glu	T	G	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	A	-	-	C	C	-				
Gly	-	T	-	y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	A	-	m	y	-	A	s				
His	-	-	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	A	C	T				
Ile	-	-	-	-	-	y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r	s	A	C	-	S				
Leu	T	y	G	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	C	R	-	r	-	W	-	-				
Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T	-				
Met	-	-	-	-	-	y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r	K	A	C	-	G				
Met	-	A	G	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	G	T	-	G				
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-				
Pro	-	-	-	-	-	C	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	G				
Ser	Y	y	C	R	-	-	-	-	-	Yy	G	-	A	G	-	G	G	-	X	C	-	x				
Thr	-	-	-	-	-	R	y	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	Y	T	s				
Trp	-	T	-	T	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	G	A	-				
Tyr	-	-	G	A	-	-	-	-	-	-	C	-	A	-	A	C	-	-	G	G	-	-				
Val	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T	-				
Consensus:	5'	G	C	T	C	A	G	T	T	G	G	T	A	G	A	G	C	A	C	C	G	G	A	C	T	3'
Primer:	3'	G	A	G	T	C	A	A	C	C	A	A	T	C	T	C	G	T	G	G	C	C	T	G	A	5'

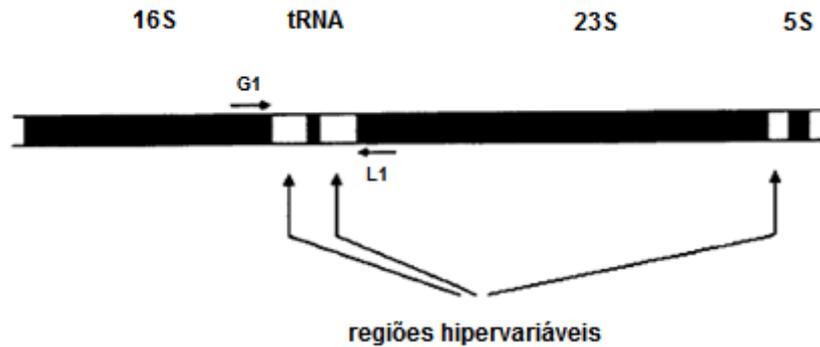
Fonte: WELSH; MCCLELLAND, 1990. Figura representativa da obtenção de sequência consenso e primer de tDNA-PCR, onde - = pareamento, * = faltando base.

Considerando que há mais de cem genes diferentes de tRNA no genoma, é provável que haja pareamento do primer em pelo menos parte destes genes. Como eles tendem a estar agrupados, a amplificação dos espaços entre eles reproduz fragmentos de DNA de diferentes tamanhos de acordo com a espécie. A habilidade da técnica em diferenciar espécies, mas não polimorfismos intraespecíficos, é justificada pelo fato de a organização destes clusters mudar de forma relativamente lenta (WELSH; MCCLELLAND, 1990; CLEMENTINO et al, 2001).

1.5.2 ITS-PCR

Em organismos procarióticos, o operon de rRNA contém os genes para as três subunidades do rRNA: 16S, 23S e 5S. Estes genes são separados por regiões espaçadoras que variam quanto à sequência e comprimento de acordo com o gênero e/ou espécie. Esta variação pode ocorrer devido a alterações no tamanho das sequências dos genes de tRNA e por outros genes e sequências não codificantes, geralmente relacionadas a eventos de inserção-deleção, encontrados nestes espaços. A reação de PCR amplifica a sequência entre os genes 16S e 23S do operon de rRNA (Fig. 2), gerando fragmentos de diferentes tamanhos de acordo com a linhagem ou espécie, e por isso tem sido utilizada em análises intraespecíficas, ou seja, entre linhagens de uma única espécie (JENSEN; WEBSTER; STRAUS, 1993; CLEMENTINO et al, 2001).

Figura 2 - operon de rRNA e espaço intergênico (ITS)



Fonte: Adaptado de JENSEN, 1993. Representação do operon de rRNA mostrando os sítios de ligação dos primers L1 e G1 na amplificação pela PCR.

1.5.3 ERIC-PCR

A família de elementos repetitivos chamada *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) é um palíndromo imperfeito de 127 pb que ocorre em múltiplas cópias no genoma de bactérias entéricas e víbrios e pode servir como iniciadores para a amplificação do DNA genômico (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Essas regiões localizadas entre os elementos ERIC variam de tamanho entre as cepas, gerando perfis de bandas únicos e característicos quando separados por eletroforese em géis de agarose (COSTA et al, 2006).

Versalovic e colaboradores (1991) propuseram inicialmente essa metodologia para tipificação de genomas bacterianos como os de *Pseudomonas aeruginosa*. Atualmente, o uso desta técnica na tipificação desta espécie já é bem estabelecido, fornecendo resultados reprodutíveis de forma rápida e eficiente (SILBERT et al, 2004; INACIO et al, 2014).

A ERIC-PCR também vem se mostrando útil em estudos epidemiológicos de isolados de *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*, o que permite o rastreamento de cepas epidêmicas durante surtos, bem como a caracterização clonal de diferentes espécies de enterobactérias e o estudo da relação genética entre isolados (ABREU et al, 2014; COSTA et al, 2006).

Embora haja estudos que mostrem a eficácia da ERIC-PCR na diferenciação de isolados através do perfil de bandas linhagem específica, também há estudos em que não é possível demonstrar esta especificidade (MILLEMANN et al, 1996).

1.5.4 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Estudos de diversidade genética e relações filogenéticas entre espécies vegetais e entre isolados bacterianos de amostras clínicas e ambientais têm sido amplamente empregados após o advento de técnicas de biologia molecular que são capazes de detectar polimorfismos moleculares, como o “Random Amplified Polymorphism DNA” (RAPD), o “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) e o “Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLP). Através do perfil de bandas gerado por estas técnicas, é possível determinar a similaridade entre os perfis de bandas obtidos do DNA das amostras. Cada perfil fornece uma matriz de valores binários, em que cada coluna representa um genótipo e as linhas de cada coluna representam os fragmentos de DNA. Analisando-se a distância e a ausência de bandas entre os diferentes genótipos é possível determinar a similaridade entre eles (MEYER, 2002; CARVALHO, 2012).

Os coeficientes de similaridade ou dissimilaridade comparam o número de atributos comuns para um par de objetos e o número total de atributos envolvidos, ou seja, avalia a presença de bandas nos diferentes genótipos, comparando com um padrão de bandas definido pelo analista ou automaticamente pelo computador. Os coeficientes de similaridade podem ser divididos entre os que consideram a ausência conjunta de banda e os que não consideram a ausência conjunta de banda. Dentre os que consideram a ausência conjunta de banda, destacam-se os coeficientes de Sorensen-Dice e Jaccard (MEYER, 2002). O coeficiente de Dice é o recomendado nos estudos que utilizam a técnica de RFLP e “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) (VAN BELKUM et al, 2007).

O agrupamento dos perfis de bandas pode ser obtido por técnicas que produzem dendrogramas ou por técnicas que envolvem partições. O dendrograma (diagrama bidimensional em forma de árvore) pode ser considerado a representação simplificada da matriz de dissimilaridade. Para obter um é necessário calcular as medidas de similaridade, após escolha de um coeficiente de similaridade adequado, entre todos os pares possíveis de genótipos e, assim, utilizar uma técnica de formação de grupos (SILVA, 2012).

Há diversas técnicas ou algoritmos disponíveis na literatura para a análise por agrupamento. Elas diferem entre si pelo tipo de resultado e pelas diferentes formas de definir a proximidade entre bandas e entre os grupos formados, portanto, a escolha do método depende do material e da finalidade do estudo, visto que métodos diferentes podem gerar resultados distintos. Nos estudos de diversidade genética, o método da ligação média entre

grupos (UPGMA) é o mais utilizado, por considerar médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, o que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre os indivíduos considerados (SILVA, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Bactérias de referência preconizadas por compêndios oficiais, normalmente são preservadas através de liofilização e armazenadas sob refrigeração. Tendo em vista que o processo de liofilização pode gerar injúrias celulares capazes de inviabilizar a célula e que bactérias liofilizadas armazenadas sob refrigeração perdem gradualmente sua viabilidade ao longo dos anos, a aplicação de um estudo retrospectivo de lotes de culturas de referência produzidos por coleção mostra-se útil na identificação de pontos de melhorias em seu processo produtivo.

Para garantir a qualidade dos lotes produzidos, quanto a autenticidade das cepas, é necessário a utilização de métodos mais sensíveis e apurados na identificação, certificação e tipificação através de métodos moleculares.

A realização deste estudo foi fundamentada nas legislações vigentes no Brasil e visou avaliar a viabilidade de bactérias de referência por meio da técnica de diluição seriada e contagem em placa, a autenticidade por meio da identificação automatizada e molecular (VITEK e tDNA-PCR), a estabilidade de características fenotípicas por meio de provas bioquímicas convencionais e automatizadas (VITEK) e a integridade genômica por técnicas de tipificação (ITS e ERIC-PCR).

Com base nos resultados obtidos, acreditamos que a utilização de tais metodologias, no controle dos lotes produzidos, nos permitirá uma melhor avaliação da viabilidade e autenticidade das cepas de referência fornecidas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária do INCQS/FIOCRUZ.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a manutenção da concentração bacteriana, a identidade e autenticidade genética de lotes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a pureza e a viabilidade por esgotamento em meio sólido;
- Determinar a manutenção da concentração celular pelo método de contagem em placa;
- Identificar as cepas por testes fenotípicos;
- Tipificar as cepas por métodos moleculares;
- Propor uma metodologia alternativa de quantificação de células viáveis com base em pesquisa bibliográfica.

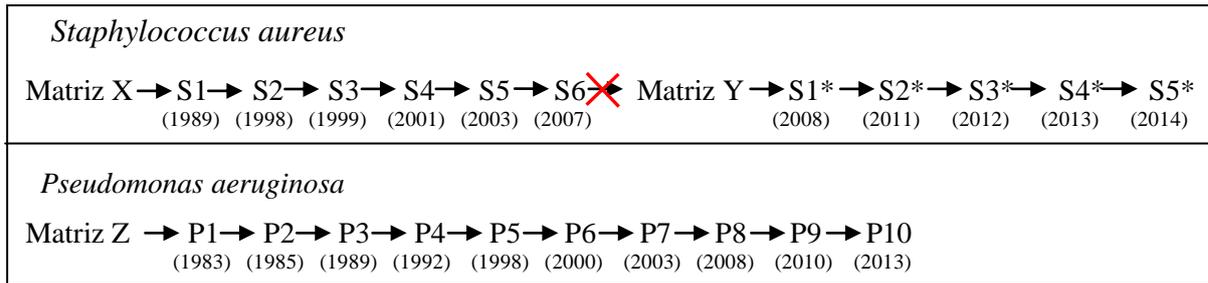
4 METODOLOGIA

Para definir os lotes a serem estudados analisamos a ficha cadastral de cada cepa, desde a implementação do processo de produção, até o mês de maio de 2015. Nesta pesquisa foi observado que a produção de bactérias de referência teve basicamente dois momentos: o antes e o depois da implantação do sistema da qualidade no INCQS, visto que depois disso tornou-se compulsório o registro de informações relacionadas à produção de um lote, como o lote de origem, meio de cultura empregado, resultados dos controles de qualidade e quantidade de ampolas produzidas. Somente os registros posteriores ao ano de 2004 possuem informações completas sobre a produção dos lotes de bactérias de referência. Desta forma, não foi possível determinar com segurança a procedência ou a sequência de produção dos lotes, visto que um lote do ano 2000 pode não ter sido originado do único lote produzido antes dele e sim de um lote mais antigo.

Como não foi possível definir essa sequência de produção até um determinado momento, optou-se por nomear os lotes de acordo com o ano em que foram produzidos, sendo o lote mais antigo a ser estudado da cepa INCQS 039 de *S. aureus* do ano de 1989 e o da cepa INCQS 025 de *P. aeruginosa* do ano de 1983.

Conforme figura 3, os lotes de *S. aureus* foram então definidos como S1, S2, S3, S4, S5 e S6, ou seja, teoricamente, quando a ampola de *S. aureus* foi recebida da coleção de referência internacional em 1989 (matriz X), foi produzido o lote S1 a partir dela, e do lote S1 foi produzido o lote S2, e assim sucessivamente. Em 2008, entretanto, houve a introdução de uma nova matriz ATCC de *S. aureus* (matriz Y), gerando o lote S1*, e dele o lote S2*, e deste o S3*, até o lote S5*, de 2014, o que resultou em um total de 11 amostras.

A codificação dos lotes de *P. aeruginosa* seguiu o mesmo princípio adotado com os lotes de *S. aureus*, mas todos eles foram originados somente de uma matriz, adquirida em 1983 (matriz Z), sendo o último lote analisado (P10) do ano de 2013, totalizando 10 amostras.

Figura 3 - Amostragem das Cepas de Referência

Fonte: (o autor)

Somente uma ampola de cada lote pôde ser utilizada porque foram retiradas do estoque da memória. Este estoque tem sido mantido por um período prolongado a aproximadamente -15°C para ser utilizado sempre que houver alguma reclamação de não conformidade pelo laboratório solicitante e contém somente cinco ampolas de cada lote produzido pelo laboratório.

4.1 ABERTURA DE AMPOLAS

Conforme anexo G do Procedimento Operacional Padrão (POP) do Setor de Bacterias e Arqueas (POP 65.3230.006), cada ampola foi aberta com auxílio de um cortador de vidro; quebrada na parte superior, no local serrado, com a proteção de uma gaze estéril umedecida com álcool 70%; a parte superior fragmentada foi retirada e o líófilo foi reconstituído pelo meio de cultura recomendado pela coleção de origem.

A ampola quebrada foi envolta na mesma gaze utilizada para sua quebra e em papel alumínio e posteriormente descartada em recipiente próprio ao descarte de material perfuro cortante.

A reconstituição do líófilo foi realizada com 1 mL de caldo caseína-soja (TSB) e este volume foi então transferido para 9 mL do mesmo meio de cultura, suspensão mãe. Desta suspensão, 1 mL foi transferido para um novo tubo com 9 mL de TSB (diluição 1:10), e deste tubo para um novo tubo com 9 mL de TSB (diluição 1:100), de forma sucessiva como diluições decimais até a diluição 1:10⁹. De cada tubo da diluição seriada foi transferido, em duplicata, 0,1 mL de suspensão para placas distintas de ágar caseína-soja (TSA), o volume foi espalhado na superfície da placa com auxílio de alça de Drigalski, técnica de “Spread Plate”, e as placas foram incubadas a 36°C por 24 h. Para a contagem foram selecionadas as placas que

continham de 30 a 300 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e a média da contagem foi expressa em UFC/mL, considerando-se o volume de 0,1 mL cultivado em placa e o fator de diluição utilizado.

De acordo com a 5ª edição da FB, um produto hidrossolúvel pode ser diluído em solução tampão cloreto de sódio - peptona ou solução tampão fosfato, mas o caldo TSB foi escolhido como diluente por ser o meio indicado, pelos informes destas bactérias, para a reconstituição dos líofilos.

Da suspensão mãe, uma placa de ágar sangue e uma de TSA foram cultivadas por técnica de esgotamento para verificação de pureza e obtenção de colônias isoladas, respectivamente, após incubação a 36°C por 24 h. As colônias isoladas na placa de TSA após incubação foram usadas na realização das provas bioquímicas convencionais, na coloração de Gram, na extração de DNA e na produção de criotubos.

4.2 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

4.2.1 Provas Bioquímicas Convencionais

Os testes bioquímicos para identificação de *S. aureus* foram efetuados com base na produção de catalase, da enzima coagulase e da utilização do manitol. Para a identificação de *P. aeruginosa*, os testes se basearam: na utilização do citrato como única fonte de carbono; na mobilidade, ausência da produção de indol e de sulfeto de hidrogênio no meio SIM; na presença de citocromo oxidase e no metabolismo oxidativo sobre a glicose (KRIEG; HOLT, 1984). Todos estes ensaios ocorreram utilizando-se cultura pura de 24 h de incubação.

4.2.1.1 Prova da catalase

O centro de uma colônia foi retirado da placa de TSA com alça bacteriológica e transferido para uma lâmina de vidro limpa. Uma gota de H₂O₂ a 30% foi aplicada na lâmina

com auxílio de pipeta Pasteur e a formação de bolhas foi observada, indicando a capacidade da bactéria em converter o H_2O_2 em água e oxigênio, característico de resultado positivo.

4.2.1.2 *Prova da coagulase*

Uma gota de salina fisiológica (0,85% de NaCl) estéril foi aplicada em uma lâmina de vidro limpa e o centro de uma colônia da placa de TSA foi emulsificada na gota de salina; uma alça pequena do plasma de cavalo foi misturada vagarosamente na suspensão e a formação imediata de um precipitado macroscópico sob a forma de grumos brancos foi observada. A reação positiva ocorre entre 5 a 20 seg. Um controle positivo e um negativo foram também utilizados na mesma lâmina e o teste realizado simultaneamente.

4.2.1.3 *Prova de utilização do manitol*

A prova consistiu em cultivar por técnica de esgotamento uma alça de cultivo bacteriano em ágar manitol. Foi observado o crescimento de culturas de coloração amarela neste meio após incubação a 36°C por 24 h, indicando a existência de bactérias halófilas e capazes de fermentar manitol.

4.2.1.4 *Prova do citrato*

Uma colônia bacteriana foi retirada da placa de TSA e inoculada como uma única estria na superfície do ágar citrato de Simmons inclinado. O crescimento com intensa coloração azulada do meio (antes verde) indicou que a bactéria foi capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono, logo, o resultado foi considerado como positivo.

4.2.1.5 *Teste do SIM*

O meio de cultivo empregado neste teste é semi-sólido, para que seja possível haver a difusão das bactérias móveis.

Para o teste de motilidade, uma colônia isolada foi inoculada em uma única picada no meio, utilizando-se a agulha de platina estéril. O cultivo foi então incubado a 37°C por 24 h e a presença de um crescimento difuso ou turbidez em torno da linha de inoculação e a partir dela indicou que a bactéria possui motilidade.

Para o teste do indol, gotas do reagente de Kovacs foram adicionadas neste tubo após as 24 h de incubação. Como o meio SIM contém aminoácidos como o triptofano, bactérias produtoras da enzima triptofanase são capazes de degradar este aminoácido gerando indol, ácido pirúvico e amônia. Este indol produzido reage com o p-dimetilaminobenzaldeído presente nos reativos de Ehrlich ou de Kovacs formando a coloração vermelha na superfície do meio. Desta forma, a coloração vermelha gerada no teste, indicou a presença de bactéria produtora de indol.

No teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), observou-se a presença de precipitado negro ao longo da linha de inoculação. Este precipitado se forma sempre que a bactéria é capaz de reduzir o enxofre orgânico ou inorgânico presente no meio SIM a sulfeto de hidrogênio. Este composto, quando formado, reage com o sulfato ferroso amoniacal, também presente no meio, produzindo sulfureto de ferro que é um precipitado negro e insolúvel. Logo, a ausência deste precipitado no meio indicou inabilidade da bactéria em produzir H₂S.

4.2.1.6 *Teste da oxidase*

Uma tira de papel foi colocada em uma placa de petri e umedecida com o reagente dicloridrato de tetrametil – p – fenilodiamina a 1%. Uma alçada da massa bacteriana foi então transferida para a tira utilizando alça de platina (a de níquel-cromo não pode ser usada por fornecer resultado falso-positivo). O desenvolvimento de cor púrpura foi observado alguns segundos após fricção da colônia em tira de papel, pois bactérias oxidase positivas produzem esta cor no local da inoculação.

4.2.1.7 *Teste de utilização da glicose*

Uma porção da colônia isolada foi inoculada com agulha de platina em dois tubos com meio OF (Hugh e Leifson) contendo 1% de glicose de forma que atingisse a altura de $\frac{1}{4}$ do fundo do tubo. Em um dos tubos foi adicionado três gotas de óleo mineral estéril após a inoculação. Os dois tubos foram incubados a 35°C por 24 h.

Este teste baseia-se na produção de ácido quando a glicose é metabolizada, portanto permite determinar o uso da via oxidativa ou fermentativa da glicose de acordo com o tubo em que ocorre a mudança de cor após incubação. A presença de acidificação do meio, evidenciada pela cor amarela do mesmo, no tubo contendo óleo mineral indica que a bactéria metaboliza glicose de maneira fermentativa. Quando isto ocorre no tubo que não contém o óleo mineral, indica que ela tem metabolismo oxidativo e quando ocorre nos dois tubos, indica que ela é capaz de realizar metabolismo oxidativo e/ou fermentativo.

4.2.2 Sistema Automatizado de Identificação Fenotípica

Duas amostras, uma do lote mais antigo e uma do lote mais recente, de cada bactéria foram identificadas através do Sistema Automatizado VITEK2, utilizando os cartões GP Test Kit VTK 2 (Gram-positivas) e os cartões GN Test Kit VTK 2 (Gram-negativas) de acordo com instruções do fabricante (BioMerieux). Neste sistema, foi necessário preparar uma suspensão bacteriana de turvação entre 0,5 e 0,63 na escala Mac Farland para que não houvesse interferência nas provas bioquímicas que ocorreram nos cartões onde a suspensão foi inserida. Esta suspensão foi obtida através da verificação da turvação por um densímetro Densicheck® (BioMerieux).

Esses cartões foram inoculados automaticamente por um sistema à vácuo, e posteriormente, inseridos no módulo de incubação e leitura, submetidos a uma medida cinética fluorescente a cada 15 minutos. Os resultados foram armazenados através de um sistema computadorizado, o qual ao final da análise emitiu um relatório referente aos testes bioquímicos, descrevendo o gênero e espécie do microrganismo identificado, tempo de análise, e quando necessário, sugeriu outras provas bioquímicas.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o protocolo para bactérias Gram positivas e Gram negativas do kit Dnaeasy®Blood&Tissuet (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante.

4.4 IDENTIFICAÇÃO E TIPIFICAÇÃO MOLECULAR

Após abertura de todas as ampolas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, o DNA extraído da amostra de cada lote foi analisado por: t-DNA PCR (análise interespecífica), ITS-PCR e ERIC-PCR (análises intraespecíficas) para determinar a diversidade genética desses lotes.

4.4.1 t-DNA PCR

A PCR foi realizada utilizando-se os primers consenso T5A (5'-AGTCCGGTGCTCTAACCAACTGAG-3') e T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCGAATCC-3') descritos por Welsh e McClelland em 1991. As reações de amplificação foram preparadas com 50% (v/v) de Master Mix (Promega®), 50 pmol de cada primer, 2 µL de DNA e água MilliQ estéril suficiente para completar o volume de 25 µL de reação por tubo.

As amplificações foram realizadas em termociclador Applied® da ThermoFisher Scientific, programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de amplificação e uma extensão final a 72°C por 10 min. Cada ciclo conteve as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 50°C por 30 seg e extensão a 72°C por 2 min.

Um volume de 10 µL dos produtos da PCR e um padrão de peso molecular de 100 pb foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), a 60 V por 5 h em um tampão de tris/borato/EDTA 0,5 X (pH 8,0). Os fragmentos foram marcados para revelação com o agente intercalante Gel Red™ (de acordo com instruções do fabricante) e foram visualizados em sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

4.4.2 ITS – PCR

Antes de proceder a análise de todas as amostras, a especificidade da PCR foi analisada empregando-se amostra de DNA de duas cepas distintas para cada espécie de bactéria: cepas INCQS 00089 e INCQS 00230 de *S. aureus* e cepas INCQS 00099 e INCQS 00250 de *P. aeruginosa*.

A PCR foi realizada empregando-se os primers L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') e G1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3'), descritos por Jensen e colaboradores (1993). As reações de amplificação foram preparadas com 50% (v/v) de Master Mix (Promega®), 50 pmol de cada primer, 2 µL de DNA e água milliQ estéril suficiente para completar o volume de 25 µL de reação por tubo.

As amplificações foram realizadas em termociclador Applied® da ThermoFisher Scientific, programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida de 25 ciclos de amplificação e uma extensão adicional a 72°C por 7 min. Cada ciclo conteve as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 7 min e extensão a 72°C por 2 min.

Um volume de 10 µL dos produtos da PCR e um padrão de peso molecular de 100 pb foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), a 60 V por 5 h em um tampão de tris/borato/EDTA 0,5X (pH 8,0). Os fragmentos foram marcados para revelação com o agente intercalante Gel Red™ (de acordo com instruções do fabricante) e foram visualizados em sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

4.4.3 ERIC-PCR

Antes de proceder à análise de todas as amostras, a especificidade da PCR também foi analisada empregando-se as mesmas amostras utilizadas na ITS-PCR. A reação foi realizada empregando-se os primers ERIC 1 e ERIC 2, descritos por Versalovic (1991), separadamente.

As reações de amplificação foram preparadas com 50% (v/v) de Master Mix (Promega®), 25 pmol de primer, 3 µL de DNA (para as amostras de *P. aeruginosa*) e 5 µL de DNA (para as amostras de *S. aureus*) e água MilliQ estéril suficiente para completar o volume de 25 µL de reação por tubo.

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti® da ThermoFisher Scientific, programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 45 ciclos de amplificação e uma extensão adicional a 74°C por 10 min. Cada ciclo foi composto pelas seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 45°C por 1 min e extensão a 74°C por 1 min.

Um volume de 10 µL dos produtos da PCR e um padrão de peso molecular de 100 pb foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), em uma corrida inicial a 70 V por 1 h e mais 4 h a 60 V, com um tampão de tris/borato/EDTA 0,5X (pH 8,0). Os fragmentos foram marcados para revelação com o agente intercalante Gel Red™ (de acordo com instruções do fabricante) e foram visualizados em sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

4.5 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Os padrões de bandas obtidos pela ERIC-PCR foram analisados através do Programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). O dendograma foi construído com a utilização do índice de Dice e do método UPGMA. Isolados bacterianos que apresentaram perfis de banda idênticos foram classificadas em um mesmo genótipo.

5 RESULTADOS

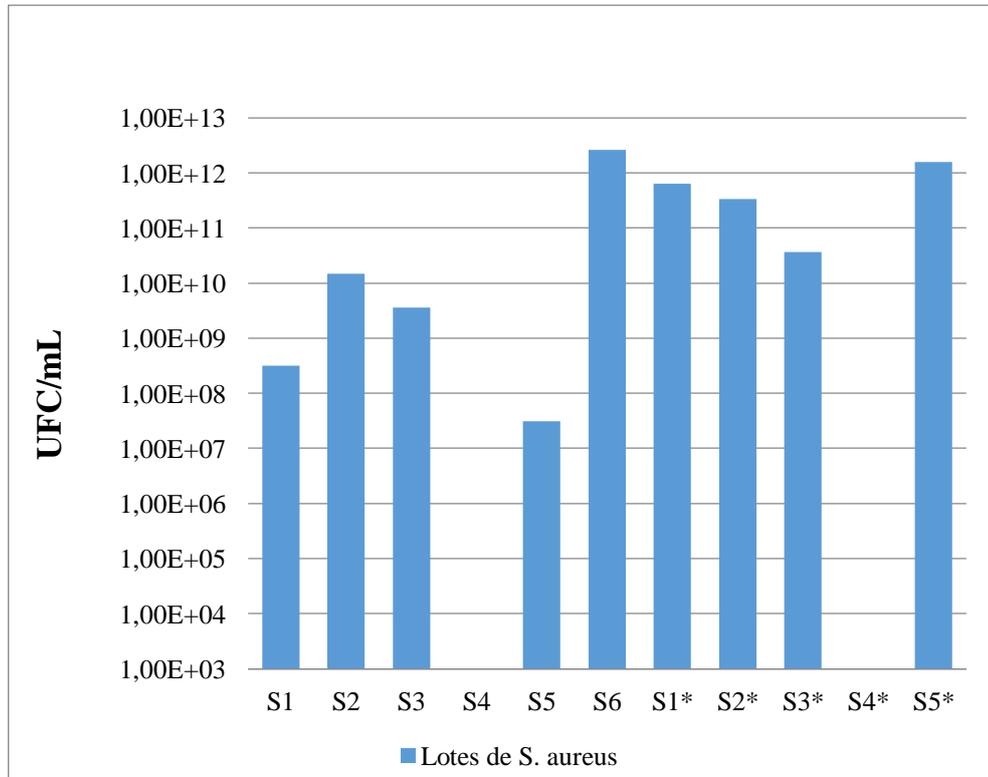
5.1 TESTE DA MANUTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

Na quantificação de bactérias dos lotes de *S. aureus* não houve decaimento da concentração conforme o tempo ou o número de passagens, mas foi detectado que os lotes S4 e S4* não apresentaram crescimento bacteriano mesmo após 48h de incubação, sendo considerados não viáveis. Nestes dois casos, a suspensão mãe foi diluída de forma seriada e as suspensões das diluições foram plaqueadas novamente. Ainda assim, após 24h de incubação, não foi detectado crescimento bacteriano.

Considerando-se que um lote é proveniente de seu lote antecessor e que os lotes S5 e S5* foram produzidos dos lotes S4 e S4* sem crescimento, possivelmente estas duas ampolas não viáveis possuíam microfissuras que possibilitaram a perda de vácuo. Como o vácuo não foi detectado antes da abertura das ampolas com o aparelho *Spart Tester*, não foi possível definir se este foi o motivo da perda de viabilidade.

Curiosamente, alguns lotes apresentaram concentrações de células mais elevadas que seus antecessores, mostrando que as limitações no processo de produção de ampolas de referência não possibilitam lotes quantitativamente homogêneos (Fig. 4).

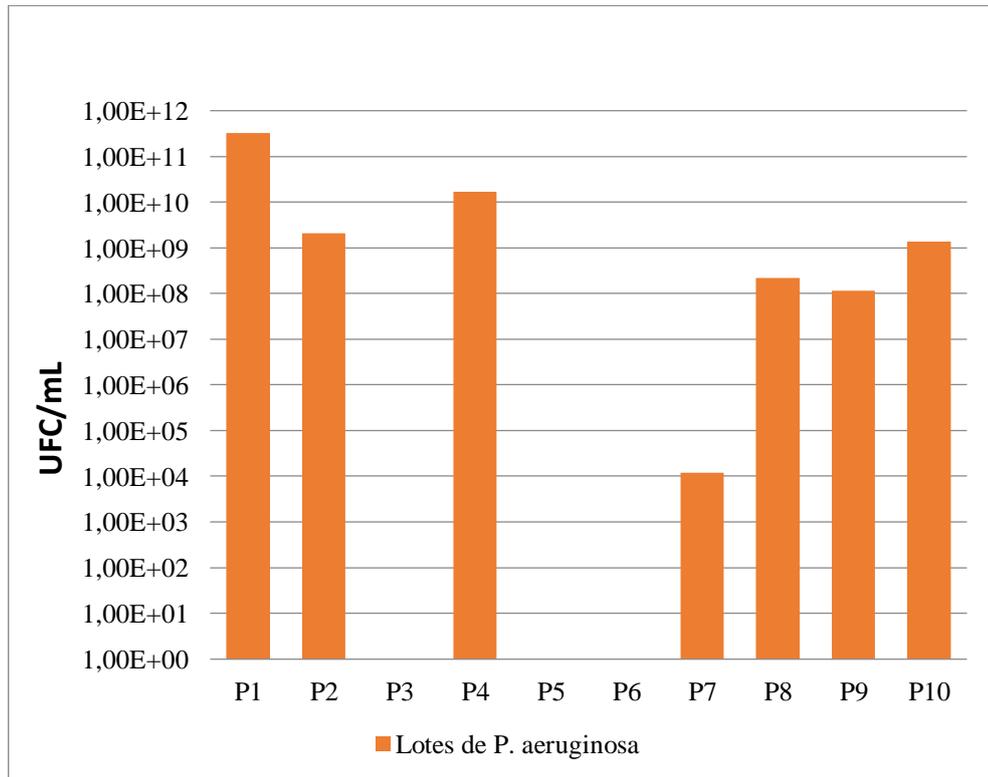
Figura 4: Resultado do estudo da concentração de células de *S. aureus*



A concentração celular foi avaliada pela técnica de *Spread Plate*. UFC/mL: unidades formadoras de colônia/mL

O mesmo pode ser observado na determinação da viabilidade dos lotes de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 5). Mas uma particularidade na análise destes lotes deve ser considerada, visto que, na pesquisa documental das fichas de produção não há definição clara da origem de alguns, como também não há apontamento de produção de lote a partir de nova ampola ATCC, como ocorreu com as ampolas de *S. aureus*.

Figura 5: Resultado do estudo da concentração de células de *P. aeruginosa*



A concentração celular foi avaliada pela técnica de *Spread Plate*. UFC/mL: unidades formadoras de colônia/mL.

5.2 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

Todos os representantes dos lotes apresentaram colônias com características morfológicas específicas de cada uma das bactérias. Porém, os lotes P7, P8, P9 e P10 de *P. aeruginosa* possuíram aparente contaminação nas placas estriadas em TSA, já que foram verificados dois tipos de colônias com características distintas, uma mais opaca e outra mais translúcida. Apesar disso, na coloração de Gram e na análise fenotípica por provas bioquímicas confirmatórias, todos os lotes apresentaram resultados satisfatórios, inclusive as colônias classificadas com características diferentes. A fim de comparar as colônias com características morfológicas distintas, foi realizado o repique das colônias para placas de TSA individualizadas. Foi realizada a extração do DNA genômico após cultivo de 24 h a 36°C. A análise do DNA destas colônias por t-DNA PCR reproduziu o mesmo perfil de bandas do DNA dos outros lotes de *P. aeruginosa* que não tiveram contaminação aparente (Fig. 6B).

A análise fenotípica por VITEK 2 da amostra mais antiga e mais recente de cada cepa, gerou a identificação das amostras S1 e S5* como *Staphylococcus caprae* com uma probabilidade de 89%. Ao repetir o teste, o resultado da identificação das mesmas amostras como *S. aureus* com uma probabilidade de 99%. Entre os resultados do VITEK 2 das duas amostras mais antigas (S1), seis provas bioquímicas do total de quarenta e três forneceram resultados diferentes: d-ribose (dRIB), alcalinização de l-lactato (ILATk), resistência ao O129 (O129R), urease (URE), presença de N-acetil-d-glucosamina (NAG) e produção de fosfatase (PHOS). Já entre os resultados do VITEK 2 das duas amostras mais recentes (S5*), somente 3 provas bioquímicas forneceram resultados diferentes: alcalinização de l-lactato (ILATk), resistência ao O129 (O129R) e urease (URE). Todas estas provas bioquímicas não são utilizadas como provas confirmatórias de *S. aureus*, mas ainda assim, foram suficientes para fornecerem uma identificação divergente.

Na análise das amostras P1 e P10 houve a identificação das mesmas como *P. aeruginosa* com 99% de probabilidade.

Comparando-se as amostras antigas e recentes de cada cepa, observa-se que apesar de a identificação permanecer a mesma, ocorreram modificações nos resultados de algumas provas bioquímicas.

Entre as duas amostras de *S. aureus* (S1 e S5*) a prova da utilização de ribose foi positiva na amostra S1 e negativa na amostra S5* (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados divergentes das provas bioquímicas por VITEK 2 entre os lotes S1 e S5*

Amostras	Utilização de ribose
S1	+
S5*	-

Entre as duas amostras de *P. aeruginosa* houve cinco testes bioquímicos com resultados divergentes: na amostra P1, a resistência ao O129 e a optoquina, e a produção de tirosina arilamidase foram positivas, enquanto que na P10 foram negativas; na amostra P1, a produção de fosfatase e L-pirrolidonil arilamidase foram negativas, enquanto que na amostra P10 foram positivas (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados divergentes das provas bioquímicas por VITEK 2 entre os lotes P1 e P10

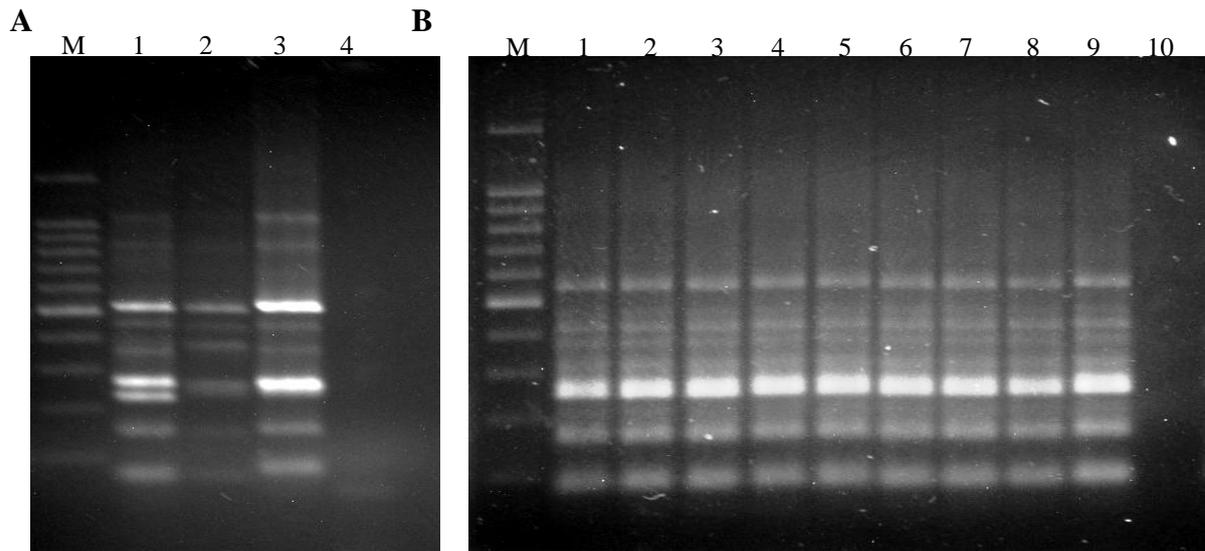
Amostras	Resistência a O129	Resistência a optoquina	Tirosina arilamidase	Fosfatase	L-pirrolidonil arilamidase
P1	+	+	+	-	-
P10	-	-	-	+	+

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para certificação da especificidade da t-DNA PCR a nível de espécie, foram utilizadas as seguintes cepas: *Staphylococcus epidermidis* (INCQS 00016), *Staphylococcus saprophyticus* (INCQS 00233), *Pseudomonas alcaligenes* (INCQS 00069) e *Pseudomonas stutzeri* (INCQS 00520). As amostras de DNA das cepas do gênero *Staphylococcus sp.* foram analisadas com a amostra de DNA do lote S1 e as amostras de DNA das cepas do gênero *Pseudomonas sp.* foram analisadas com a amostra de DNA do lote P1. As amostras de DNA do gênero *Staphylococcus sp.* forneceram perfis de bandas distintos (Fig. 6A), mas as amostras dos lotes de *S. aureus* forneceram o mesmo perfil de bandas (Fig. 6B).

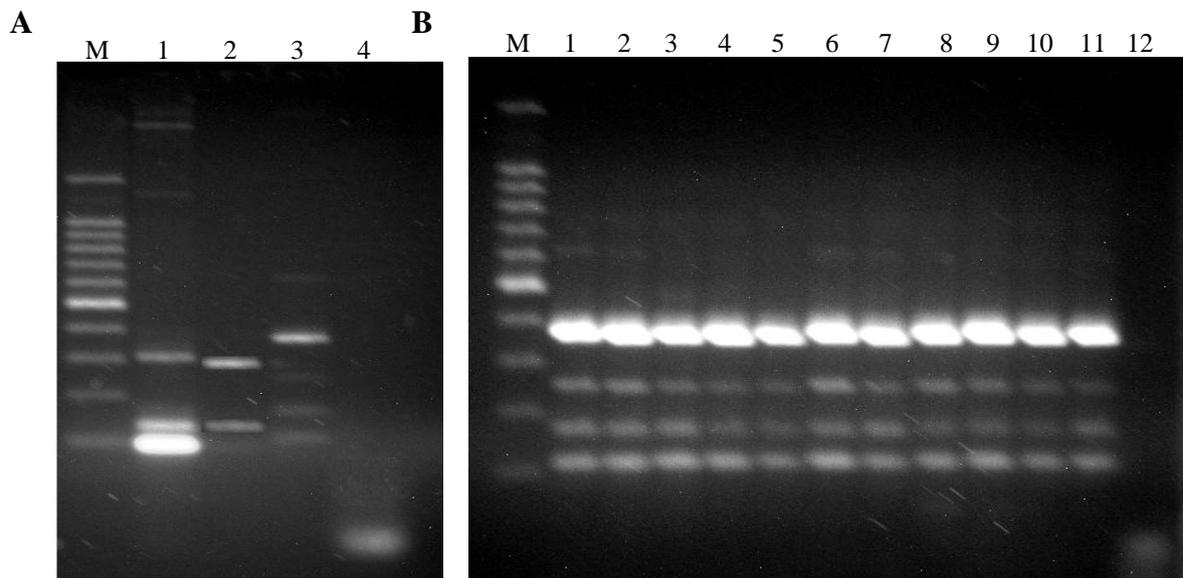
O mesmo ocorreu com as amostras de DNA do gênero *Pseudomonas sp.* (Fig. 7A) e as amostras dos lotes de *P. aeruginosa* (Fig. 7B)

Figura 6: Resultado da t-DNA PCR de representantes dos lotes de *Staphylococcus aureus* avaliados



(A) Gel controle: coluna M, marcador de peso molecular (100bp); Coluna 1, *Staphylococcus saprophyticus* INCQS 00233; Coluna 2, *Staphylococcus epidermidis* INCQS 00016; Coluna 3, amostra S1; Coluna 4, controle negativo (nenhum DNA adicionado). (B) Gel teste com representantes dos lotes: coluna M, marcador de peso molecular (100bp); Coluna 1 a 9, DNA dos representantes dos lotes S1, S2, S3, S5, S6, S1*, S2*, S3*, S5*, respectivamente; Coluna 10, controle negativo (nenhum DNA adicionado).

Figura 7: Resultado da t-DNA PCR de representantes dos lotes de *Pseudomonas aeruginosa*



(A) Gel controle: Coluna M, marcador de peso molecular (100bp); Coluna 1, *Pseudomonas alcaligenes* INCQS 00069; Coluna 2, *Pseudomonas stutzeri* INCQS 00520; Coluna 3, amostra P1; Coluna 4, controle negativo (nenhum DNA adicionado). (B) Gel teste com representantes dos lotes: coluna M, marcador de peso molecular (100bp); Coluna 1 a 9, DNA dos representantes dos lotes P1, P2, P4, P7ct, P7co, P8ct, P8co, P9ct, P9co, P10ct, P10co, respectivamente; Coluna 10, controle negativo (nenhum DNA adicionado). Obs: ct = colônia translúcida; co = colônia opaca.

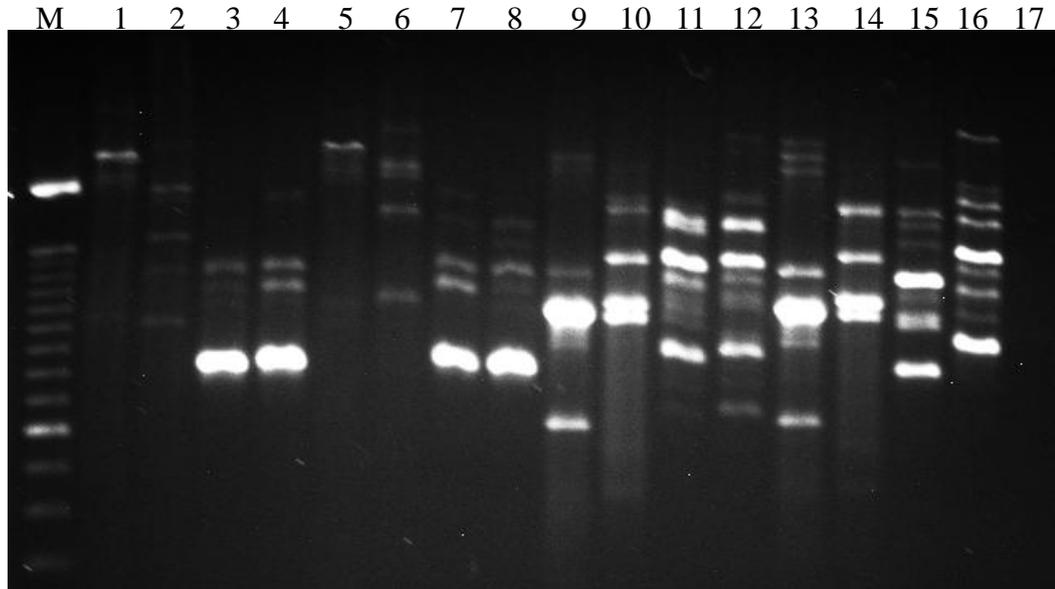
5.4 TIPIFICAÇÃO MOLECULAR E INTEGRIDADE GENÔMICA

Para verificar a especificidade da técnica de ITS-PCR a nível de linhagem, foram utilizadas duas cepas distintas de cada espécie estudada. Para o *S. aureus* foram extraídos DNA das cepas *S. aureus* INCQS 00089 e *S. aureus* INCQS 00250. Para a *P. aeruginosa* foram extraídos DNA das cepas *P. aeruginosa* INCQS 00099 e *P. aeruginosa* INCQS 00230.

A técnica de ITS-PCR não foi capaz fornecer perfis de bandas nítidos e distintos para cada cepa, como o esperado. Por este motivo, optou-se por utilizar a técnica de ERIC-PCR para as duas espécies, mesmo havendo poucos estudos empregando a técnica na tipificação de bactérias Gram positivas.

Na ERIC-PCR, cada primer foi testado isoladamente e o DNA das amostras foi diluído em solução tampão na proporção 1:10. Tanto o DNA concentrado quanto o diluído foram testados. A amplificação e reprodutibilidade foram analisadas e o primer ERIC 2 mostrou-se reprodutivo e específico às amostras de *P. aeruginosa* (Fig. 8).

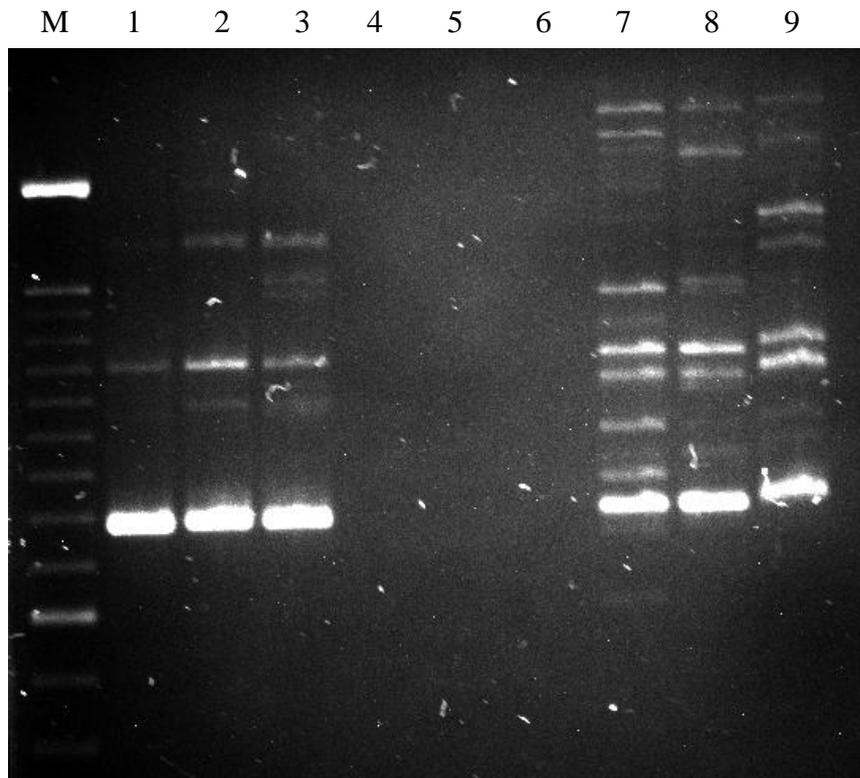
Figura 8: Testes de especificidade da ERIC-PCR para *P. aeruginosa* e *S. aureus* utilizando os primers ERIC 1 e ERIC 2



Gel teste dos primers ERIC 1 e ERIC 2: Coluna M, marcador de peso molecular (100bp). Coluna 1 a 8, primer ERIC 1; Coluna 1, *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 099 concentrado; Coluna 2, *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 230 concentrado; Coluna 3, *Staphylococcus aureus* INCQS 089 concentrado; Coluna 4, *Staphylococcus aureus* INCQS 250 concentrado; Coluna 5 a 8, DNA diluído das mesmas amostras das colunas 1 a 4; Coluna 9 a 16, primer ERIC 2; Coluna 9, *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 099 concentrado; Coluna 10, *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 230 concentrado; Coluna 11, *Staphylococcus aureus* INCQS 089 concentrado; Coluna 12, *Staphylococcus aureus* INCQS 250 concentrado; Coluna 13 a 16, DNA diluído das mesmas amostras das colunas 9 a 12; Coluna 13, controle negativo (nenhum DNA adicionado).

O primer ERIC 2, embora tenha gerado boa amplificação das cepas testadas de *S. aureus*, como demonstrado nas colunas 11, 12, 15 e 16 (Fig. 8), não ofereceu resultados reprodutíveis, conforme observado nas colunas 7 e 9, que deveriam ter o mesmo fingerprinting, visto que são exatamente a mesma amostra (Fig. 9). Por este motivo, a análise foi repetida utilizando-se o primer ERIC 1.

Figura 9: Teste de reprodutibilidade de ERIC-PCR com representantes dos lotes S1 e S2 e com os primers ERIC 1 e ERIC 2

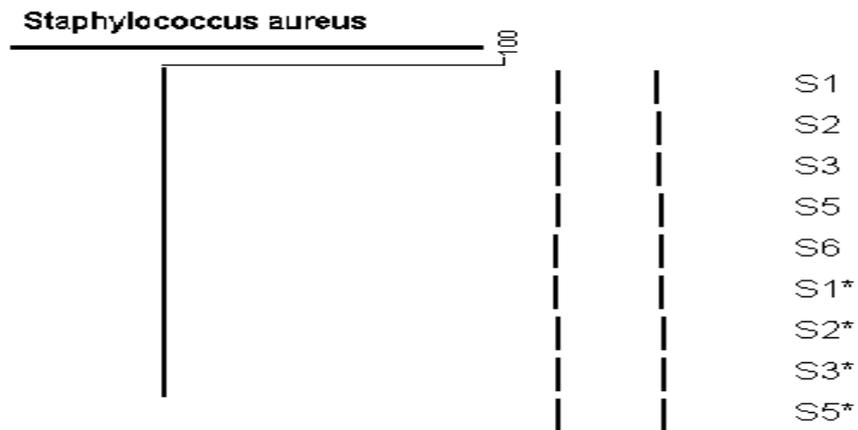


Coluna M, marcador de peso molecular (100bp). Coluna 1 a 3, primer ERIC 1; Coluna 7 a 9, primer ERIC 2; Coluna 1, 3, 7 e 9, S1; Coluna 2 e 8, S2. OBS.: colunas 4, 5 e 6 não foram preenchidas.

Os perfis de bandas obtidos pela ERIC-PCR, tanto na análise das amostras de *S. aureus* (Fig. 10) quanto na análise das amostras de *P. aeruginosa* (Fig. 11), não demonstraram diversidade genética (100% de similaridade) e foram altamente reprodutíveis.

Portanto, os resultados indicaram que todas as amostras de *P. aeruginosa*, inclusive as provenientes das duas colônias distintas dos lotes P7, P8, P9 e P10, representam uma única cepa, a cepa INCQS 00025, e todas as amostras de *S. aureus* representam a cepa INCQS 00039.

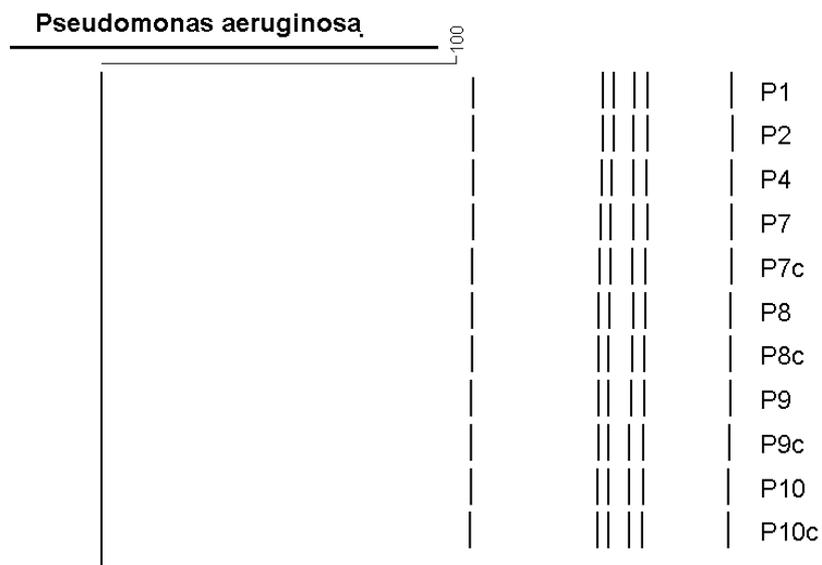
Figura 10: Perfil de bandas representativo dos nove perfis obtidos para os lotes de *Staphylococcus aureus* por ERIC-PCR



Dendrograma obtido com base no agrupamento UPGMA e análise de similaridade com cálculo do coeficiente de Dice. Análise realizada utilizando-se o programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

Figura 11: Perfil de bandas representativo dos onze perfis obtidos para os lotes de *P. aeruginosa* por ERIC-PCR

Perfil de bandas representativo dos onze perfis obtidos para os lotes de *P. aeruginosa* por ERIC-PCR



Dendrograma obtido com base no agrupamento UPGMA e análise de similaridade com cálculo do coeficiente de Dice. Análise realizada utilizando-se o programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

6 DISCUSSÃO

A viabilidade de uma cepa liofilizada pode ser mantida por mais de 20 anos se a concentração de células estiver entre 10^6 e 10^{10} UFC/mL antes da liofilização e sobreviverem ao processo. Há estudos em que bactérias liofilizadas sobrevivem por pelo menos 35 anos de acordo com o gênero e a espécie (SHINOHARA et al, 2000). A variação da resistência de cepas liofilizadas ao longo de seu armazenamento entre espécies foi pioneiramente avaliada por Shinohara (2000), que buscou investigar a diferença na taxa de sobrevivência entre nove espécies de bactérias e uma de fungo imediatamente após a liofilização e durante os primeiros 10 a 16 anos de estocagem a 5°C. O processo de liofilização empregado neste trabalho é muito semelhante ao SBA, salvo algumas exceções: além de “Skim Milk” como criopreservador, adiciona-se glutamato a 1%; o tempo que as ampolas previamente congeladas em gelo seco e álcool absoluto permanecem em freezer a -70°C é de somente dois a dez minuto e o vácuo alcançado é menor que 0,1 Pa, o que corresponde a $7,5 \times 10^{-4}$ Torr, vácuo maior que o utilizado no laboratório. Ainda nesse trabalho, a verificação da concentração de células ocorreu antes e depois da liofilização através da ressuspensão do líofilo com água estéril, diluição seriada e plaqueamento pelo método automatizado *Spiral Platter* em modelo D. A concentração de células antes da liofilização foi considerada 100% e a taxa de sobrevivência após este processo foi relativa a este valor. Segundo Shinohara e colaboradores, a maioria das cepas liofilizadas foram homogêneas e as que não foram, podem ter sofrido influência de variações externas e internas como: procedimentos, equipamentos e componentes da equipe técnica. Apesar destas variações, espécies diferentes apresentaram padrões de sobrevivência similares. Todas as cepas mostraram concentrações maiores que 10^4 UFC/mL depois de 10 anos, à temperatura de 5°C durante o armazenamento. A taxa de sobrevivência para os fungos foi de 10%, bactérias Gram positivas 80% e Gram negativas 50%, logo após a liofilização. Mas o perfil entre as espécies Gram positivas e Gram negativas variaram. Dentre as Gram negativas, *Pseudomonas putida* e *Serratia marcescens* foram as que apresentaram a menor taxa de manutenção da concentração de células após cinco anos. *Escherichia coli* mostrou-se como a mais resistente, pois após 10 anos manteve a taxa de sobrevivência em torno de 10%. As bactérias Gram positivas tiveram maior índice de sobrevivência após a liofilização, alcançando uma taxa de 80% de sobrevivência em algumas

espécies. Esta taxa inclusive permaneceu inalterada em algumas dessas espécies durante o armazenamento. O *Streptococcus mutans*, contudo, diminuiu para 20% após 10 anos.

Um estudo recente e semelhante foi realizado por Rosas (2010) com o objetivo de desenvolver material de referência para ensaio de proficiência. Uma das etapas envolvidas no processo consistiu em avaliar a homogeneidade dos lotes de bactérias liofilizadas e a estabilidade a curto e longo prazo. Para isso, unidades representativas dos lotes foram quantificadas após a liofilização. Os resultados indicaram lotes homogêneos. Na análise de estabilidade a curto prazo, uma quantidade representativa de unidades de cada lote foi quantificada através da incubação em três diferentes temperaturas por um máximo de sete dias, já na análise da estabilidade a longo prazo, representantes dos lotes foram mantidos a -20°C e os líófilos quantificados a cada três meses consecutivos e um ano após a liofilização. Este estudo, portanto, apesar de não ter avaliado a suscetibilidade de bactérias ao processo de liofilização e sua concentração de células durante o armazenamento por mais de um ano, forneceu dados relevantes sobre a estabilidade de MR a condições de transporte.

Todavia, tanto o estudo de Rosas (2010) quanto os estudos de Shinohara (2000 e 2008), determinaram a homogeneidade de suas amostras para realizar a avaliação da estabilidade. Neste sentido, os resultados obtidos na determinação da viabilidade deste estudo dos lotes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* não fornecem dados sobre a estabilidade dos mesmos, pois como não houve comprovação de homogeneidade entre eles e nem quantificação pós-liofilização, não é possível definir a concentração inicial. Para que isso seja possível no LMR, alguns procedimentos deveriam ser incluídos e/ou alterados no laboratório: seria necessário definir a transmitância, medida por um espectrofotômetro, representativa de uma concentração definida de bactérias, de forma que seja possível estimar o volume de suspensão a ser utilizado no preparo das ampolas, obtendo-se assim MR homogêneos. O volume aplicado em cada ampola deve ser uniforme, de forma que, definida a concentração da suspensão em Skim Milk, cada ampola receba a mesma quantidade de células. Desta forma seria possível acompanhar a concentração de células viáveis após a liofilização e registrar este valor em documento pertencente ao lote, atendendo-se assim as especificações da norma ABNT ISO GUIA 17034:2016.

Considerando-se que as pipetas Pasteur devem ser de ponta afilada para serem introduzidas nas ampolas e que nenhuma destas ampolas comercializadas possui graduação, um método alternativo para indicar o volume seria necessário.

A quantidade significativa de linhagens fornecidas pelo laboratório demanda que os ensaios realizados no controle dos lotes produzidos sejam simples, rápidos, robustos e

reprodutíveis. Neste sentido, a quantificação de bactérias mesofílicas viáveis pelo método de contagem em placa (método preconizado pela FB), embora seja relativamente simples, demanda tempo, material e um longo período de incubação (24–72 h), mostrando-se inviável à rotina do laboratório. Além disso, este método pode conduzir a subestimação da concentração de células viáveis devido a junção de colônias próximas e/ou a presença de células viáveis não-cultiváveis, como células sob injúria, inibida, dormente ou inativa (RAULT et al, 2007).

A citometria de fluxo tem se revelado um método alternativo muito promissor à quantificação de células viáveis, inclusive na área de microbiologia, e pode ser realizada utilizando marcadores para viabilidade, como por exemplo, presença de esterases celulares, integridade de membrana citoplasmática, atividade respiratória, entre outros. (RAULT et al, 2007; NATI, 2014). Apesar de a falta de parâmetros do presente estudo não permitir avaliar a estabilidade, os resultados obtidos (Figura 4 e 5) sugerem fortemente que mesmo não havendo controle de viabilidade e homogeneidade, todos os lotes viáveis possuíam concentração superior a 10^4 UFC/mL. Quanto aos lotes que não apresentaram viabilidade, presume-se que possa ter ocorrido a formação de microesferas nas ampolas durante a estocagem, uma vez que a presença de vácuo foi detectada em todas as ampolas após a produção do lote. Como o vácuo não foi detectado por *Spart Tester* antes da abertura das ampolas e como não havia registros de procedência de todos os lotes produzidos, não foi possível esclarecer a causa da ausência de viabilidade nos lotes S4, S4*, P3, P5 e P6, o que ressalta a importância do registro fiel de informações relacionadas à produção, ao controle de qualidade e a existência de ocorrências ou não conformidades, permitindo uma boa rastreabilidade, a identificação de melhorias e a execução de medidas preventivas.

Esclarecida a importância de se avaliar a estabilidade de MR quanto à viabilidade, há ainda outro aspecto talvez mais importante que não foi abordado pelos estudos citados até o momento: a estabilidade de características chave, exigida pela norma NIT DICLA 61:2012 e NIT DICLA 58:2015. Embora ambas as normas não definam quais seriam estas características ou forneçam informações que norteiem a escolha das mesmas, tratando-se de bactérias, pode-se considerar que estão relacionadas às suas características fenotípicas, como reações enzimáticas, metabolismo, sorologia, aspectos morfológicos, capacidade de formar esporos, sensibilidade a antimicrobianos, dentre outros. Desta forma, a avaliação de provas bioquímicas convencionais e a determinação de características morfológicas de culturas de referência liofilizadas poderiam cumprir esta exigência da ABNT ISO GUIA 34:2012.

Os resultados obtidos no presente estudo pelas provas bioquímicas convencionais evidenciaram que as principais características que diferenciam as bactérias liofilizadas estudadas a nível de espécie, permanecem inalteradas mesmo após 24 anos de armazenamento, mas os aspectos morfológicos de suas colônias podem se alterar ao longo do tempo, como ocorreu nos lotes de *Pseudomonas aeruginosa*. Contudo, há provas bioquímicas não convencionais que se alteram a longo prazo, o que pode ter ocorrido pela perda ou falha na expressão gênica ou por alterações pós-traducionais. Ainda que estas alterações não representem falha na identificação de bactérias em laboratórios de poucos recursos, como os que não possuem métodos automatizados de identificação, há grandes laboratórios de rotina exaustiva, como os de diagnóstico, que usam estes métodos automatizados na prática laboratorial, havendo o risco pronunciado de equívoco na identificação da amostra, como houve durante a primeira análise das amostras S1 e S5* pelo aparelho VITEK 2, apesar da baixa probabilidade de 89% ser um alerta de falha de identificação.

Quanto a autenticação, como citado na introdução deste trabalho, há documentos e normas técnicas que indicam as cepas a serem utilizadas em análises laboratoriais. Desta forma, além da identificação da espécie, que pode ser realizada por sequenciamento do gene 16s do rRNA por exemplo, também é necessário autenticar a cepa de referência. Nenhum método não molecular até o momento é capaz de identificar bactérias a nível de linhagem, por isso, as técnicas de ITS-PCR e ERIC-PCR foram escolhidas para verificar a autenticidade das linhagens. Esta última foi também empregada na análise da integridade genômica por amplificar sequências repetitivas ao longo do genoma.

A t-DNA PCR, utilizada para a identificação molecular das espécies, deve ter a especificidade testada utilizando-se cepas de referência de diferentes espécies como controle, ainda que tenha mostrado ser reprodutível e espécie específica em estudos de identificação de isolados (MAES et al, 1997; CLEMENTINO et al, 2001; ZSCHÖCK et al, 2005). No presente estudo, esta foi a técnica de identificação molecular mais reprodutível e sensível das três utilizadas, pois a reação gerou diversos fragmentos em quantidade suficiente para possibilitar boa visualização no gel de agarose e perfis idênticos ao reanalisar as amostras. Nesta técnica, os dois tipos de colônias presentes nas amostras P7, P8, P9 e P10, resultaram em perfis idênticos a todos outros obtidos das amostras de *P. aeruginosa*.

A autenticação da linhagem destas colônias e de todas as outras, foram avaliadas por ITS-PCR, que não amplificou de maneira eficiente os espaços intergênicos de 16S e 23S de rRNA, mesmo tendo sido programado ciclos mais extensos que o utilizado corriqueiramente.

Na ERIC-PCR, os dois primers tiveram que ser testados isoladamente. O primer ERIC 1 forneceu resultados satisfatórios na análise de *S. aureus*, enquanto que o primer ERIC 2 se mostrou reprodutível somente na análise das amostras de *P. aeruginosa*. Portanto, é aconselhável testar cada primer isoladamente ao analisar amostras de isolados a fim de garantir a especificidade e reprodutibilidade da reação, pois a técnica não é aplicável a algumas espécies de bactérias, como a *Avibacterium paragallinarum* (HELLMUTH et al, 2016), enquanto que demonstra especificidade com outras (BARRADAS et al, 1995; ARDAKANI; RANJBAR, 2016). Apesar disso, nossos resultados mostram que a ERIC-PCR pode ser empregada na tipificação de cepas da espécie *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Fig. 7, 8, 9 e 10), o que não significa que possa ser utilizada sem testes prévios na análise de outras espécies. Portanto, cada cepa de referência fornecida pelo laboratório que tenha sua identificação autenticada, deverá ser analisada pelas técnicas moleculares que fornecerem os melhores resultados, após testes prévios isolados para cada uma destas cepas. Todas as outras técnicas de tipificação ou investigação da diversidade genômica também podem ser aplicadas, mas cada uma delas apresenta falhas, seja de especificidade, seja de reprodutibilidade, de acordo com a espécie estudada.

7 CONCLUSÃO

A ausência de viabilidade verificada em 23,8% dos lotes analisados sugere a possibilidade de formação de microfissuras durante armazenamento de ampolas liofilizadas. A manutenção da concentração de células nas ampolas viáveis não pôde ser verificada devido a ausência da demonstração de homogeneidade entre os lotes produzidos pela CMRVS. Por outro lado, todas as amostras viáveis reproduziram os resultados esperados nos testes bioquímicos convencionais e automatizados, havendo modificação nos resultados de algumas provas bioquímicas entre o lote mais antigo e mais recente de cada espécie estudada.

Por haver um número limitado de produtores de materiais de referência há poucos estudos abordando o tema, e os existentes concentram seus esforços na determinação da estabilidade da viabilidade, havendo pouca, senão nenhuma, informação a respeito da estabilidade de características chave destes materiais, relacionadas ao fenótipo bacteriano por exemplo. Considerando-se os resultados acima, como a utilização de bactérias de referência destina-se principalmente a comparação de dados qualitativos ou à identificação de amostras microbiológicas, é imprescindível que se avalie em estudos futuros a manutenção de características fenotípicas, morfológicas, sorológicas e de resistência a antimicrobianos. Neste caso, por se tratar de uma vasta diversidade de ensaios, seria prático e válido avaliar as principais características de cada espécie ou cepa bacteriana, ou seja, aquelas que são necessárias em ensaios normatizados ou regulamentados, e analisar somente estas, porque ainda que se avalie todo o genoma bacteriano, é provável que haja diversas alterações genômicas que não impactam nas características essenciais de uma linhagem, bem como é provável que haja inúmeras alterações enzimáticas ou proteicas que não serão capazes de modificar a identificação de uma espécie, embora, como sugerido neste estudo, isso também seja possível, justificando mais ainda a necessidade de se realizar estudos de manutenção das características fenotípicas de cultura de referência.

A liofilização também é capaz de originar colônias diferentes em uma única cepa de referência, gerando a suspeita de contaminação, que pode ser ocasionada por uma linhagem diferente não detectada pelos métodos tradicionais de identificação. Neste sentido, os ensaios moleculares de tipificação mostram-se úteis a verificação de contaminação a nível de linhagem em uma cultura. Estes métodos moleculares, portanto, são cada vez mais necessários na identificação de cepas ou isolados, visto que são muito mais sensíveis e, desta forma, capazes de corroborar ou refutar um resultado de análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P. M. DE, et al. Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 118, 2014.

ADAMS, G. The Principles of Freeze – Drying. In: DAY, J. G.; TACEY, G. N. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. New Jersey: Ed. Humana Press, 2007. P. 15 – 100.

ARDAKANI, M. A.; RANJBAR, R. Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method. **Electronic Physician**, v. 8, p. 2291-2296, 2016.

ASHWOOD-SMITH, M. J.; GRANT, E. Mutation Induction in Bacteria by Freeze-Drying. **Cryobiology**, v. 13, p. 206-213, 1976.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO GUIA 30**: termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO GUIA 34**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2012

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

BARRADAS, M. C. R. et al. Genomic Fingerprinting of *Bartonella* Species by Repetitive Element PCR for Distinguishing Species and Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1089-1093, 1995

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de ago de 2010. Seção 1, p. 44-46.

BRASIL. Decreto nº 49.974 – A, de 21 de janeiro de 1961. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 jan. 1961. Seção 1, p. 761.

BRASIL. Decreto nº 82.201, de 30 de agosto de 1978. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 ago. 1978. Seção 1, p. 14089.

BRASIL. FIOCRUZ. **Ato da Presidência nº 44**, 27 de julho de 1981. Altera a Denominação do Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos – LCCDMA, para Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS.

BRASIL. Lei nº 2.187, de 16 de fevereiro de 1954. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 fev. 1954. Seção 1, p. 2385.

CARVALHO, I. I. R. **Análise da Diversidade da Microbiota Fecal de Crianças de Zero a Doze Meses de Idade Usando o Método de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante**. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CLEMENTINO, M. M. et al. PCR Analyses of tRNA Intergenic Spacer, 16S-23S Internal Transcribed Spacer, and Randomly Amplified Polymorphic DNA Reveal Inter- and Intraspecific Relationships of *Enterobacter cloacae* Strains. **Journal of Clinical microbiology**, v. 39, p. 3865-3870, 2001.

COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 5-8, 2006.

DEWALD, R. R. Kinetic Studies on the Destructive Action of Oxygen on Lyophilized *Serratia marcescens*. **Applied Microbiology**, v. 14, p. 568-572, 1966.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA. 2010. 2v.

HELLMUTH, J. F. et al. Evaluation of the ERIC – PCR as a probable method to differentiate *Avibacterium paragallinarum* serovars. **Journal of Avian Pathology**, v. 21, p. 1-18, 2016.

INACIO, H. S. et al. Phenotypic and genotypic diversity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections recovered in the Hospitals of Belo Horizonte, Brazil. **Chemotherapy**, v. 60, p. 54-62, 2014.

INCQS, Microrganismos de Referência. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em:

<https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=120&Itemid=100> Acesso em: 27/11/2015.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **NIT-DICLA 061**: requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaio e dos produtores de materiais de referência dos centros de recursos biológicos. Rio de Janeiro, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **NIT-DICLA 058**: aplicação dos requisitos do ABNT ISO GUIA 34. Rio de Janeiro, 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 17034**: general requirement for the competence and consistent operation of reference material producers. 2016.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS N. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 945-995, 1993

KONEMAN, E. K., et al. **Bacilos Gram – negatives Não – Fermentadores**. In: Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido. p. 263-284, 5 Ed, 2001.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9. Ed. Baltimore, Williams & Williams, 1984.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 1985

MAES, N. et al. Rapid and Accurate Identification of Staphylococcus Species by tRNA Intergenic Spacer Length Polymorphism Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2477-2481, 1997.

MEYER, A. S. **Comparação de Coeficientes de Similaridade usados em Análises de Agrupamento com Dados de Marcadores Moleculares Dominantes**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MILLEMANN, Y. et al. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. **Fems immunology and Medical Microbiology**, v. 14, p. 129-134, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA. OPAS. **Termo de Cooperação nº 37**: Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a antimicrobianos. Brasil, mar. 2006.

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Elsevier, Rio de Janeiro, 7. Ed, 2014.

NATI, T. **Uso da citometria de fluxo para avaliar os efeitos da alta pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae***. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal, Espírito Santo, 2014.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, D.; BENNETHS, J.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infections Diseases**. 7. Ed., Ed. Elsevier. 1995.

RAULT, A. et al. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. **Cryobiology**, v. 55, 2007. Disponível em: doi:10.1016/j.cryobiol.2007.04.005. Acesso em: 05 de novembro de 2015.

ROSAS, C. et al. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69, p. 15-22, 2010.

SHINOHARA, M., et al. Survival of Freeze-Dried Bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, p. 9–24, 2008.

SHINOHARA, M., et al. Survival Rate of Microbes after Freeze-Drying and Long-Term Storage. **Cryobiology**, v. 41, p. 251-255, 2000.

SILBERT, S. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for non-fermentative Gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, p. 847-851, 2004.

SILVA, A. R. **Métodos de Agrupamento: Avaliação e Aplicação ao Estudo de Divergência Genética em Acessos de Alho**. 2012. 67f. Dissertação (Mestrado em Estatística Aplicada e Biometria) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

SOLA, M. C., et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. Goiânia, v.8, p. 1398-1418, 2012.

VAN BELKUM, A. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin Microbiol Infect Dis**, v. 13, p. 1–46, 2007.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823 -6831, 1991.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 861-866, 1991.

ZSCHÖCK, M. et al. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 333-337, 2015.