

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

Luciana Veloso da Costa

**AMPLIAÇÃO DO BANCO DE DADOS PARA *Bacillus* E GÊNEROS
RELACIONADOS EM SISTEMA MALDI-TOF MS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
MICROBIOTA DE ÁREAS LIMPAS FARMACÊUTICAS**

Rio de Janeiro
2020

Luciana Veloso da Costa

AMPLIAÇÃO DO BANCO DE DADOS PARA *Bacillus* E GÊNEROS
RELACIONADOS EM SISTEMA MALDI-TOF MS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
MICROBIOTA DE ÁREAS LIMPAS FARMACÊUTICAS

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Costa, Luciana

Ampliação do banco de dados para *Bacillus* e gêneros relacionados em sistema MALDI-TOF MS para a identificação de microbiota de áreas limpas farmacêuticas. / Luciana Costa. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

170 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientadora: Verônica Viana Vieira.

1. Identificação bacteriana. 2. Bacillus. 3. MALDI-TOF MS. 4. 16S rRNA. I. Título.

Expansion of the database for *Bacillus* and related genera in MALDI- TOF MS system for identification of microbiota in clean pharmaceutical areas.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.”

Luciana Veloso da Costa

AMPLIAÇÃO DO BANCO DE DADOS PARA *Bacillus* E GÊNEROS
RELACIONADOS EM SISTEMA MALDI-TOF MS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
MICROBIOTA DE ÁREAS LIMPAS FARMACÊUTICAS

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Maria Helena Simões Villas Boas (Doutor)
INCQS/Fiocruz

Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Doutor)
IMPG/UFRJ

Erica Louro da Fonseca (Doutor)
Bio-Manguinhos/Fiocruz

ORIENTADOR

Verônica Viana Vieira (Doutor)
IOC/Fiocruz

COLABORADORA

Juliana Nunes Ramos (Doutor)
UERJ

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditaram no meu potencial e me estimularam a percorrer esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todos os amigos invisíveis que me ajudaram, no desenvolvimento deste trabalho, pois sem eles, nada disso seria possível.

Ao meu marido, Ed e aos meus pais, Josely e George, por sempre me incentivarem e compreenderem os momentos em que não lhes pude dar a atenção que mereciam. Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

A Verônica Viana Vieira, minha orientadora, por acreditar no meu potencial e me dar todo o apoio emocional e técnico, em momentos cruciais.

À toda equipe da CBAS, em especial, a Talita, Erica e Juliana por terem me ajudado e ensinado todas as vezes que precisei e ao Paulo Victor pela sua constante boa vontade e disponibilidade para ajudar.

A Luciane Medeiros pelo tema do projeto e por ter viabilizado metodologias e a aquisição de equipamentos, no laboratório, dos quais eu pude usufruir. Obrigada pelo incentivo, quando eu tomei a decisão de iniciar essa jornada.

Às colegas da SEPIN, Adriana, Cristhiane, Fernanda, Joyce e Sílvia pela amizade, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

À toda equipe da SETBI por ter me acolhido com carinho e por ter me ajudado em todos os momentos necessários. Agradeço em especial a Jaline Coutinho, por ter aceitado me receber na seção e a Natália Pedra e Erica Louro pela paciência e boa vontade para ensinar. Devo a elas o aprendizado em sequenciamento e a operação do analisador genético. Não sei como teria sido sem a ajuda delas!

A Rebeca Lage por ter me ajudado com os experimentos, por ter me sugerido melhorias e por ter ouvido, tantas vezes, as minhas angústias!

Ao colega Marcelo Brandão pelo apoio e incentivo e por acreditar no meu potencial!

Às amigas Flavinha, Anginha e Lia, por terem me socorrido tantas vezes e me ajudado com o procedimento do MicroSeq. Devo muito a vocês!

Aos colegas de turma, em especial a Mariana, Angélica, Priscila e Cris, por tantos momentos agradáveis compartilhados.

A Katia Leandro por ser sempre incansável em proporcionar o melhor para os alunos. Obrigada por sua dedicação, compromisso e preocupação!

À equipe da pós-graduação do INCQS pela organização e pelo atendimento de ótima qualidade!

Acreditar que é possível é motivo suficiente para não desistir.

Autor desconhecido

RESUMO

Historicamente, a utilização de vacinas tem se mostrado a maneira mais eficaz de prevenção a doenças. Durante o processo de produção de vacinas, rígidas normas devem ser seguidas, a fim de minimizar o risco de contaminação microbiana, logo o programa de monitoramento ambiental deve garantir que as áreas produtivas se mantenham dentro dos níveis de controle adequados. *Bacillus* e gêneros relacionados pertencem aos principais grupos isolados destes ambientes e a sua identificação é particularmente difícil, devido a similaridades entre espécies estreitamente relacionadas. A maioria dos sistemas de identificação microbiana possuem bases de dados direcionadas para micro-organismos de interesse clínico, o que dificulta a identificação de bactérias de origem ambiental. MALDI-TOF MS se apresenta como uma ferramenta promissora na identificação bacteriana, por ser um método rápido, eficaz e de baixo custo. No entanto, a base de dados (BD) ainda é limitada quanto a bactérias de origem ambiental. Este estudo visa a ampliação da BD do programa Saramis associado a MALDI-TOF MS para a melhoria na identificação de *Bacillus* e gêneros relacionados provenientes de áreas produtivas de uma unidade produtora de imunobiológicos. Para isso, 97 linhagens deste grupo, isoladas entre 2016 e 2017, foram analisadas inicialmente em sistema VITEK® MS RUO, porém 33 delas não foram identificadas. Após introdução de etapa de pré-extração com ácido fórmico 70%, este número reduziu para 22. A partir da análise do gene 16S rRNA, os seguintes gêneros foram encontrados: *Bacillus* (53,3%), *Penibacillus* (30,4%), *Cytobacillus* (6,5%), *Lysinibacillus* (4,3%), *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Oceanobacillus*, *Terribacillus* e *Sporosarcina* (1,1% para cada gênero). Os resultados foram inconclusivos, quanto ao gênero, para cinco linhagens e 12 linhagens foram apontadas como possíveis novas espécies. Quarenta perfis taxonômicos foram identificados e um representante de cada foi selecionado para a análise dos genes *rpoB* e *gyrB*. Após análise filogenética dos três genes, 26 linhagens foram identificadas em nível de espécie, 12 em nível de gênero e duas delas foram consideradas inconclusivas. Após as análises, 32 espectros de massa foram incluídos na BD do programa Saramis, a partir das linhagens isoladas em Bio-Manguinhos e 19 espectros foram inseridos a partir de 21 linhagens isoladas de outras salas limpas e cedidas pela Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS/IOC/Fiocruz). Inicialmente, das 97 linhagens analisadas, 77,3% foram

identificadas por MALDI-TOF MS (gênero ou espécie). A análise do gene 16S rRNA permitiu a identificação de 94,9% das linhagens. Após a ampliação da BD do programa Saramis, o percentual de identificação subiu de 77,3% para 96,9%, superando o percentual de identificação obtido a partir de metodologia genotípica. Das 21 linhagens cedidas pela CBAS, todas foram indentificadas, sendo que 16 não haviam sido identificadas antes da ampliação da BD. Portanto, a identificação molecular de *Bacillus* e gêneros relacionados, através do sequenciamento de genes *housekeeping* e a introdução dos espectros obtidos a partir da análise por MALDI-TOF MS no programa Saramis, de modo a se obter uma BD customizada, se mostrou uma ferramenta extremamente promissora e eficaz na identificação de *Bacillus* e gêneros relacionados de origem farmacêutica industrial.

Palavras-chave: Identificação bacteriana. *Bacillus*. MADI-TOF MS. 16S rRNA.

ABSTRACT

Historically, the use of vaccines has been shown to be the most effective way to prevent diseases. During the vaccine production process, strict standards must be followed in order to minimize the risk of microbial contamination, so the environmental monitoring program must ensure that the productive areas remain within the appropriate levels of control. *Bacillus* and related genera belong to the main groups isolated from these environments and their identification is particularly difficult, due to similarities between closely related species. Most microbial identification systems have databases aimed at microorganisms of clinical interest, which makes it difficult to identify environmental bacteria. MALDI-TOF MS is a promising tool in bacterial identification, as it is a fast, effective and low cost method. However, the database (DB) is still limited for environmental bacteria. This study aims to expand Saramis program DB associated with MALDI-TOF MS to improve the identification of *Bacillus* and related genera from the productive areas of an immunobiological production unit. For this purpose, 97 strains from this group, isolated between 2016 and 2017, were initially analyzed by VITEK® MS RUO system, but 33 were not identified. After introducing a pre-extraction step with formic acid 70%, this number dropped to 22. Then, the strains were identified by 16S rRNA gene analysis and the following genera were found: *Bacillus* (53.3%), *Paenibacillus* (30.4%), *Cytobacillus* (6.5%), *Lysinibacillus* (4.3%), *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Oceanobacillus*, *Terribacillus* and *Sporosarcina* (1.1% for each genus). The results were inconclusive for five strains and twelve strains were identified as possible new species. Forty taxonomic profiles were identified and one strain of each was selected for the analysis of *rpoB* and *gyrB* genes. After phylogenetic analysis of the 3 genes, 26 strains were identified at the species level, 12 at the genus level and two were inconclusive. After the analysis, 32 mass spectra of the strains isolated in Bio-Manguinhos and 19 mass spectra of 21 strains isolated from other clean rooms and provided by the Collection of Bacteria from Environment and Health (CBAS/IOC/Fiocruz) were included in the DB of Saramis. Initially, 77.3% of the 97 strains were identified by MALDI-TOF MS (genus or species). The analysis of 16S rRNA gene allowed the identification of 94.9% of the strains. After the expansion of the DB of Saramis program, the percentage of identification was improved from 77.3% to 96.9%, overcoming the percentage of identification obtained by genotypic

methodology. All of the 21 strains provided by CBAS were identified by MALDI-TOF MS, but 16 of them had not been identified before the expansion of the DB. Therefore, the molecular identification of *Bacillus* and related genera by housekeeping genes analysis and the introduction of the spectra provided by MALDI-TOF MS in the Saramis program, in order to obtain a customized DB, proved to be an extremely promising and effective tool in the identification of *Bacillus* and related genera from pharmaceutical industry.

Keywords: Bacterial identification. *Bacillus*. MADI-TOF MS. 16S rRNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Portfólio da produção de imunobiológicos de Bio-Manguinhos	24
Quadro 2	Testes microbiológicos e os limites estabelecidos para água potável, água purificada e água para injetáveis	29
Figura 1	Esquema demonstrando a técnica de MALDI-TOF MS	45
Quadro 3	Exibição de resultados de identificação no programa Saramis Premium	54
Figura 2	<i>Bacillus</i> e gêneros relacionados isolados das áreas produtivas de Bio-Manguinhos	66
Figura 3	Grupos/espécies de <i>Bacillus</i> isolados em Bio-Manguinhos.....	71
Figura 4	Grupos/espécies de <i>Paenibacillus</i> isolados em Bio-Manguinhos....	77
Figura 5	Árvore filogenética das linhagens identificadas como <i>Bacillus</i> (1.317 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	84
Figura 6	Árvore filogenética das linhagens identificadas como <i>Paenibacillus</i> (1.203 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	87
Figura 7	Árvore filogenética das linhagens identificadas como <i>Cytobacillus</i> (1.379 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	89
Figura 8	Árvore filogenética das linhagens identificadas como pertencentes ao gênero <i>Lysinibacillus</i> (1.333 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	91
Figura 9	Árvore filogenética da linhagem identificada como <i>Metabacillus</i> (1.337 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	92
Figura 10	Árvore filogenética da linhagem identificada como <i>Neobacillus</i>	

	(1.354 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	92
Figura 11	Árvore filogenética da linhagem identificada como <i>Oceanobacillus</i> (1.348 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	93
Figura 12	Árvore filogenética da linhagem identificada como <i>Terribacillus</i> (1.362 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	94
Figura 13	Árvore filogenética da linhagem identificada como <i>Sporosarcina</i> (1.358 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	95
Figura 14	Árvore filogenética das linhagens sem gênero definido (1.263 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	96
Figura 15	Árvore filogenética das linhagens B289/16 e B282/17 (1.371 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA com a linhagem tipo de <i>Brevibacterium</i> e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	97
Figura 16	Árvore filogenética com base nos genes <i>rpoB</i> (a) e <i>gyrB</i> (b, c, d, e) das linhagens identificadas como <i>Bacillus</i> (994 pb/1.015 pb/848 pb/900 pb/787 pb) e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	102
Figura 17	Árvore filogenética com base no gene <i>rpoB</i> das linhagens identificadas como <i>Paenibacillus</i> (1.017 pb/794 pb) e a linhagem <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	106
Figura 18	Árvore filogenética com base no gene <i>rpoB</i> (a) e <i>gyrB</i> (b) das linhagens identificadas como <i>Cytobacillus</i> (1.205 pb/ 986 pb) e a	

	linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	107
Figura 19	Árvore filogenética com base nos genes <i>rpoB</i> (a) e <i>gyrB</i> (b) da linhagem identificada como <i>Metabacillus</i> (1.179 pb/ 769 pb) e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	108
Figura 20	Árvore filogenética com base no gene <i>rpoB</i> das linhagens identificadas como <i>Oceanobacillus</i> e <i>Terribacillus</i> (1.155 pb) e a linhagem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> como grupo de fora (<i>Neighbour-Joining</i>)	109
Quadro 4	Definição de espécies para inserção na base de dados do programa Saramis e o nome do SuperSpectrum inserido	115
Figura 21	Dendrogramas obtidos a partir dos espectros das linhagens B319/17 (a) e B679/17 (b)	118
Figura 22	Arquivo “ <i>Tree</i> ” da base de dados do programa Saramis contendo pastas conforme a classificação taxonômica das espécies	119
Quadro 5	Linhagens da Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) selecionadas para inserção na base de dados do programa Saramis e o nome do SuperSpectrum inserido	121
Quadro 6	Custo por análise das metodologias utilizadas no presente trabalho	127
Quadro 7	Linhagens isoladas em Bio-manguinhos identificadas por MALDI- TOF MS antes e depois da ampliação da base de dados do programa Saramis	166
Quadro 8	Linhagens cedidas pela Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) identificadas por MALDI-TOF MS antes e depois da ampliação da base de dados do programa Saramis	170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Limites recomendados para o monitoramento microbiológico de áreas limpas durante a operação	27
Tabela 2	Número de famílias, gêneros e espécies de <i>Bacillus</i> e gêneros relacionados presentes na base de dados do programa Saramis em relação ao número descrito na literatura	50
Tabela 3	Número de linhagens de bastonetes Gram-positivos não identificadas em relação ao número de linhagens isoladas em Bio-Manguinhos	60
Tabela 4	Número de famílias, gêneros e espécies de <i>Bacillus</i> e gêneros relacionados presentes na base de dados do programa VITEK® 2 em relação ao número descrito na literatura	61
Tabela 5	Comparação dos resultados de identificação por MALDI-TOF MS, realizando-se ou não etapa de pré-extração com ácido fórmico 70%	63
Tabela 6	Resultados de identificação por MALDI-TOF MS e análise do gene 16S rRNA	64
Tabela 7	Percentual de isolados por gênero não identificados por MALDI-TOF MS em comparação à análise do gene 16S rRNA.	68
Tabela 8	Comparação do número de espécies descritas na literatura, de cada gênero de <i>Bacillus</i> e linhagens relacionadas isoladas em Bio-Manguinhos, com o número de espécies presentes na base de dados do programa Saramis (VITEK® MS RUO)	69
Tabela 9	Percentual de identificação em nível de gênero e espécie a partir da análise do gene 16S rRNA	70
Tabela 10	Grupos/espécies de bastonetes Gram-positivos menos prevalentes nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos	80
Tabela 11	Quantitativo de linhagens selecionadas para sequenciamento de <i>rpoB</i> e <i>gyrB</i>	112
Tabela 12	Número de espectros de referência e SuperSpectra referentes às linhagens isoladas no presente trabalho inseridas na base de dados do programa Saramis	122

Tabela 13	Resultados de identificação, por MALDI-TOF MS, das linhagens isoladas em Bio-Manguinhos antes e depois da inserção dos SuperSpectra	124
Tabela 14	Resultados de identificação, por MALDI-TOF MS, das linhagens cedidas pela Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) antes e depois da inserção dos SuperSpectra ..	125
Tabela 15	BGPE identificados na rotina do Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) a partir dos SuperSpectra inseridos na base de dados do programa Saramis	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Sorogrupos A e C da bactéria <i>Neisseria meningitidis</i>
ANIB	Do inglês, <i>Average Nucleotide Identity based on BLAST</i>
ANM	Ágar Nutriente-metais
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Ágar Sangue de Carneiro
ATCC	Do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
BD	Base de dados
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BGP	Bastonetes Gram-positivos
BGPE	Bastonetes Gram-positivos esporulados
BLAST	Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CBAS	Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde
CF	Constituição Federal
CG	Cromatografia Gasosa
CHCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
CoV2	Coronavírus 2
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
CTV	Complexo Tecnológico de Vacinas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DPP	Do inglês, <i>Dual Path Platform</i> (Plataforma de Caminho Duplo)
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EIE	Ensaio Imunoenzimático
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
EM	Espectrometria de Massa
E/P1	Gene E (proteína do envelope viral) / Proteína 1
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
FAME	Do inglês, <i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos graxos)

Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
G	Unidade de aceleração
h	Hora
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
Hib	<i>Haemophilus influenzae b</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
L	Litro
MALDI-TOF MS	Do inglês, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/ Mass Spectrometry</i> (Ionização/ Dessorção Assistida por Matriz – Tempo de Vôo/ Espectrometria de Massa)
Mcg	Micrograma
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
MLSA	Do inglês, <i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MLST	Do inglês, <i>Multilocus Sequence Typing</i>
µM	Micromolar
mm	Milímetro
mM	Milimolar
m ³	Metro cúbico
MS	Ministério da Saúde
MUI	Mil Unidades Internacionais
m/z	Massa/carga
NAT	Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos
OMS	Organização Mundial de Saúde
Opas	Organização Pan-Americana de Saúde
P.A.	Para análise
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PNI	Programa Nacional de Imunização
POP	Procedimento Operacional Padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
Seg	Segundo
SNG	Sequenciamentos de Nova Geração
SS	SuperSpectrum
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris-acetato-EDTA
TSA	Ágar triptona de soja
TR	Teste Rápido
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
U	Unidades
UI	Unidades Internacionais
Unicef	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UV	Ultravioleta
ZDC	Zika, Dengue e Chikungunya

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 A Vigilância Sanitária e os imunobiológicos	20
1.2 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos)	21
1.3 Programa de monitoramento ambiental	25
1.4 Monitoramento microbiológico de água	27
1.5 <i>Bacillus</i> e gêneros relacionados.....	31
1.6 Métodos de identificação bacteriana	37
1.6.1 Métodos fenotípicos.....	39
1.6.2 Métodos genotípicos.....	42
1.7 Uso de MALDI-TOF MS na identificação de micro-organismos	44
1.8 Justificativa.....	49
2 OBJETIVOS	52
2.1 Objetivo geral	52
2.2 Objetivos específicos.....	52
3 METODOLOGIA	53
3.1 Linhagens bacterianas.....	53
3.2 Coloração de esporos.....	53
3.3 Caracterização proteômica por MALDI-TOF MS	53
3.4 Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	54
3.5 Sequenciamento do gene <i>rpoB</i>	55
3.6 Sequenciamento do gene <i>gyrB</i>	56
3.7 Construção de árvores filogenéticas.....	57
3.8 Ampliação da BD do programa Saramis	58
3.9 Verificação dos SuperSpectra propostos	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60

4.1 Seleção de bastonetes Gram-positivos esporulados	61
4.2 Análise proteômica por MALDI-TOF MS.....	62
4.3 Análise do gene 16S rRNA	64
4.4 Gêneros identificados nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos.....	66
4.5 Análise filogenética a partir da análise do gene 16S rRNA por gênero.....	82
4.6 Análise filogenética dos genes <i>rpoB</i> e <i>gyrB</i>.....	98
4.7 Inserção dos SuperSpectra referentes às linhagens isoladas em Bio-Manguinhos na BD do programa Saramis	113
4.8 Inserção dos SuperSpectra referentes às linhagens selecionadas da CBAS (IOC/Fiocruz) na BD do programa Saramis.....	120
4.9 Verificação da funcionalidade dos SuperSpectra inseridos na BD do programa Saramis	124
5 CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS.....	131
ANEXO A – POP PARA DIFERENCIAÇÃO DE BACTÉRIAS ESPORULADAS ..	151
ANEXO B – POP PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR ANÁLISE DO GENE 16S rRNA.....	154
APÊNDICE A – LINHAGENS ISOLADAS EM BIO-MANGUINHOS	166
APÊNDICE B – LINHAGENS CEDIDAS PELA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DO AMBIENTE E SAÚDE.....	170

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Vigilância Sanitária e os imunobiológicos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define saúde como “um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não somente ausência de afecções e enfermidades” (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). No Brasil, somente em 1988, a Constituição Federal (CF) assumiu a saúde como um direito social e estabeleceu que o Estado tem o dever de provê-lo, mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação. Assim, a CF de 1988 estabeleceu um Sistema Único de Saúde (SUS), que deve ser constituído por um conjunto de ações e serviços de saúde, prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais, da administração direta e indireta e das fundações mantidas pelo Poder Público (BRASIL, 1990).

Em 1990, a Lei Orgânica da Saúde (Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990) regulou, em todo território nacional, as ações e serviços de saúde, afirmando que a vigilância sanitária é uma das competências do SUS. Portanto, ao SUS compete executar as ações de vigilância sanitária e controlar, fiscalizar procedimentos, produtos e substâncias de interesse para a saúde.

A Lei nº 8.080/1990 define por vigilância sanitária “um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” e que compete ao poder público a execução dessas ações. Portanto, no final da década de 1990, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), com a finalidade de regulamentar o controle e a fiscalização de produtos, desde a produção, até a exposição ao consumo, bem como dos serviços que envolvem riscos à saúde pública. As atividades de vigilância sanitária são de responsabilidade das esferas federal, estadual, e municipal e cabe à Anvisa coordenar essas atividades (BRASIL, 1999).

Dentre os bens e produtos submetidos ao controle e fiscalização sanitária da Anvisa, pode-se destacar os medicamentos de uso humano e os imunobiológicos (BRASIL, 1999). Conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 55, de 16

de dezembro de 2010, produtos biológicos são medicamentos biológicos não novos ou conhecidos que contêm molécula com atividade biológica conhecida, já registrado no Brasil e que tenha passado por todas as etapas de fabricação.

Os produtos biológicos representam a maior fonte de inovação na indústria farmacêutica e tem representado um papel importante no tratamento de várias doenças (ANDRADE et al., 2018). Dentre esses produtos, as vacinas representam uma das maiores conquistas da saúde pública do século passado (VETTER et al., 2018).

As vacinas são medicamentos imunobiológicos que contêm uma ou mais substâncias antigênicas que, quando inoculadas, são capazes de induzir imunidade específica ativa, com o objetivo de proteger contra, reduzir a severidade ou combater a(s) doença(s) causada(s) pelo agente que originou o(s) antígeno(s) (BRASIL, 2011b). Estima-se que evitem a perda de cerca de 2 a 3 milhões de vidas a cada ano. Ao longo da história, com a utilização das vacinas, erradicou-se a varíola e reduziu-se consideravelmente a incidência de várias doenças importantes, como a poliomielite e o sarampo (VETTER et al., 2018).

1.2 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos)

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos é a unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) responsável por pesquisa, inovação, desenvolvimento tecnológico e pela produção de imunobiológicos, reativos para diagnóstico e biofármacos com o objetivo de atender prioritariamente às demandas da saúde pública nacional. O Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV) do Instituto, localizado no campus Manguinhos, é um dos maiores centros de produção da América Latina, garantindo a autossuficiência em vacinas essenciais para o calendário básico de imunização do Ministério da Saúde (MS) (BIO-MANGUINHOS, 2020a).

A Fiocruz é uma organização pública vinculada ao MS que, foi criada em 25 de maio de 1900, com a criação do Instituto Soroterápico Federal, na Fazenda de Manguinhos, localizada na Zona Norte do Rio de Janeiro. Inaugurada com a finalidade de produzir soros e vacinas contra a peste bubônica, a instituição experimentou, desde então, uma intensa trajetória, representando grande papel no desenvolvimento da saúde pública do país. Através da atuação do jovem sanitário Oswaldo Cruz, o Instituto foi responsável pela reforma sanitária, que erradicou a

epidemia de peste bubônica e a febre amarela da cidade (FIOCRUZ, 2020, GADELHA; AZEVEDO, 2003).

Atualmente, a Fiocruz comporta 16 unidades técnico-científicas, situadas na sede no Rio de Janeiro e em outros nove estados brasileiros, cujas atividades estão agrupadas em diversos programas, como: Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico; Ensino em Saúde e Ciência e Tecnologia; Produção de Bens e Insumos para a Saúde; Prestação de Serviços de Referência em Saúde; Informação e Comunicação em Saúde e Ciência e Tecnologia; Desenvolvimento e Gestão Institucional. Além disso, a Fundação conta com um escritório em Maputo, capital de Moçambique, na África (FIOCRUZ, 2020, GADELHA; AZEVEDO, 2003, LEAL, 2004).

A atividade de produção industrial da Fiocruz teve como marco decisivo a criação de Bio-Manguinhos, em 4 de maio de 1976, como uma unidade dedicada à produção de vacinas e reagentes para diagnóstico, através do desmembramento de setores do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), até então, responsáveis pela produção de vacinas e soros. Essa atividade foi extremamente relevante na consolidação e amadurecimento institucional, cumprindo papel crucial na evolução de políticas e práticas na saúde pública brasileira. Para a erradicação da varíola e o controle da febre amarela, foram utilizadas as vacinas produzidas no IOC (GADELHA; AZEVEDO, 2003; LEAL, 2004).

Partindo de um conjunto de pequenos laboratórios, em sua maioria projetados originalmente para pesquisa, o Instituto evoluiu para um complexo industrial e tecnológico dos mais importantes da América Latina, contemplando atualmente uma diversificada linha de produção que inclui imunobiológicos, reagentes para diagnóstico e biofármacos (PONTE, 2007).

Bio-Manguinhos trabalha prioritariamente para atender às demandas do MS na promoção da saúde pública brasileira, através de pesquisa, inovação, desenvolvimento e fornecimento de vacinas, *kits* para diagnóstico e medicamentos biológicos, além da prestação de serviços. Desde 1976, é agente estratégico das políticas públicas de saúde como um dos propulsores do Programa Nacional de Imunizações (PNI) do SUS (BIO-MANGUINHOS, 2019).

Em função da constante modernização de seu parque industrial, o número de vacinas entregues para o PNI aumenta anualmente. Em 2018, Bio-Manguinhos atendeu a 34,77% do mercado público nacional de vacinas, fornecendo mais de 119

milhões de doses de vacinas. Além disso, Bio-Manguinhos forneceu 5,5 milhões de frascos de biofármacos e 6,6 milhões de *kits* para diagnóstico, garantindo à população brasileira acesso gratuito a imunobiológicos de alta tecnologia (BIO-MANGUINHOS, 2020a).

Atualmente, Bio-Manguinhos possui em seu portfólio 45 produtos, produzidos no Campus Manguinhos, no Rio de Janeiro: dez vacinas, 25 *kits* para diagnóstico e dez biofármacos (Quadro 1). Esses produtos são estratégicos para os programas de saúde pública, pois fortalecem a cadeia produtiva, reduzindo o déficit da balança comercial brasileira e racionalizando os gastos do SUS (BIO-MANGUINHOS, 2019; BIO-MANGUINHOS, 2020a).

Bio-Manguinhos disponibilizou, recentemente, quatro *kits* para diagnóstico de COVID-19, doença causada pelo novo coronavírus SARS-CoV2 (Quadro 1). Dois deles são capazes de detectar a carga viral, desde o primeiro dia de aparecimento dos sintomas (*Kits* Moleculares SARS-CoV-2), enquanto os outros dois (*Kits* TR DPP® COVID-19 e TR COVID-19 IgM/IgG) detectam simultaneamente os anticorpos IgM (infecção recente, a partir do 5º dia do início dos sintomas) e IgG (memória imunológica) (BIO-MANGUINHOS, 2020a; BIO-MANGUINHOS, 2020b).

O Instituto também atua internacionalmente, não somente pela exportação do excedente de sua produção para mais de 70 países, através da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e da Fundação das Nações Unidas para a Infância (Unicef), mas também em função do fornecimento da vacina de febre amarela e da vacina meningocócica AC para agências das Nações Unidas, através da OMS. O cumprimento dos requerimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) assim como a certificação de qualidade de seus laboratórios tornam o Instituto extremamente relevante para a melhoria da saúde pública do país (BIO-MANGUINHOS, 2020a).

Quadro 1 – Portfólio da produção de imunobiológicos de Bio-Manguinhos

Vacinas	Biofármacos	Reativos para Diagnóstico
Vacina difteria, tétano, pertussis e Hib (conjugada) (5 doses)	Alfaepoetina (2.000, 4.000 e 10.000 UI)	Ensaio imunoenzimático (EIE) Leishmaniose visceral canina
Vacina febre amarela (atenuada) (5 e 10 doses)	Alfainterferona 2b (3, 5 e 10 MUI)	<i>Helm</i> Teste IFI Leishmaniose humana
Vacina <i>Haemophilus influenzae</i> b (conjugada) (1 e 5 doses)	Alfataliglicerase (200 U)	<i>Imunoblot</i> rápido <i>Dual Path Platform</i> (DPP®) HIV 1/2
Vacina meningocócica AC (polissacarídica) (10 doses)	Betainterferona 1a (22 mcg e 44 mcg)	Imunofluorescência indireta (IFI) Chagas
Vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) (1 dose)	Etanercepte (50 mg)	<i>Kit</i> Molecular SARS-CoV-2 (E/RP)
Vacina poliomielite 1, 3 oral (atenuada) (25 doses)	Golimumabe (50 mg)	<i>Kit</i> Molecular SARS-CoV-2 (EDx)
Vacina poliomielite inativada (10 doses)	Infliximabe (100 mg)	<i>Kit</i> molecular ZDC (zika, dengue e chikungunya)
Vacina rotavírus humano (atenuada) (1 dose)	Rituximabe (100 e 50 mg)	<i>Kit</i> NAT HIV/ HCV/ HBV
Vacina sarampo, caxumba e rubéola - tríplice viral (atenuada) (10 doses)	Somatropina (4 UI e 12 UI)	<i>Kit</i> NAT HIV/HCV/ HBV Malária – NAT PLUS
Vacina sarampo, caxumba, rubéola e varicela - tetraviral (atenuada) (1 dose)	Trastuzumabe (50 mg)	Microleitor DPP® Teste rápido (TR) Chagas TR COVID-19 IgM/IgG TR DPP® Chikungunya IgM/IgG TR DPP® COVID-19 TR DPP® Dengue IgM/IgG TR DPP® HIV/Sífilis Combo TR DPP® HIV-1/ 2 TR DPP® Leishmaniose Canina TR DPP® Leptospirose TR DPP® Sífilis TR DPP® Sífilis DUO TR DPP® ZDC TR DPP® Zika IgM/IgG TR HIV-1/2

Fonte: (BIO-MANGUINHOS, 2019; BIO-MANGUINHOS, 2020a; BIO-MANGUINHOS, 2020b; KONRAD et al., 2020).

Legenda: Hib – *Haemophilus influenzae* b, AC – sorogrupos A e C da bactéria *Neisseria meningitidis*, MUI – mil unidades internacionais, UI – unidades internacionais, U – unidades, HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana, SARS - síndrome respiratória aguda severa, CoV-2 - coronavírus 2, E/Rp – gene E (proteína do envelope viral)/RNase P, Edx – ensaio duplex, IgM – imunoglobulina M, IgG – imunoglobulina G, NAT – teste de amplificação de ácidos nucleicos, HBV – vírus da hepatite B, HCV – vírus da hepatite C, COVID-19 – Doença do Coronavírus 2019.

1.3 Programa de monitoramento ambiental

Conforme já demonstrado, historicamente, a utilização de vacinas tem se mostrado a maneira mais eficaz de prevenção a doenças. Durante o processo de produção de vacinas, rígidas normas devem ser seguidas para que sejam obtidos produtos seguros (ANDRADE et al., 2018).

Uma grande variedade de produtos rotulados como estéreis é fabricada por processamento asséptico, em vez de esterilização terminal. Os imunobiológicos fazem parte do grupo de produtos estéreis que não podem ser obtidos através de esterilização terminal, em função de sua natureza termossensível. A produção asséptica depende da eliminação de micro-organismos do processo e da prevenção da introdução microbiana em recipientes abertos durante a fabricação. Por isso, a biocarga do produto, bem como a biocarga do ambiente produtivo são fatores essenciais, que tornam o risco de contaminação microbiana inaceitável (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020).

A RDC da Anvisa nº 301, publicada em 21 de agosto de 2019 dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos e estabelece os requisitos mínimos a serem adotados na sua produção, de modo que os produtos sejam fabricados e controlados consistentemente com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requeridos pelo registro.

O cumprimento das BPF está direcionado primeiramente à diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica. Por isso, um programa de monitoramento ambiental é considerado um dos principais elementos para se garantir que áreas de produção asséptica estejam sendo mantidas dentro dos níveis de controle adequados (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020). O monitoramento ambiental consiste em um conjunto de medidas que garantem a qualidade do ambiente onde são produzidos os medicamentos com os padrões de qualidade exigidos. Estas medidas contemplam desde o controle do ar que circula em áreas limpas, utensílios e materiais envolvidos na fabricação dos medicamentos até o controle dos operadores que participam de todo o processo (BRASIL, 2013b).

Produtos de uso parenteral, como aqueles produzidos em Bio-Manguinhos, devem ser produzidos em áreas, onde as condições ambientais diminuam a introdução, a geração e a retenção de contaminação em seu interior. Estes ambientes são denominados “salas limpas” (BRASIL, 2019b). De acordo com a

criticidade da etapa de produção, as salas limpas são classificadas em graus A, B, C ou D, podendo ou não apresentar microbiota associada (BRASIL, 2013b).

Em áreas grau A, ocorrem as etapas produtivas de alto risco de contaminação do produto, como a preparação e o envase asséptico. Normalmente, estas operações devem ser realizadas sob fluxo unidirecional ou isolador. Estas áreas são circundadas por áreas grau B. Já as áreas classificadas como graus C e D são áreas limpas onde são realizadas etapas menos críticas na fabricação de produtos estéreis. Em áreas grau C, ocorre a preparação de soluções a serem filtradas; já em áreas grau D, realiza-se o manuseio de materiais após lavagem (BRASIL, 2019a).

Para cumprir com os requisitos de BPF vigentes para a fabricação de medicamentos, a classificação de uma área limpa deve ser determinada de acordo com a quantidade de partículas totais e viáveis em duas diferentes condições de realização dos testes: “em operação” (condição em que a área está em funcionamento para uma operação definida e com um número especificado de pessoas presentes) e “em repouso” (condição onde a instalação está finalizada, os equipamentos e produção instalados e em funcionamento, porém não existem pessoas presentes). Além das condições de realização dos testes, determinam-se os critérios de limites de partículas totais de duas dimensões definidas (0,5 e 5,0 μM) e os limites de contaminação microbiana (BRASIL, 2013b, BRASIL, 2019a).

Os guias de BPF contemplam quatro diferentes metodologias utilizadas para o monitoramento microbiológico em salas limpas: amostragem volumétrica do ar (monitoramento ativo), placas de sedimentação (monitoramento passivo), placas de contato (monitoramento de superfícies) e amostragens para avaliação de micro-organismos presentes na superfície dos dedos de luvas de operadores. Quando os limites microbianos recomendados para o monitoramento ambiental de partículas viáveis (Tabela 1) for excedido, ações corretivas devem ser tomadas, para evitar a propagação da contaminação (BRASIL, 2013b, BRASIL, 2019a).

Tabela 1 – Limites recomendados para o monitoramento microbiológico de áreas limpas durante a operação

Grau	Amostra volumétrica ativa (UFC/m³)¹	Placas de sedimentação² (UFC/4 h)	Placas de contato³ (UFC/placa)	Luva – 5 dedos (UFC/luva)⁴
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	--
D	200	100	50	--

Fonte: (BRASIL, 2019a).

Legenda: 1 – UFC: unidades formadoras de colônia; 2 – Diâmetro: 90 mm; 3 – Diâmetro: 55 mm; 4 – O limite é o mesmo para luvas direita e esquerda, ambas devem ser testadas.

Para que um programa de monitoramento ambiental seja eficiente, deve conter um nível adequado de identificação da microbiota amostrada, de modo a garantir a avaliação da eficácia de procedimentos de sanitização e limpeza, assim como, das metodologias analíticas utilizadas para análise de produtos acabados e insumos. As informações provenientes da identificação dos micro-organismos também podem ser de extrema relevância na investigação de fontes de contaminação microbiana de um produto ou processo, especialmente quando os limites especificados são excedidos (SAKHNO; GUNAR, 2016; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020).

1.4 Monitoramento microbiológico de água

A água é o insumo mais amplamente utilizado na fabricação de produtos farmacêuticos. Na indústria farmacêutica, a água pode ser usada como reagente, ingrediente ou veículo. No entanto, existem fórmulas nas quais a água faz parte da composição do produto, tornando essencial que a qualidade atenda às especificações de uso (SILVA et al., 2019).

Conforme a Farmacopeia Brasileira (2019), “são considerados como água para uso farmacêutico os diversos tipos de água empregados na síntese de fármacos, na formulação e produção de medicamentos, em laboratórios de ensaios, diagnósticos e demais aplicações relacionadas à área da saúde, inclusive como principal componente na limpeza de utensílios, equipamentos e sistemas”.

Os diferentes tipos de pureza da água apresentam suas próprias características microbiológicas, que são relacionadas ao método e ao grau de purificação, assim como a sua estocagem e distribuição (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Basicamente, há três tipos de água para uso farmacêutico: água purificada; água para injetáveis e água ultrapurificada. Além destas, é importante considerar água potável, que é amplamente utilizada e tem aplicação direta em instalações farmacêuticas (COSTA, 2014; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). Consideraremos neste trabalho, somente os tipos de água utilizados nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos.

Água potável é um tipo de água comumente utilizada pela indústria farmacêutica (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Apresenta-se como ponto de partida para qualquer processo de purificação de água para fins farmacêuticos, sendo obtida por tratamento da água retirada de mananciais, através de processos apropriados, a fim de atender às especificações da legislação brasileira referentes aos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e radioativos, conforme um determinado padrão de potabilidade (COSTA, 2014). A Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde define os limites microbianos para água potável.

Água purificada é a água potável que passou por algum tipo de tratamento para a eliminação dos possíveis contaminantes, de forma a atender aos requisitos de pureza estabelecidos nos compêndios oficiais. Geralmente, é utilizada na preparação de medicamentos não-estéreis tópicos e orais, assim como nos processos de granulação de comprimidos e cápsulas. Pode, também, ser utilizada na obtenção de água para injeção (BRASIL, 2013a; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Água para injetáveis é a água de mais alta qualidade usada pela indústria farmacêutica, sendo empregada como veículo na preparação de medicamentos de administração parenteral. Para esta água ser utilizada com segurança, deve ser estéril no momento da reconstituição do produto e ser isenta, ou conter baixa concentração de endotoxina bacteriana, evitando assim, a ocorrência de efeitos farmacológicos adversos. As endotoxinas são complexos de alto peso molecular associados à membrana externa de bactérias Gram-negativas e representam a mais

significativa fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica (BRASIL, 2013a; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

O Quadro 2 contém um resumo dos testes microbiológicos exigidos para os tipos de água para uso farmacêutico, utilizadas em Bio-Manguinhos, e os limites estabelecidos para cada um deles.

Quadro 2 - Testes microbiológicos e os limites estabelecidos para água potável, água purificada e água para injetáveis

Tipos de Água	Testes Microbiológicos	Limites
Água potável	Contagem do número total de bactérias heterotróficas	500 UFC/mL
	<i>Escherichia coli</i>	Ausente
Água purificada	Contagem do número total de bactérias heterotróficas	100 UFC/mL
	Pesquisa de coliformes totais e fecais	Ausente
	Pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente
Água para injetáveis	Contagem do número total de bactérias heterotróficas	10 UFC/100 mL
	Pesquisa de coliformes totais e fecais	Ausente
	Pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente

Fonte: (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; BRASIL, 2011a).
UFC: unidades formadoras de colônias.

Em função de suas propriedades químicas, a água pode dissolver, absorver, adsorver ou manter em suspensão muitos compostos diferentes, incluindo contaminantes. Portanto, a água utilizada na fabricação de medicamentos precisa ser de alta pureza e é de grande importância que o controle de qualidade da mesma seja realizado, de modo a identificar contaminantes que possam interferir em sua qualidade, comprometendo assim a eficácia e a qualidade dos medicamentos produzidos (GUNASEELAN; VISWANATHAN, 2019; SILVA et al., 2019).

O processo de purificação da água para uso farmacêutico baseia-se na exclusão de impurezas físico-químicas, biológicas e microbiológicas, de modo que os níveis de qualidade prescritos pelas autoridades sanitárias nos compêndios oficiais sejam cumpridos (BRASIL, 2013a).

Os contaminantes microbianos são representados, principalmente, por bactérias originárias da própria microbiota da fonte de água e, também, de alguns equipamentos de purificação. Podem surgir, também, devido a procedimentos de limpeza e sanitização inadequados, os quais levam à formação de biofilmes e, conseqüentemente, instalam um ciclo contínuo de crescimento a partir de compostos orgânicos, que se tornam nutrientes para os micro-organismos. As bactérias podem afetar a qualidade da água, através da inativação de reagentes ou alteração de substratos por ação enzimática, aumentando, assim, o conteúdo em carbono orgânico total e produzindo pirogênios (qualquer substância capaz de induzir elevações térmicas) e endotoxinas (COSTA, 2014).

Os biofilmes são agregados celulares aderidos uns aos outros e/ou a superfícies, através de polímeros extracelulares produzidos pelos próprios micro-organismos constituintes daquela comunidade. Essas estruturas são constituintes onipresentes dos ambientes aquáticos e são compostas por uma mistura de algas, fungos e bactérias. Os biofilmes são de fácil remoção na fase inicial, porém de difícil remoção quando maduros, podendo se tornar um suprimento de nutrientes para outras bactérias. Dentre os gêneros bacterianos mais frequentemente encontrados em amostras de sistemas de água, pode-se destacar *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas* e *Methylobacterium* (GALLAGHER; REISINGER, 2019; GUNASEELAN; VISWANATHAN, 2019).

O controle de qualidade microbiológico de água deve ser prioridade nas companhias farmacêuticas (BRASIL, 2013a, SANDLE, 2015), já que alguns tipos de micro-organismos são capazes de proliferar nos diversos componentes dos sistemas de tratamento e de distribuição da água para uso farmacêutico. Diante disso, torna-se fundamental a busca de tecnologias e ações capazes de minimizar a contaminação microbiológica deste insumo (BRASIL, 2013a).

1.5 *Bacillus* e gêneros relacionados

Vários grupos bacterianos podem estar presentes como contaminantes de áreas limpas. *Bacillus* e gêneros relacionados (bastonetes Gram-positivos esporulados - BGPE) são descritos como um dos principais grupos bacterianos isolados destes ambientes (SOUZA, 2011).

Souza (2011) demonstrou que de 83 isolados provenientes de testes de esterilidade de produtos farmacêuticos e do monitoramento ambiental da sala onde os testes são realizados, todas as espécies bacterianas identificadas através da análise do gene 16S rRNA pertenciam aos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Lysinibacillus*, *Cohnella*, *Oceanobacillus* e *Paenisporosarcina*.

Conforme Hirai (2014), espécies do gênero *Bacillus* são comumente isoladas de salas limpas, podendo ser introduzidas nessas áreas, por meio de pessoas, partículas ou transferência de materiais (SANDLE, 2011). Pacheco e Pinto (2010) coletaram amostras de 50 salas limpas de uma companhia farmacêutica de São Paulo. Cerca de 13.700 micro-organismos foram isolados a partir do monitoramento ativo e passivo do ar, monitoramento de superfícies, utilizando-se *swabs* e placas de contato e monitoramento das luvas dos operadores; e identificados através do sistema comercial FAME (éster metílico de ácidos graxos). Os pesquisadores demonstraram que *Bacillus subtilis* foi a espécie mais isolada de áreas de grau A; *Micrococcus luteus* foi a mais isolada de áreas de grau B; *Staphylococcus cohnii* de grau C e *Staphylococcus hominis* de grau D. Espécies de *Bacillus* e de *Brevibacillus* compreendiam o grupo das espécies bacterianas mais frequentemente isoladas (80%), sendo obtidas de áreas de grau A (*Bacillus oleoroniensis* e *B. subtilis*) e de grau B (*Bacillus sphaericus* e *Brevibacillus brevis*) (PACHECO; PINTO, 2010).

Sena (2014) avaliou o perfil microbiológico presente em áreas classificadas da Seção de Envasamento e Acondicionamento de Soros e Vacinas desenvolvidos no Instituto Butantan e suas possíveis fontes de contaminação. Os micro-organismos mais frequentemente associados à amostragem nas áreas de produção (graus A, B, C e D) foram *Staphylococcus* spp., *Micrococcus luteus* e *Bacillus* spp. A identificação foi realizada por meio do sistema automatizado VITEK®. O monitoramento de operadores e de partículas viáveis em operação representaram os pontos com maior frequência de contaminação.

Já Medeiros (2015) utilizou diferentes métodos para identificar bactérias isoladas das áreas produtivas de Bio-Manguinhos de 2010 a 2014. Utilizando o *kit* BBL Crystal, VITEK2®, VITEK® MS e *kit* MicroSEQ® 500, foram identificadas 5.842 linhagens, onde os gêneros mais encontrados foram *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp. e *Bacillus* spp. Do total de BGPE identificados, o gênero *Bacillus* representou 67% dos isolados. Além deste gênero, foram encontrados *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* e *Terribacillus*.

Em um trabalho de revisão sobre o tema, Sandle (2011) avaliou os tipos de micro-organismos isolados de áreas limpas pertencentes a estabelecimentos farmacêuticos produtores de sangue e plasma, localizados na Inglaterra e no País de Gales, entre 2001 e 2009. O autor demonstrou que de 6.729 micro-organismos isolados a partir do monitoramento ambiental de áreas limpas graus A e B, 13% pertenciam ao grupo dos BGPE. No mesmo trabalho, Sandle (2011) demonstrou que de 2.500 micro-organismos isolados a partir do monitoramento ambiental de áreas produtivas graus C e D, 10% pertenciam a esse grupo bacteriano.

Abreu, Pinto e Oliveira (2003) realizaram diversas amostragens em áreas limpas graus B, C e D e demonstraram que os micro-organismos mais encontrados, a partir do monitoramento ativo do ar e do monitoramento de superfícies, utilizando-se placas de contato, foram: *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus haemolyticus*. No total, estes micro-organismos representaram, aproximadamente, 80% das determinações, sendo *Bacillus* spp. encontrado em 28,67% das amostragens realizadas. As bactérias isoladas foram identificadas utilizando-se o sistema automatizado VITEK®.

Wu e Liu (2007) demonstraram que os principais gêneros isolados de áreas limpas de uma unidade farmacêutica foram *Staphylococcus*, *Microbacterium* e *Bacillus*. Estes micro-organismos foram isolados a partir de monitoramento do ar, *swab* de superfícies e monitoramento das luvas dos operadores, e a sua identificação foi feita a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Bottale, Riera e Rabinovitch (2015) identificaram a carga microbiana ambiental presente em uma unidade de produção de vacinas localizada na Argentina e observaram que os micro-organismos encontrados com mais frequência nas áreas classificadas foram: *Staphylococcus* spp. (49,5%), *Micrococcus* spp. (23,0%) e *Bacillus* spp. e gêneros relacionados (8,1%). Além do gênero *Bacillus*,

foram encontradas espécies dos gêneros *Alycyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Lysinibacillus* e *Virgibacillus*. Os micro-organismos foram identificados a partir de sistema automatizado VITEK®. Os isolados de difícil identificação foram enviados ao laboratório de Fisiologia Bacteriana do IOC/Fiocruz para confirmação da espécie.

Já Seuylemezian et al. (2018) isolaram 454 micro-organismos a partir de áreas limpas para montagem de naves espaciais e os identificaram a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA: 85% das sequências foram identificadas como *Bacillus*, 3,3% como *Brevibacterium*, 3,8% como *Staphylococcus* e 7,9% como outros 11 gêneros.

Conforme demonstrado acima, as bactérias Gram-positivas são comuns em ambientes de produção farmacêutica, mas não em sistemas de água, pois, geralmente, não são capazes de sobreviver em ambientes líquidos com alto grau de pureza química, como um sistema de água de grau farmacêutico. Tanto as bactérias formadoras de esporos do gênero *Bacillus*, que são comumente encontradas no solo e em partículas de poeira, quanto gêneros bacterianos não esporulantes, como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Micrococcus*, que normalmente colonizam a pele e as mucosas humanas, não são encontradas com facilidade nesse tipo de ambiente. (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020). Apesar disso, Costa et al. (2017) demonstraram que de 13 isolados bacterianos obtidos a partir de um ponto de água potável em uma unidade farmacêutica do Rio de Janeiro, 44,5% das linhagens recuperadas foram identificadas como *Bacillus cereus*, 33,3% como *Delftia acidovorans* e 22,2% como *Acinetobacter* sp. Dentre os 63 isolados a partir do ponto de água purificada, das espécies bacterianas recuperadas, aquelas mais encontradas eram pertencentes ao grupo dos Gram-negativos, como *D. acidovorans* (59,5%), *Pseudomonas* sp., (11,9%), *Stenotrophomonas maltophilia* (7,1%), *Burkholderia* sp. (4,8%), *Pseudomonas oryzae* (2,4%) e *Pseudomonas putida* (2,4%). No entanto, outras espécies, pertencentes ao grupo das bactérias Gram-positivas também foram encontradas, como: *Staphylococcus warneri* (7,1%), *Staphylococcus epidermidis* (2,4%) e *B. cereus* (2,4%). Os micro-organismos foram identificados por VITEK® MS.

Conforme Sandle (2015), em uma revisão sobre o tema, vários tipos de micro-organismos podem ser encontrados em águas do tipo grau farmacêutico, cuja origem é a água potável fornecida. O autor demonstrou que, de 201 amostras de água potável coletadas entre 2010 e 2014, 501 micro-organismos foram

identificados. As principais espécies de bactérias encontradas foram aquelas classificadas como Gram-negativas, como: *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Moraxella*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* e *Methylobacterium*. Os gêneros de bactérias Gram-positivas isolados foram: *Bacillus* e *Micrococcus*. No mesmo trabalho, o autor demonstrou que de 315 amostras de água purificada coletadas no mesmo período, 347 isolados foram recuperados, cujos gêneros identificados foram: *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Flavimonas*, *Stenotrophomonas* e *Ochrobactrum*, ou seja, apenas gêneros compostos por espécies Gram-negativas. De 300 amostras de água para injetáveis, 347 isolados bacterianos foram recuperados, não sendo encontradas espécies Gram-positivas. Os isolados foram identificados por duas metodologias fenotípicas: sistema API (bioMérieux) e sistema Omnilog (Biolog).

Os BGPE aeróbios eram classificados, até o ano 2000, somente como pertencentes à família *Bacillaceae*, que por sua vez, compreendia apenas três gêneros: *Thermoactinomyces* (bactérias com hifas ramificadas); *Sporolactobacillus* (bactérias isoladas de ração para frango e de rizosferas de plantas) e *Bacillus* (compreendia todos os outros bastonetes aeróbios esporulados). Logo, até o início dos anos 2000, o gênero *Bacillus* incluía, uma vasta e heterogênea coleção de bastonetes amplamente distribuídos no ambiente (SOUZA, 2011). A aplicação de métodos moleculares no estudo da sistemática de *Bacillus* e de gêneros relacionados representou imenso impacto na classificação desse gênero. Por isso, várias espécies de *Bacillus* têm sido descritas, revisadas ou reclassificadas em novos gêneros (LOGAN et al., 2009; RAO et al., 2019; SOUZA, 2011; WOO et al., 2008). No entanto, o gênero *Bacillus* ainda contempla uma grande diversidade de espécies de micro-organismos, sendo o grupo mais heterogêneo, considerando-se aspectos genotípicos e fenotípicos (ELSHAGHABEE et al., 2017). As espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados possuem parede celular característica de bactérias Gram-positivas, apesar de apresentarem coloração Gram-positiva (em culturas jovens), Gram-variável ou Gram-negativa. As espécies podem ser aeróbias ou aeróbias facultativas (LOGAN et al., 2009; ZHOU et al., 2014).

Por serem capazes de formar esporos, os *Bacillus* e gêneros relacionados resistem a altas e baixas temperaturas e a sanitizantes comuns, o que permite a sua sobrevivência em diversos ambientes por longos períodos (CELANDRONI et al., 2016).

Os esporos bacterianos são produzidos na natureza como um meio de subsistir em condições ambientais extremas, onde as células vegetativas não conseguiriam. Quando ocorre o declínio de nutrientes nas imediações, a bactéria entra em um programa irreversível de desenvolvimento, que resulta na produção de esporos em cerca de 8 h. A estrutura do endosporo bacteriano contém, em sua essência, um cromossomo inativo. Camadas adicionais revestem o esporo, incluindo um córtex rico em peptidoglicano e uma ou mais camadas de material proteico, que protegem a estrutura da radiação UV, de temperaturas extremas, exposição a solventes, peróxido de hidrogênio e enzimas como lisozima. O esporo em si é desidratado e, quando exposto a nutrientes apropriados, germina e retoma o crescimento celular vegetativo, após a entrada de água e, conseqüente, quebra e remoção de suas camadas (CUTTING, 2011; NICHOLSON et al., 2000).

Portanto, um endosporo bacteriano é uma forma metabolicamente dormente de vida que é muito mais resistente a calor, dessecação, ausência de nutrientes, exposição à radiação UV e gama, produtos químicos orgânicos, e agentes oxidantes do que uma célula vegetativa (CHECINSKA et al., 2015).

A ubiquidade de esporos de *Bacillus* no solo, na água e no ar facilita a sua transferência a outros ambientes, como áreas que requerem baixos índices de contaminação microbiana exigidos por muitas indústrias, como salas limpas utilizadas em produção farmacêutica e de alimentos (CHECINSKA et al., 2015, STAROSTIN et al., 2015). Além disso, algumas espécies de *Bacillus* produzem esporos altamente hidrofóbicos capazes de aderir a vários substratos inertes (KORENBLUM et al., 2008).

Muitas espécies de bactérias, incluindo os *Bacillus*, são capazes de produzir biofilmes, que são agregados celulares aderidos a superfícies, os quais formam comunidades espacialmente organizadas dentro de uma matriz de produção própria, composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), conforme já descrito anteriormente. Os biofilmes representam sérios desafios para a indústria de alimentos e para a indústria farmacêutica, uma vez que permitem que as bactérias possam aderir a vários tipos de superfícies (plástico, polipropileno, aço inoxidável, vidro, borracha, etc.) em poucos minutos, e formar biofilmes maduros dentro de vários dias ou até dentro de algumas horas. Esse modo de vida sésil representa uma excelente estratégia de sobrevivência para micro-organismos, pois os protege contra estressantes condições ambientais comumente encontradas em habitats

naturais e artificiais. Uma vez que o biofilme foi produzido, torna-se muito difícil a sua eliminação, o que representa um grande problema para as indústrias de alimento e farmacêutica (REWAK-SOROCZYNSKA et al., 2019; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020; YUAN et al., 2019).

Várias espécies do gênero *Bacillus* têm sido estudadas, em função de suas potencialidades probióticas (ADIBPOUR; HOSSEININEZHAD; PAHLEVANLO, 2018), pois possuem maior tolerância à acidez estomacal, melhor estabilidade durante processos de aquecimento e baixas temperaturas de estocagem em comparação às bactérias ácido-láticas, normalmente utilizadas com esta finalidade (ELSHAGHABEE et al., 2017; SOARES et al., 2019). Probióticos são micro-organismos vivos que oferecem benefícios à saúde de vários hospedeiros (YIFANG et al., 2020). Além disso, *Bacillus* spp. apresentam habilidades anti-oxidantes, antimicrobianas e imuno-moduladoras e têm sido utilizados na produção de amilase, glicoamilase, protease, pectinase e celulase em alimentos variados e na produção de vitaminas e de carotenoides (ELSHAGHABEE et al., 2017).

Poucas espécies de *Bacillus* e de gêneros relacionados são consideradas clinicamente relevantes. *Bacillus anthracis* é o agente etiológico da doença frequentemente letal antraz e *B. cereus* é uma espécie comumente conhecida por causar intoxicações de origem alimentar e também causar infecções locais e sistêmicas. As outras espécies não apresentam significado clínico. No entanto, estudos recentes indicam que esses organismos podem ser responsáveis por infecções locais ou sistêmicas em humanos (CELANDRONI et al., 2016). Mursalin et al. (2019) reportaram a presença de espécies de *Bacillus* como agentes causadores da endoftalmite. Já Ferrand et al. (2013) descreveram caso de endocardite causada por *Paenibacillus glucanolyticus* em paciente de 65 anos com diabetes tipo 2, relacionada a dispositivo cardíaco. Idelevich et al. (2013) relataram bacteremia associada ao uso de marcapasso, causada por *Bacillus licheniformis* em paciente imunocompetente de 42 anos.

Vários autores têm demonstrado a associação entre espécies de *Bacillus* e a produção de biossurfactantes, que são compostos anfipáticos de superfície ativa, que desempenham um papel importante na solubilização de compostos insolúveis, na ligação de metais pesados, em patogênese bacteriana, adesão e agregação celular, *quorum sensing* e produção de compostos antimicrobianos e anti-biofilme. Essas propriedades ampliaram bastante as aplicações de biossurfactantes nas

indústrias alimentícia, farmacêutica e de petróleo nas últimas cinco décadas, especialmente como alternativas aprimoradas aos surfactantes químicos. Estudos demonstraram as propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e anti-adesivas destes compostos, o que os torna uma alternativa aos antibióticos convencionais contra vários patógenos de origem alimentar (DONIO et al., 2013; GIRI et al., 2019; SHARMA; SAHARAN, 2016).

1.6 Métodos de identificação bacteriana

Os ensaios microbiológicos são muito importantes no controle de qualidade de produtos e insumos farmacêuticos, pois a contaminação microbiana pode resultar em alterações em suas propriedades físicas e químicas, afetando assim, a qualidade do produto e a segurança do consumidor (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). Identificar a microbiota detectada é fundamental para que sejam investigadas as fontes de contaminação, possibilitando assim a tomada de ações preventivas e corretivas (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020).

A caracterização rotineira de micro-organismos inclui, normalmente, a determinação da morfologia das colônias, das células, coloração de Gram ou outras técnicas de coloração diferencial e certas reações bioquímicas importantes, como atividade de oxidase, catalase e coagulase. Esse nível de identificação é suficiente para muitos propósitos de avaliação de risco em operações de fabricação farmacêutica não estéril e em alguns ambientes de fabricação de produtos estéreis. No entanto, em alguns casos, torna-se necessária uma identificação microbiana mais definitiva, incluindo informações em nível de gênero e de espécie. Existem, inclusive, metodologias disponíveis para realizar a identificação em nível de linhagem, o que pode ser extremamente útil para a determinação da fonte do micro-organismo. A identificação é comumente realizada quando os micro-organismos são recuperados a taxas atipicamente altas ou em números que excedem os níveis recomendados para categorias específicas de produtos. A caracterização microbiana também é necessária quando ocorre contaminação nas simulações de envase asséptico ou, em caso, de resultados positivos nos testes de esterilidade (ANDRADE et al., 2018; SAKHNO; GUNAR, 2016; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020).

Muitas tecnologias voltadas à identificação microbiana têm sido

desenvolvidas, nos últimos anos, de modo a aperfeiçoar a eficiência do processo, reduzir custos, reduzir a sensibilidade das metodologias e aumentar a qualidade dos resultados analíticos. Nos estágios iniciais deste processo evolutivo, a pesquisa foi direcionada e aplicada na área clínica, para identificar e corrigir a antibioticoterapia. Posteriormente, grandes esforços foram feitos na área de alimentos, já que a natureza e a origem dos insumos utilizados neste segmento oferecem a possibilidade de uma ampla gama de contaminantes. Atualmente, a busca por metodologias alternativas e rápidas tem se direcionada à área farmacêutica, o que demonstra ser uma tendência irreversível. Porém, o ambiente altamente regulado em que trabalha a indústria farmacêutica, sua característica conservadora e a necessidade de rígidos requisitos de validação têm atrasado a implementação de novas tecnologias e formas de trabalho. Apesar disso, sistemas de identificação bacteriana automatizados, baseados em reações bioquímicas têm sido adotados, devido ao aumento da quantidade de testes para identificação como reflexo da maior rigidez nas exigências regulatórias (ANDRADE et al., 2018; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020).

A maior parte dos ensaios atualmente realizados nos laboratórios de microbiologia farmacêutica ainda tem como base métodos antigos desenvolvidos por microbiologistas pioneiros, como Pasteur, e se fundamentam em diluição seriada e na recuperação utilizando meios de cultura estéreis, sólidos ou líquidos para permitir o crescimento microbiano. Os ensaios microbiológicos tradicionais são eficientes, simples e de baixo custo. Por outro lado, apresentam como limitações: longo tempo para liberação dos resultados, baixa seletividade dos meios de cultura e variabilidade inerente à resposta biológica dos micro-organismos. Além disso, as metodologias convencionais, muitas vezes, não são capazes de identificar diversas espécies bacterianas que podem atuar como contaminantes de ambientes industriais farmacêuticos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; MEDEIROS, 2015; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Muitos sistemas de identificação possuem bases de dados direcionadas para micro-organismos de interesse clínico, sendo mais limitadas em relação à microbiota farmacêutica e industrial. Frequentemente, estas espécies são de origem ambiental e, devido a sua diversidade em vários aspectos, como fisiologia e requerimentos nutricionais, nem sempre seus perfis metabólicos estão contemplados nos bancos

de dados dos sistemas de identificação utilizados (ANDRADE et al., 2018; CELANDRONI et al., 2016; COSTA et al., 2017; SOUZA, 2011). Os sistemas de identificação microbiológica são baseados em diferentes metodologias analíticas e as limitações podem ser inerentes ao método e/ou aos bancos de dados. A identificação, normalmente, é realizada combinando características (genotípicas e/ou fenotípicas) do micro-organismo de interesse frente a um micro-organismo padrão (referência) estabelecido, como uma linhagem tipo. Se um micro-organismo não estiver incluído no banco de dados, ele não será identificado, logo é importante avaliar quais sistemas de identificação microbiológica são mais aplicáveis nos testes rotineiros de identificação microbiológica, considerando essas limitações e o nível de identificação exigido (gênero, espécie, linhagem) (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020).

A identificação de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados por métodos clássicos é particularmente difícil, devido a similaridades entre espécies estreitamente relacionadas, que compartilhem do mesmo padrão morfológico, bioquímico e genético (CELANDRONI et al., 2016; CUNHA et al., 2006; SAKHNO; GUNAR, 2016; SOUZA, 2011). A associação de técnicas fenotípicas e genotípicas, ou seja, uma abordagem polifásica permite uma avaliação mais fidedigna das relações taxonômicas e filogenéticas das bactérias, permitindo, inclusive, a descoberta de novas espécies (SELDIN; DUBNAU, 1985; STAROSTIN et al., 2015) ou de espécies sinônimas (ROSADO; VAN ELSAS; SELDIN, 1997).

1.6.1 Métodos fenotípicos

Os métodos fenotípicos utilizam os produtos da expressão gênica para distinguir entre diferentes micro-organismos e requerem um grande número de células em culturas puras. No entanto, alguns micro-organismos ambientais não podem ser recuperados através da utilização dos meios de cultura utilizados, em geral. Além disso, micro-organismos estressados e recentemente isolados podem não expressar plenamente suas propriedades fenotípicas, o que poderá comprometer a identificação por métodos fenotípicos. Dentre eles, os ensaios bioquímicos estão entre as metodologias mais utilizadas em laboratórios de controle microbiológico (COSTA, 2014; PETTI; POLLAGE; SCHREKENBERGER, 2005; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020).

Os ensaios bioquímicos são, geralmente, precedidos pela coloração de Gram, ou outra forma de diferenciação, para que se decida sobre o protocolo mais adequado a seguir. Suspensões de células microbianas são submetidas a reações bioquímicas, a partir de substratos fornecidos e reagentes utilizados, pois os micro-organismos apresentam reações específicas, quando utilizam determinadas fontes de nutrientes. A identificação da colônia de interesse é obtida após a comparação do perfil de reação bioquímica com uma base de dados. A manipulação dos sistemas disponibilizados, normalmente é simples, porém a interpretação dos resultados pode ser subjetiva. Dentre as metodologias manuais, pode-se destacar as galerias API (bioMérieux) e o sistema BBL™Crystal™; dentre os sistemas automatizados, pode-se destacar OmniLog ID® (Biolog®) e VITEK® 2 Compact (bioMérieux). O sistema VITEK® é bastante utilizado nos laboratórios de microbiologia e compreende diferentes cartões de identificação para tipos particulares de micro-organismos, sendo a coloração de Gram do isolado fundamental para assegurar que o cartão de teste correto seja utilizado (COSTA, 2014; GUO et al., 2014; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SAKNHO; GUNAR, 2016; UNITED STATES PHARMACOPOLY, 2019).

Dados da literatura demonstraram, também, a utilização de metodologia de identificação bacteriana baseada no perfil de ácidos graxos, cuja composição nos micro-organismos apresenta-se estável e demonstra alto nível de correlação com determinados grupos taxonômicos. O ensaio é realizado, semeando-se o micro-organismo de interesse em meio de cultura padrão. Após crescimento, ocorrem as etapas de saponificação, metilação e extração dos ácidos graxos. Os ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos são, então, quantificados por cromatografia gasosa (CG) de alta resolução e os resultados comparados com uma base de isolados conhecida. Esta metodologia requer alto grau de padronização das condições de cultivo, incubação e operação do cromatógrafo a gás. Como exemplo, pode-se citar o sistema de identificação microbiana Sherlock® (MIDI), que utiliza um sistema automatizado de CG (MANASI et al., 2018; PACHECO; PINTO, 2010; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SAKNHO; GUNAR, 2016).

Os métodos imunológicos também podem ser utilizados, já que são capazes de detectar componentes celulares únicos de determinados micro-organismos, logo não indicam necessariamente a presença de organismos viáveis. Estes métodos são simples, baratos e podem ser usados para análises qualitativas e quantitativas. Dentre os ensaios imunológicos, pode-se destacar metodologias associadas a

reações de aglutinação e testes de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA, ensaio de imunoabsorção ligado à enzima) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SAKNHO; GUNAR, 2016).

ELISA é um ensaio analítico sensível e específico utilizado para detecção e/ou quantificação de um analito sem a necessidade de equipamentos caros e sofisticados. O analito pode ser qualquer substância específica, uma proteína ou uma mistura mais complexa, como um complexo biomolecular. A amostra contendo o antígeno é imobilizada em um suporte sólido (placas para microtitulação). Em seguida, um anticorpo ligado a uma enzima é adicionado e forma um complexo com o antígeno. Adiciona-se, então, um substrato enzimático que produz um sinal visível, geralmente, por mudança de cor, o que indica a presença de antígeno na amostra. Aplicam-se, então, fórmulas matemáticas que comparam a densidade óptica obtida para a amostra a um padrão conhecido, de modo a quantificar indiretamente o analito de interesse (AYDIN, 2015; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; KONSTANTINOU, 2017).

A espectrometria de massa (EM) também tem sido utilizada na identificação de micro-organismos, sendo a técnica mais encontrada em laboratórios clínicos que farmacêuticos. A tecnologia *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) já se apresenta como uma das mais promissoras para a caracterização quimiotaxonômica de micro-organismos, em alternativa aos métodos genotípicos. A principal vantagem deste método é a velocidade de análise da amostra, que se processa em apenas alguns minutos (LAY JR., 2001; LV et al., 2016; SAKNHO; GUNAR, 2016; SUTTON; CUNDELL, 2004).

A EM possibilita a determinação e identificação de estruturas químicas por meio de avaliação da massa e da carga iônica. Dentre as técnicas físico-químicas que permitem a detecção e caracterização de micro-organismos, MALDI-TOF MS apresenta uma combinação de rapidez, alta especificidade e excelente sensibilidade, atributos essenciais para a análise microbiana. Além disso, a pronta análise de fungos e bactérias e a demanda por baixo custo de reagentes torna esta técnica uma opção atraente para laboratórios clínicos, farmacêuticos, ambientais e de microbiologia alimentar (ANDRADE et al., 2018; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

1.6.2 Métodos genotípicos

Métodos genotípicos de identificação microbiana baseiam-se em análises de ácidos nucleicos e podem ser menos subjetivos, menos dependentes das condições de cultura e mais confiáveis que os métodos fenotípicos, pois as sequências de ácidos nucleicos são altamente conservadas por espécies microbianas. Esses métodos são tecnicamente mais desafiadores para os microbiologistas e exigem equipamentos e insumos de alto custo (SAKHNO; GUNAR, 2016; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020).

Os métodos genotípicos incluem as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento dos genes 16S e 23S rRNA; *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e ribotipagem. Esta técnica utiliza fragmentos de restrição dos ácidos nucleicos, a partir de genomas bacterianos e fúngicos, e é mais indicada para a discriminação de linhagens do que para a identificação de espécies (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SAKHNO; GUNAR, 2016). A hibridização DNA-DNA é considerado o padrão ouro para a classificação de espécies bacterianas e o sequenciamento de nova geração (SNG) tem sido bastante aplicado na taxonomia de micro-organismos e utilizado com sucesso para a distinção de alguns membros do grupo *B. subtilis*, por exemplo. No entanto, essas tecnologias são trabalhosas, caras, demoradas e de difícil implantação na rotina de alguns laboratórios (HUANG et al., 2016).

Alguns estudos demonstram a necessidade da aplicação de metodologias moleculares, como o sequenciamento de genes *housekeeping*, codificadores de enzimas essenciais para a manutenção da função celular, a fim de que se realize uma análise capaz de discriminar as espécies bacterianas presentes em áreas produtivas (CUNDELL, 2006; CUNHA et al., 2006; GONZALEZ et al., 2012; PISOL et al., 2015; SUTTON; CUNDELL, 2004). Atualmente, utiliza-se amplamente a análise da sequência do gene *rrs* que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal, para a classificação e identificação bacteriana (CAAMAÑO-ANTELO et al., 2015; GONZÁLEZ et al., 2012; HUANG et al., 2016). A Applied Biosystems® comercializa sistemas de sequenciamento de rRNA para bactérias (16S rRNA) e fungos (D2 rRNA) que comparam as sequências amplificadas a sequências presentes em bancos de dados, utilizando o *programa* de análise MicroSeq, o qual fornece árvores

filogenéticas, relacionando o isolado microbiano aos vinte organismos mais próximos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

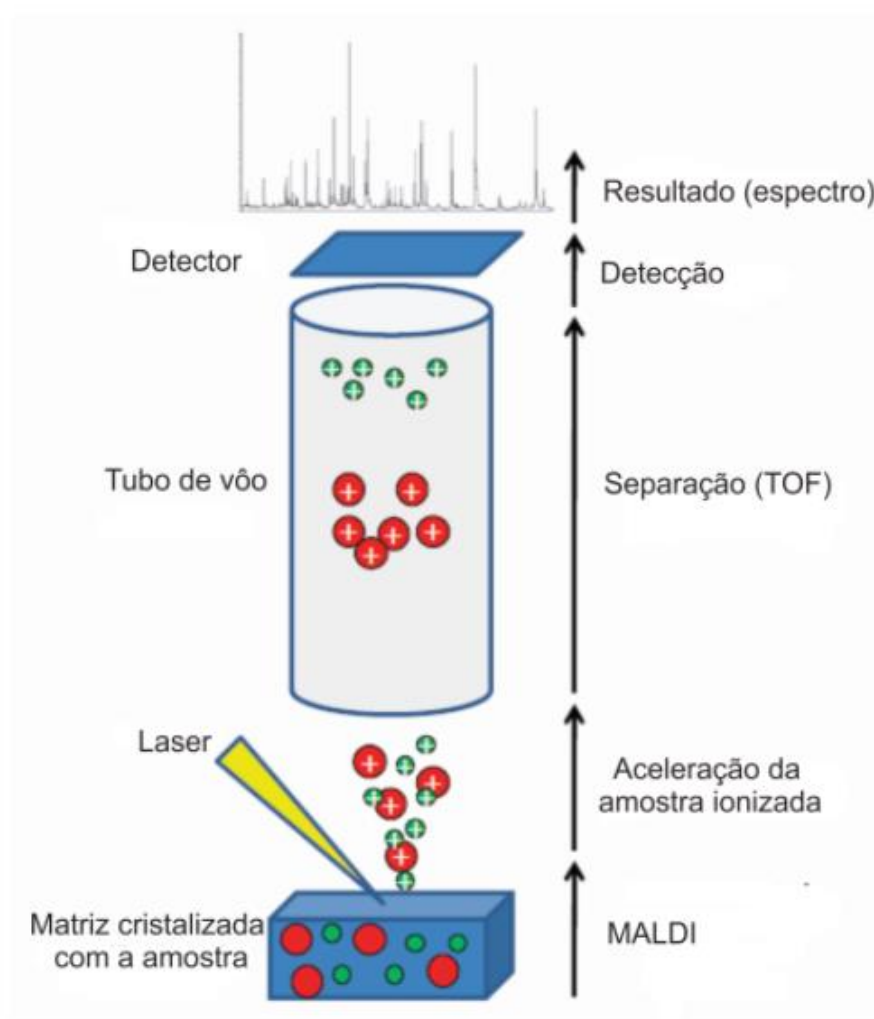
Apesar da análise do gene 16S rRNA se apresentar como uma importante ferramenta para a identificação bacteriana, ainda representa um alto custo, o que é inviável na rotina de alguns laboratórios (RODRIGUES et al., 2017; VOS et al., 2012). Além disso, algumas espécies do gênero *Bacillus*, por exemplo, possuem sequências do gene 16S rRNA praticamente idênticas (CELANDRONI et al., 2016; CUNHA et al., 2006; LV et al., 2016; SEUYLEMEZIAN et al., 2018; STAROSTIN et al., 2015). Pode-se citar o grupo *B. cereus*, que compreende as espécies *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis*, as quais geneticamente apresentam-se muito semelhantes, porém podem ser consideradas espécies diferentes, em função da sua patogenicidade e outras características genéticas. O mesmo ocorre com o grupo *B. subtilis*, o qual contém as espécies *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* e *B. sonorensis*, cujas sequências do gene 16S rRNA apresentam mais de 99% de similaridade entre as espécies. (STAROSTIN et al., 2015). As espécies *B. safensis*, *B. pumilus*, *B. zhangzhouensis* e *B. australimaris* também compartilham > 99,9% de similaridade entre as sequências do gene 16S rRNA. Porém, as sequências dos genomas completos deste grupo de bactérias compartilham apenas 54 a 66% de similaridade. Além disso, as bactérias podem apresentar várias cópias do gene 16S rRNA, o que pode gerar identificações diversas, dependendo da cópia amplificada, tornando a identificação ambígua e imprecisa (SEUYLEMEZIAN et al., 2018; VOS et al., 2012). Nestes casos, outros genes devem ser sequenciados e analisados para a diferenciação destas espécies, como *rpoB* (codifica a subunidade beta da RNA polimerase), *gyrA* (codifica a subunidade alfa da DNA girase) e *gyrB* (codifica a subunidade beta da DNA girase), que podem apresentar melhor resolução filogenética (CAAMAÑO-ANTELO et al., 2015; MOHKAM et al., 2016; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2016; STING; EISENBERG; HRUBENJA, 2019). Entretanto, essas técnicas ainda empregam etapas demoradas e trabalhosas, como cultivo e isolamento, extração de DNA, PCR, eletroforese em gel, purificação de amplicons, sequenciamento e análise das sequências obtidas (SEUYLEMEZIAN et al., 2018).

1.7 Uso de MALDI-TOF MS na identificação de micro-organismos

A utilização da tecnologia MALDI-TOF MS revolucionou a microbiologia clínica e tem se mostrado de grande relevância para a identificação de espécies bacterianas de importância médica, devido à simples execução dos protocolos, à rápida liberação dos resultados e ao baixo custo (BALLESTÉ, 2018, CELANDRONI et al., 2016; KOHLMANN et al., 2015; STAROSTIN et al., 2015; RODRIGUEZ-SANCHEZ et al., 2019). Seuylemezian et al. (2018) relataram que a técnica de MALDI-TOF MS apresenta inúmeros benefícios em comparação ao sequenciamento do gene 16S rRNA, como maior rapidez, mais alto rendimento e maior capacidade de resolução. Enquanto, a identificação da sequência 16S rRNA se baseia em apenas um gene com aproximadamente 1.500 pares de bases, MALDI-TOF MS captura assinaturas moleculares únicas que são representativas de uma alta gama de proteínas e pode distinguir claramente as diferenças entre duas espécies intimamente relacionadas (SEUYLEMEZIAN et al., 2018).

A técnica de MALDI-TOF MS consiste na mistura da cultura a ser identificada com uma matriz polimérica (geralmente CHCA - ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico), a qual absorve luz e permite a ionização das proteínas do micro-organismo, por excitação através de um feixe de laser. Em seguida, campos elétricos orientam os íons gerados dentro de um tubo de vácuo, onde ocorre uma separação por massa/carga segundo o tempo de passagem pelo tubo até o detector (tempo de voo). Cada partícula ionizada gera um pico (ou espectro) e o conjunto de partículas detectadas é convertido em um perfil de espectros (Figura 1). Por meio de uma base algorítmica, este perfil de espectros é comparado com o perfil de diversas espécies (introduzidas no banco de dados) e interpretado como um resultado de identificação, associado a um nível de confiança. Sendo o proteoma de um organismo o resultado do conjunto de proteínas expressas em determinado momento, as condições de cultivo devem ser padronizadas, de modo a permitir a reprodutibilidade dos resultados de identificação (PAVLOVIC et al., 2013, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015, RYZHOV; FENSELAU, 2001).

Figura 1 - Esquema demonstrando a técnica de MALDI-TOF MS



Fonte: (GALDOS-RIVEROS et al., 2010).

A tecnologia de EM tem sido utilizada há várias décadas na área da química, mas o conceito de uso da mesma para identificar bactérias foi proposto somente na década de 1970. Na década de 1980, foram desenvolvidas técnicas de dessorção/ionização que permitiram a geração de íons de biomarcadores moleculares a partir de micro-organismos e, conseqüentemente, a proteômica tornou-se possível (SAMPEDRO; MENDIOLA; MARTÍNEZ, 2018).

No final dos anos 80, o desenvolvimento de técnicas mais suaves de ionização (dessorção/ionização a laser assistida por matriz – MALDI, e de ionização por eletropulverização), possibilitou a análise de grandes biomoléculas, como proteínas intactas. Em 1996, espectros de impressões digitais espectrais no tempo de voo (TOF) puderam ser obtidos de células bacterianas inteiras. Ainda nos anos 90, foram desenvolvidas bibliotecas de espectros de referência e programas para a

identificação bacteriana, o que permitiu a comercialização da tecnologia. Nos últimos anos, MALDI-TOF MS emergiu como uma ferramenta rápida, precisa e sensível para caracterização e identificação microbiana de bactérias, fungos e vírus, sendo adotada rapidamente em todo o mundo e, substituindo assim, métodos analíticos fenotípicos convencionais em diversas áreas, como diagnóstico clínico e ambiental e monitoramento de alimentos (JANG; KING, 2018; SAMPEDRO; MENDIOLA; MARTÍNEZ, 2018).

Alguns estudos têm utilizado esta metodologia para a identificação de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados (CELANDRONI et al., 2016; LV et al., 2016). Lv et al. (2016) demonstraram que 16 espécies de seis diferentes gêneros bacterianos isolados de alimentos (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*) foram identificadas com alta precisão por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) e concluíram que esta técnica pode ser utilizada como uma abordagem complementar ao sequenciamento do gene 16S rRNA. Os autores demonstraram também que MALDI-TOF MS pode ser uma metodologia ainda mais eficiente que o sequenciamento, na diferenciação e classificação de espécies de *Bacillus*, especialmente na diferenciação de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. methylotrophicus*, assim como de espécies do gênero *Lactobacillus*.

Em outro estudo, Celandroni et al. (2016) identificaram 75 isolados clínicos de espécies dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). O sequenciamento do gene 16S rRNA foi utilizado para resolver quaisquer discrepâncias nos resultados de identificação. Os autores demonstraram que MALDI-TOF MS foi capaz de identificar corretamente 61 dos 75 isolados (81,3%) e que nenhuma linhagem foi identificada incorretamente. Dentre as 14 linhagens não identificadas, 11 eram espécies do gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. simplex*) e três do gênero *Paenibacillus* (*P. glucanolyticus*, *P. amylolyticus* e *P. lautus*). Os autores atribuíram este resultado ao limitado número de linhagens destas espécies na base de dados (*Biotyper*) associada ao equipamento e concluíram que MALDI-TOF MS é uma metodologia útil, por ser rápida e precisa na identificação de linhagens dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*.

Nos estudos de Celandroni et al. (2016) e Lv et al. (2016), as linhagens estudadas eram de origem clínica e de alimentos e pertenciam a apenas 11 e sete espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados, respectivamente. O número de

espécies avaliado foi muito pequeno diante da grande diversidade e do quantitativo de espécies desse grupo descritas na literatura. De qualquer forma, embora MALDI-TOF MS tenha sido amplamente utilizado em laboratórios microbiológicos clínicos, o mesmo ainda não ocorre nos laboratórios farmacêuticos (SAKHNO; GUNAR, 2016).

Andrade et al. (2018) avaliaram a adequabilidade da técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de bactérias isoladas de áreas limpas farmacêuticas, envolvidas na produção de vacinas virais, em comparação a métodos bioquímicos de identificação bacteriana. No estudo, foram utilizadas 13 espécies isoladas das áreas produtivas e cinco linhagens tipo da coleção de culturas *American Type Culture Collection* (ATCC), incluindo bastonetes Gram-negativos, cocos Gram-positivos e BGPE. Obteve-se um percentual de identificação correta das espécies utilizando-se MALDI-TOF MS (bioMérieux) de 88,89%, contra 38,89%, utilizando-se a técnica bioquímica BBL Crystal®; obteve-se 5,55% de identificação não confiável (scores abaixo de 90%) com MALDI-TOF MS contra 22,22% com o sistema BBL Crystal®. Os autores consideraram que MALDI-TOF MS é uma técnica muito menos trabalhosa, em comparação às técnicas bioquímicas normalmente utilizadas em laboratórios microbiológicos, além de ser capaz de fornecer resultados precisos e confiáveis em poucos minutos e de gerar economias de custo significativas. Até o momento, há poucos estudos na literatura que avaliem a identificação de *Bacillus* e gêneros relacionados isolados de ambientes farmacêuticos por MALDI-TOF MS.

Alguns estudos demonstraram a identificação de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados, associadas a doenças de origem alimentar, por MALDI-TOF MS. Ulrich et al. (2019) analisaram 117 isolados pertencentes ao grupo *B. cereus* e quatro isolados de *Bacillus* spp por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) e a metodologia foi capaz de diferenciar as linhagens eméticas das não eméticas em 120 dos 121 isolados. As linhagens eméticas são capazes de produzir uma toxina denominada cerulida, um peptídeo pequeno, cíclico e termorresistente, que está associado a intoxicação alimentar, e cujos picos específicos (1.171 e 1.187 m/z) foram identificados pelos autores. Já Ha et al. (2019) utilizaram MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) para a identificação de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, espécies geneticamente relacionadas. Os autores realizaram uma análise comparativa dos espectros de massa de pequenas moléculas de 17 linhagens com os métodos de identificação morfológica, bioquímica e genética de patógenos. Os picos específicos na faixa de baixa massa (500 a 3.000 m/z) foram utilizados com sucesso para a

identificação de várias linhagens, estreitamente relacionadas, pertencentes a essas duas espécies de referência. Os autores sugeriram, então, que moléculas com baixo peso molecular (714,2 e 906,5 m/z) podem ser potenciais biomarcadores para a identificação confiável de *B. cereus* e *B. thuringiensis*.

Diante do acima exposto, pode-se observar que a metodologia de MALDI-TOF MS apresenta diversas aplicações e inúmeras vantagens, em relação a outras metodologias, como: a utilização de ionização suave, que causa degradação mínima do analito; análise de uma variedade de moléculas complexas em amostras bacterianas, através de metodologia simples de preparo; e a produção de espectros de massa que contêm características químicas específicas (*fingerprints*, do inglês, impressões digitais), que podem ser usados para caracterizar e identificar espécies bacterianas (ALMASOUD et al., 2016).

Entretanto, uma grande desvantagem apontada nesta técnica é o banco de dados utilizado para a identificação das espécies, que ainda é considerado muito limitado para alguns grupos bacterianos (CROXATTO et al., 2012; PAVLOVIC et al., 2013; STAROSTIN et al., 2015; STEENSELS et al., 2011). Para linhagens de origem clínica, este banco de dados está bem consolidado, sendo aperfeiçoado a cada dia, inclusive com a construção de bancos de dados complementares (CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL, 2013; DE CAROLIS et al., 2014; MEDEIROS, 2015). Em amostras ambientais, o uso de MALDI-TOF MS pode ser aplicado, mas o banco de dados associado ainda é insuficiente para a identificação dos micro-organismos, na opinião de alguns autores (MEDEIROS, 2015; MUNOZ et al., 2011; STAROSTIN et al., 2015, WELKER; MOORE, 2011). Isso torna difícil aplicar a técnica na identificação microbiana proveniente de áreas limpas, já que não é possível conhecer antecipadamente as características dos micro-organismos, que serão isolados. Este obstáculo exige a ampliação dos bancos de dados e o aperfeiçoamento das técnicas de preparação de amostras, uma vez que a variabilidade dos micro-organismos que podem ser encontrados nesses ambientes é muito grande, o que interfere na precisão da técnica (ANDRADE et al., 2018).

Seuylemezian et al. (2018) desenvolveram um banco de dados para MALDI-TOF MS a partir de espécies isoladas de áreas limpas, onde naves espaciais são montadas, e de linhagens tipo obtidas de coleções de cultura alemães e americanas. Os autores relataram que este banco de dados customizado será utilizado em tempo real, propiciando uma identificação precisa e de alto rendimento.

A aplicação efetiva de metodologia por espectrometria de massas requer, não somente um banco de dados de referência adequado, mas também um programa específico para a comparação dos espectros. Várias plataformas comerciais estão disponíveis atualmente, como *Biotyper* (Bruker Daltonics), *Saramis* (Shimadzu), *Microbelynx* (Waters Corporation) e *Andromas* (Andromas), porém, estão orientadas principalmente para a identificação de espécies e linhagens patogênicas. Devido a essa limitação, alguns grupos de pesquisa têm desenvolvido seus próprios bancos de dados, algoritmos matemáticos e programas (SAMPEIRO; MENDIOLA; MARTÍNEZ, 2018; STAROSTIN et al., 2015).

1.8 Justificativa

O conhecimento da microbiota associada a processos produtivos de diversas naturezas é estratégico para a adoção de medidas preventivas ou corretivas, assim como na avaliação dos riscos associados aos processos (ANDRADE et al., 2019; KORENBUM et al., 2010). Alterações nesta microbiota podem indicar desvios das especificações estabelecidas, assim como a presença de linhagens resistentes ou problemas associados aos procedimentos de limpeza (SANDLE, 2011). Além disso, os compêndios oficiais recomendam que os isolados microbianos sejam identificados de modo a dar suporte aos programas de monitoramento ambiental das companhias farmacêuticas (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2020). Para tal, os métodos de identificação devem apresentar resultados inequívocos.

A deficiência da base de dados (BD) do programa *Saramis* (Shimadzu) quanto à presença de espectros referentes a micro-organismos de origem ambiental representa uma limitação quanto à aplicação de MALDI-TOF MS (bioMérieux) na identificação deste tipo de micro-organismos (MEDEIROS, 2015).

Portanto, pode-se observar (Tabela 2) o quanto a base de dados do programa *Saramis* ainda é insuficiente para identificar, espécies e até mesmo, gêneros de *Bacillus* e linhagens relacionadas.

Tabela 2 - Números de famílias, gêneros e espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados presentes na base de dados do programa Saramis em relação ao número descrito na literatura.

FAMÍLIAS DE <i>Bacillus</i> E GÊNEROS RELACIONADOS PRESENTES NA BASE DE DADOS DO PROGRAMA SARAMIS				
Gêneros por família presentes na base de dados do programa Saramis	<i>Alycyclobacillaceae</i>	Nº de espécies descritas	Nº de espécies presentes na BD	Percentual (%)
	<i>Alicyclobacillus</i>	24	2	8,3
	<i>Bacillaceae</i>	Nº de espécies descritas	Nº de espécies presentes na BD	Percentual (%)
	<i>Aeribacillus</i>	2	1	50,0
	<i>Anoxybacillus</i>	23	1	4,3
	<i>Bacillus</i>	200	38	19,0
	<i>Caldibacillus</i>	1	1	100
	<i>Geobacillus</i>	14	4	28,6
	<i>Lysinibacillus</i>	25	2	8,0
	<i>Oceanobacillus</i>	24	2	8,3
<i>Virgibacillus</i>	33	2	6,1	
	<i>Paenibacillaceae</i>	Nº de espécies descritas	Nº de espécies presentes na BD	Percentual (%)
	<i>Aneurinibacillus</i>	8	3	37,5
	<i>Brevibacillus</i>	26	9	34,6
	<i>Paenibacillus</i>	253	23	9,1

Fonte: (PARTE, 2018; BIOMÉRIEUX, 2013).

BD: base de dados.

O Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) de Bio-Manguinhos é o responsável pela identificação dos micro-organismos isolados das diversas áreas produtivas da unidade, a partir de várias fontes, como monitoramento ambiental de ar, superfícies, operadores, monitoramento de água, produtos intermediários e acabados. Este laboratório utiliza os sistemas comerciais VITEK® 2 e VITEK® MS (bioMérieux) para a identificação das bactérias isoladas das diversas fontes acima citadas e tem obtido um grande percentual de resultados de identificação inconclusivos para os *Bacillus* e gêneros relacionados. Como o programa Saramis, associado ao modelo VITEK® MS RUO, permite a ampliação da base de dados e, conseqüentemente, um aumento no número de identificações de espécies e gêneros bacterianos, este estudo visa a melhoria da identificação dos *Bacillus* e gêneros relacionados por este sistema. Para isso, 97 isolados de *Bacillus* e gêneros relacionados foram identificados, através do sequenciamento de genes *housekeeping* e os espectros obtidos a partir da análise proteômica por MALDI-TOF

MS foram inseridos no banco de dados do programa Saramis, de modo a se obter um banco de dados customizado em relação às espécies bacterianas presentes nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos.

O uso de métodos rápidos e eficazes, como MALDI-TOF MS, e a ampliação do banco de dados proteômico próprio deste sistema, utilizando linhagens de *Bacillus* e gêneros relacionados isolados de monitoramento ambiental, água e produtos intermediários de Bio-Manguinhos ampliará o potencial de identificação destes micro-organismos, possibilitando também um banco de dados customizado a ser utilizado por outras unidades da Fiocruz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo visa a ampliação da base de dados do programa Saramis associado a MALDI-TOF MS para a melhoria da identificação de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados isolados de monitoramento ambiental, água e produtos intermediários provenientes das diversas linhas de produção de Bio-Manguinhos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização proteômica das linhagens selecionadas utilizando o sistema MALDI-TOF MS.
- Analisar as sequências de genes *housekeeping* (16S rRNA, *rpoB* e *gyrB*) de linhagens de *Bacillus* e gêneros relacionados isoladas das áreas produtivas de Bio-Manguinhos.
- Ampliar a base de dados do programa Saramis, utilizando linhagens de *Bacillus* e gêneros relacionados isoladas das áreas produtivas de Bio-Manguinhos, identificadas pela análise das sequências de genes *housekeeping*, e linhagens isoladas de outras áreas limpas, previamente sequenciadas, e cedidas pela Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) do IOC/ Fiocruz.
- Verificar a funcionalidade da base de dados do programa Saramis, após ampliação, utilizando as linhagens isoladas de Bio-Manguinhos e as linhagens cedidas pela CBAS do IOC/ Fiocruz.

3 METODOLOGIA

3.1 Linhagens bacterianas

Neste estudo, foram selecionadas 169 linhagens de bastonetes Gram-positivos isoladas de áreas controladas, água e produtos intermediários de Bio-Manguinhos, entre os anos de 2016 e 2017 e 21 linhagens isoladas de áreas limpas, identificadas pela análise da sequência do gene 16S rRNA, do acervo da CBAS (IOC/ Fiocruz).

3.2 Coloração de esporos

As linhagens isoladas em Bio-Manguinhos e criopreservadas (169) foram semeadas em placas de ágar sangue de carneiro (ASC) a 5% e incubadas em estufa bacteriológica a 30-35°C, por 2 dias (MEDEIROS, 2015). Após a incubação, as linhagens foram semeadas em ágar nutriente-metals (ANM) e incubadas em estufa bacteriológica a 30-35°C, por 5 a 7 dias, para que houvesse a produção de esporos (RABINOVITCH; PALMEIRA; SILVA, 1975). Em seguida, foram submetidas à coloração com verde malaquita, para a observação dos esporos (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010). Após a observação ao microscópio, as 97 linhagens produtoras de esporos foram selecionadas para a etapa de caracterização proteômica.

3.3 Caracterização proteômica por MALDI-TOF MS

Após incubação em ASC por 48 h a 30-35°C, uma porção de cada uma das 97 linhagens foi transferida para um dos poços (*spot*) de uma lâmina (*slide*) em quadruplicata, com o auxílio de uma alça descartável. Foi realizado um esfregaço deste cultivo, em toda a área do *spot*. Em seguida, 1 µL de solução matriz de CHCA (VITEK MS-CHCA, bioMérieux) foi aplicado sobre cada esfregaço. A linhagem de *Escherichia coli* ATCC 8739 foi utilizada como controle, conforme instruções do fabricante. Após a cristalização da matriz, os *slides* foram introduzidos no equipamento VITEK® MS RUO (bioMérieux, França). Os resultados obtidos foram analisados através do programa Saramis Premium (versão 4.0.0.14) e

disponibilizados em diferentes cores, conforme o nível de confiança a ele atribuído (Quadro 3).

Quadro 3 - Exibição de resultados de identificação no programa Saramis Premium.

Intervalo de confiança	Cor
99,9%	Verde escuro
90,0 – 99,8%	Verde claro
80,0 – 89,9%	Amarelo
75,0 – 79,9%	Branco

Fonte: (BIOMERIEUX, 2012).

As linhagens não identificadas foram, posteriormente, reanalisadas, sendo executada extração com 0,5 µL de ácido fórmico 70% (aplicação direta na placa), antes da adição da matriz CHCA, conforme recomendações do fabricante.

3.4 Sequenciamento do gene 16S rRNA

As 97 linhagens isoladas em Bio-Manguinhos foram semeadas em ágar triptona de soja (TSA) e incubadas em estufa bacteriológica a 30-35°C, por 2 dias. Em seguida, foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA, através do kit MicroSEQ® Full Gene 16S rDNA (Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme as instruções do fabricante. Os fragmentos foram separados no Analisador Genético Série 3500 (Applied Biosystems, EUA). As sequências foram processadas através do programa *DNA Star LaserGene SeqMan* (versão 7.0.0) e os resultados de identificação foram obtidos por comparação com as sequências depositadas no banco de dados: EZBioCloud, versão de 13/05/2020 (<https://www.ezbiocloud.net/>; YOON et al., 2017).

As linhagens consideradas como identificadas a partir da análise do gene 16S rRNA, foram apenas aquelas cujo percentual de identificação obtido foi $\geq 95\%$. Foram consideradas identificadas em nível de espécie apenas aquelas linhagens, cujo percentual de identificação foi $\geq 98,7\%$, conforme estabelecido na literatura (NGUYEN et al., 2016; SEUYLEMEZIAN et al., 2018). Quando havia mais de uma possibilidade de espécie, os resultados foram considerados apenas em nível de

gênero. Quando havia como possibilidades, espécies de gêneros diferentes, os resultados foram considerados inconclusivos.

As linhagens foram agrupadas conforme o resultado de identificação obtido e um representante de cada grupo taxonômico foi selecionado para a realização das próximas etapas.

3.5 Sequenciamento do gene *rpoB*

As linhagens selecionadas no item 3.4 foram semeadas em TSA e incubadas em estufa bacteriológica a 30-35°C, por 2 dias. Em seguida, o DNA foi extraído conforme descrito por Warnken et al. (2012). Uma porção da colônia isolada foi transferida para tubo contendo 500 µL de água purificada estéril. Após aquecimento a 100°C por 15 min, o tubo foi congelado a -20°C, para posterior centrifugação e retirada do sobrenadante.

Para amplificação do gene *rpoB*, foram utilizados os iniciadores *rpoBF1206* (5'-ATC GAA ACG CCT GAA GGT CCA AAC AT-3') ou *rpoBF1721* (5'-AAC ATC GGT CTG ATC AAC TC-3') e *rpoBR3202* (5'-ACA CCC TTG TTA CCG TGA CGA CC-3'). A PCR foi realizada, conforme descrito a seguir: 4 µL de DNA extraído; 1,25 U de rTaq polimerase (TaKaRa, Dalian, China); 0,25 mM de dNTPs (TaKaRa, Dalian, China); 0,1 µM de cada iniciador e tampão 10X (TaKaRa, Dalian, China) em um volume total de 50 µL. A termociclagem foi realizada em equipamento Veriti (Applied Biosystems, EUA), conforme as condições a seguir: 95°C por 3 min/40 ciclos a 95°C por 20 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 1,5 min/72°C por 5 min. Após a PCR, os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA, pH 8,3). Os produtos da PCR no gel foram observados por iluminação UV em fotodocumentador myECL™ Imager (Thermo Fisher Scientific, EUA), após coloração com GelRed® 1X.

A purificação dos amplicons foi realizada, utilizando-se ExoSAP IT conforme instruções do fabricante (15 min a 37°C/15 min a 80°C). Em seguida, a quantificação foi realizada em *Qubit 3 Fluorometer*, utilizando-se o *kit* Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas com o *kit* *Big Dye® Terminator Direct Sequencing v3.1* (Applied Biosystems, EUA) e os seguintes iniciadores: *rpoBF1206* ou *rpoB1721*, *rpoBR3202*, *rpoBF2063* (5'-ATG

GGT GCG AAC ATG CAA CGT CA-3') e rpoBR2410 (5'-TGA CGT TGC ATG TTC GCA CCC AT-3'). A termociclagem foi realizada em equipamento Veriti (Applied Biosystems, EUA), conforme as condições a seguir: 30 ciclos a 94°C por 10 seg, 50°C por 10 seg e 60°C por 2 min adaptado de KI et al. (2009).

A etapa de precipitação foi realizada conforme orientações do fabricante (Applied Biosystems, EUA): a cada poço da placa foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125 mM. A placa foi vedada com microfilme (Applied Biosystems, EUA) e centrifugada brevemente (Eppendorf 5430R, EUA). Em seguida, foram adicionados 25 µL de etanol P.A. a cada poço; a placa foi, então, mantida em repouso por 15 min à temperatura ambiente e centrifugada a 3.000 g por 30 min a 4°C. Posteriormente, após todo o líquido ter sido desprezado em movimento único, a placa foi, então, invertida sob pano do tipo *wiper* e centrifugada por 180 g por 30 seg. Após adição de 30 µL de etanol 70% a cada poço, a placa foi novamente centrifugada a 1.650 g por 15 min a 4°C. Todo o líquido foi, novamente, desprezado em movimento único e a placa foi invertida e centrifugada por 180 g por 30 seg. Após troca dos panos do tipo *wiper*, a última centrifugação foi repetida. Finalmente, a placa foi coberta por folha de alumínio e incubada a 65°C por 5 min. Todos os poços foram, então, ressuspensos com 10 µL de formamida HiDi. Os fragmentos foram, então, submetidos à eletroforese capilar em Analisador Genético Série 3500 (Applied Biosystems, EUA). As sequências obtidas foram processadas através do programa *DNA Star LaserGene SeqMan* (versão 7.0.0) e os resultados de identificação foram obtidos a partir da comparação com as sequências de nucleotídeos do *GenBank*, versão de 11/06/2020 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.6 Sequenciamento do gene *gyrB*

As linhagens selecionadas no item 3.4 foram semeadas em TSA e incubadas em estufa bacteriológica a 30-35°C, por 2 dias. Em seguida, o DNA foi extraído conforme descrito por Warnken et al. (2012). Uma porção da colônia isolada foi transferida para tubo contendo 500 µL de água purificada estéril. Após aquecimento a 100°C por 15 min, o tubo foi congelado a -20°C, para posterior centrifugação e retirada do sobrenadante.

Para amplificação do gene *gyrB*, foram utilizados os iniciadores *gyrBAC F* (5'-CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTC AT-3') e *gyrBAC R* (5'-CAY GCN GGN GGN

AAR TTY GA-3'). A PCR foi realizada, conforme descrito a seguir: 4 µL de DNA extraído; 1,25 U de rTaq polimerase (TaKaRa, Dalian, China); 0,25 mM de dNTPs (TaKaRa, Dalian, China); 1 µM de cada iniciador e tampão 10X (TaKaRa, Dalian, China) em um volume total de 50 µL. A termociclagem foi realizada em equipamento Veriti (Applied Biosystems, EUA), conforme as condições a seguir: 94°C por 3 min/40 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min/72°C por 5 min. Após a PCR, os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA, pH 8,3). Os produtos da PCR no gel foram observados por iluminação UV em fotodocumentador myECL™ Imager (Thermo Fisher Scientific, EUA), após coloração com solução de GelRed® 1X.

A purificação dos amplicons foi realizada, utilizando-se ExoSAP IT, conforme instruções do fabricante. Em seguida, a quantificação foi realizada em *Qubit 3 Fluorometer*, utilizando-se o *kit* Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Scientific, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas com o *kit Big Dye® Terminator Direct Sequencing v3.1* (Applied Biosystems, EUA) e os mesmos iniciadores utilizados na reação de amplificação (*gyrBACF* e *gyrBACR*). A termociclagem foi realizada em equipamento Veriti (Applied Biosystems, EUA), conforme as condições a seguir: 30 ciclos a 94°C por 10 seg, 50°C por 10 seg e 60°C por 2 min, adaptado de Yamamoto e Harayama (1998).

As etapas de precipitação, leitura dos fragmentos, montagem das fitas e análise das sequências foram realizadas, conforme descrito no item 3.6.

3.7 Construção de árvores filogenéticas

As sequências do gene 16S rRNA foram alinhadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.0.5.3) (HALL et al., 1999). A análise filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA 6 (versão 6.06) (TAMURA et al., 2013) e o método selecionado foi o *Neighbour-Joining* (SAITOU; NEI, 1987). A distância inferida foi calculada usando o modelo de Kimura-2 parâmetros (KIMURA, 1980) e a robustez das topologias foi realizada pela análise de *bootstrap* (1.000 réplicas) (FELSENSTEIN, 1985). O mesmo procedimento foi realizado para as sequências dos genes *rpoB* e *gyrB*. As três árvores filogenéticas foram comparadas

para complementar a diferenciação entre as diferentes espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados (CAAMAÑO-ANTELO et al., 2015).

3.8 Ampliação da BD do programa Saramis

Após sequenciamento dos genes *housekeeping*, as linhagens isoladas em Bio-Manguinhos foram semeadas em placas de TSA e ASC e incubadas em estufa bacteriológica a 30-35°C, por 1 a 3 dias. Após a incubação, as linhagens foram submetidas à análise por VITEK® MS RUO, conforme descrito no item 3.3, realizando-se pré-extração com 0,5 µL de ácido fórmico 70%. Foram preparadas oito replicatas por meio de cultura (TSA e ASC) e por tempo de incubação (1 a 3 dias), de modo a se obter a maior variação possível dos perfis de espectro, conforme as condições de incubação utilizadas rotineiramente no laboratório. Dessa forma, foram obtidos 48 perfis de espectros por linhagem, dos quais foram selecionados de 18 a 24 (o fabricante recomenda, aproximadamente, 20, no mínimo), com *datacount* (número de picos) entre 100 e 200, para a confecção de um dendrograma, que orientou a proposta de um espectro de referência para cada linhagem. Somente picos com m/z entre 3.000 e 20.000 Da foram considerados, conforme orientação do fabricante. A partir do dendrograma gerado, foram descartados os perfis de espectros que se encontravam isolados dos demais (considerados *outliers*, abaixo de 70% de similaridade). Com base nos perfis de espectros restantes, foi realizada a seleção dos principais espectros de massa (picos), de acordo com a frequência de detecção (>70%). Cada SuperSpectrum (SS) gerado foi avaliado, através da comparação com toda a BD do programa Saramis e, caso atingisse os critérios estabelecidos pelo fabricante, era inserido no Arquivo “Tree” da BD do programa. Os espectros de referência previamente obtidos a partir de cada linhagem foram, então, novamente comparados com a BD do programa Saramis, através da simulação de uma análise, de modo a verificar a funcionalidade do recém-inserido SS (BIOMERIEUX, 2012; MEDEIROS, 2015).

O procedimento acima também foi realizado com as 21 linhagens isoladas de áreas limpas diversas, obtidas do acervo da CBAS (IOC/Fiocruz). As espécies foram selecionadas, após análise das espécies mais encontradas nos ambientes produtivos de Bio-Manguinhos, conforme os resultados obtidos a partir do sequenciamento dos genes *housekeeping*.

3.9 Verificação dos SuperSpectra propostos

Após a criação dos SS referentes às linhagens isoladas de Bio-Manguinhos e às linhagens obtidas da CBAS, todas elas foram submetidas, novamente, à análise proteômica por VITEK® MS RUO, conforme o item 3.3, realizando-se semeadura em ASC e TSA e pré-extração com ácido fórmico 70%, para que os SS propostos e inseridos anteriormente fossem desafiados e avaliados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação de micro-organismos isolados de monitoramento ambiental, água e produtos intermediários provenientes das diversas linhas de produção de Bio-Manguinhos é realizada utilizando os sistemas comerciais VITEK® 2 e VITEK® MS RUO (*bioMérieux*, França). O número de linhagens de *Bacillus* e gêneros relacionados não identificado é muito elevado, variando de 16,2% a 18,5% nos últimos 4 anos (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de linhagens de Bastonetes Gram-positivos não identificadas em relação ao número de linhagens isoladas em Bio-Manguinhos

Ano	Número de bastonetes Gram-positivos isolados em Bio-Manguinhos	Linhagens não identificadas	
		Número	Percentual (%)
2016	160	28	17,5
2017	162	30	18,5
2018	291	47	16,2
2019	362	64	17,7

Fonte: (A autora, 2020).

O elevado percentual de linhagens não identificadas pode ser explicado em função das bases de dados de diversos sistemas de identificação bacteriana compreenderem, em sua maior parte, micro-organismos de interesse clínico, sendo mais limitadas em relação à microbiota farmacêutica e industrial. Conforme já descrito anteriormente, como estas espécies são de origem ambiental, nem sempre seus perfis metabólicos estão contemplados nas bases de dados dos sistemas de identificação utilizados (ANDRADE et al., 2018; CELANDRONI et al., 2016; COSTA et al., 2017; SOUZA, 2011).

As Tabelas 2 e 4 demonstram como o número de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados presentes nas BD de VITEK® MS RUO e VITEK® 2, respectivamente, é limitado em relação ao número de espécies descritas na literatura. A BD de VITEK® 2 apresenta-se ainda mais restrita, possuindo no total apenas 40 espécies do referido grupo, enquanto o programa Saramis contempla 87 espécies. O gênero *Bacillus*, por exemplo, apresenta 200 espécies descritas: apenas

19,0% delas estão contempladas na BD do programa Saramis e 9,5% na BD do sistema VITEK® 2. Além do último ser ainda mais limitado que o primeiro, apresenta a desvantagem de não permitir a inserção de novas espécies.

Tabela 4 - Número de famílias, gêneros e espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados presentes na base de dados do programa VITEK® 2 em relação ao número descrito na literatura

FAMÍLIAS DE <i>Bacillus</i> E GÊNEROS RELACIONADOS PRESENTES NA BASE DE DADOS DO PROGRAMA VITEK®2				
Gêneros por família presentes na base de dados do programa VITEK®2	<i>Alyclobacillaceae</i>	Nº de espécies descritas	Nº de espécies presentes na BD	Percentual (%)
		<i>Alicyclobacillus</i>	24	2
	<i>Bacillaceae</i>	Nº de espécies descritas	Nº de espécies presentes na BD	Percentual (%)
	<i>Bacillus</i>	200	19	9,5
	<i>Geobacillus</i>	14	3	21,4
	<i>Lysinibacillus</i>	25	2	8,0
	<i>Virgibacillus</i>	33	2	6,1
	<i>Paenibacillaceae</i>	Nº de espécies descritas	Nº de espécies presentes na BD	Percentual (%)
	<i>Aneurinibacillus</i>	8	1	12,5
	<i>Brevibacillus</i>	26	8	30,8
	<i>Paenibacillus</i>	253	10	4,0

Fonte: (PARTE, 2018; BIOMÉRIEUX, 2010).
BD: base de dados

Portanto, a forma encontrada de elevar o percentual de identificação de *Bacillus* e gêneros relacionado isolados das áreas produtivas de Bio-Manguinhos foi customizar a BD do programa Saramis, inserindo perfis de espectros das linhagens do referido grupo mais encontradas nas áreas produtivas da unidade. Para isso, 169 linhagens de BGP (bastonetes Gram-positivos) isoladas em Bio-Manguinhos entre os anos de 2016 e 2017 foram selecionadas.

4.1 Seleção de bastonetes Gram-positivos esporulados

As 169 linhagens selecionadas foram, então, descongeladas e semeadas nos meios de cultura utilizados na rotina do laboratório. Após executadas as etapas de semeadura em ASC e, posteriormente, em ANM, para estimular a produção de esporos, foi realizada metodologia para a coloração dessas estruturas (item 3.2).

Observou-se a produção de esporos em 97 linhagens, que foram, então, selecionadas para as etapas subsequentes.

A semeadura em ANM e a coloração dos esporos são etapas importantes para a diferenciação dos bastonetes Gram-positivos esporulados dos não esporulados (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010, RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015). Para a realização da identificação bioquímica, através do sistema VITEK® 2, é importante que esta diferenciação seja realizada, para que o cartão correto seja utilizado, ou seja, que contém os substratos adequados para os testes bioquímicos necessários à identificação daquele grupo bacteriano, conforme instruções do fabricante. Na rotina de identificação do LACOM de Bio-Manguinhos, essa diferenciação era executada somente a partir da observação da morfologia celular, ao microscópio, e da observação da morfologia das colônias em ASC e TSA. Após a realização desse estudo, um procedimento operacional padrão (POP) foi escrito (ANEXO A) e todos os colaboradores foram treinados, para que a metodologia passasse a ser utilizada na rotina do laboratório, oferecendo, assim, uma melhoria no processo de identificação de *Bacillus* e gêneros relacionados.

4.2 Análise proteômica por MALDI-TOF MS

As 97 linhagens selecionadas foram, inicialmente, submetidas à análise proteômica por MALDI-TOF MS. Conforme instruções do fabricante, os resultados obtidos com percentual de similaridade <70% foram considerados não identificados. Obteve-se, inicialmente, 66,0% de resultados de identificação confiáveis, considerando-se os resultados obtidos em nível de gênero (42,3%) e em nível de espécie (23,7%). Não foram encontrados resultados inconclusivos. Já o percentual de linhagens não identificadas foi de 34,0% (Tabela 3).

O alto percentual de bactérias não identificadas poderia estar relacionado à ausência destas linhagens na BD do programa Saramis, conforme já discutido anteriormente e/ou ao processo de extração não ter sido capaz de lisar a espessa camada de peptidoglicana presente na parede celular de bactérias Gram-positivas (CELANDRONI et al., 2016). Dados da literatura demonstraram que outras estratégias de extração podem ser utilizadas na identificação de bactérias por MALDI-TOF MS, como os protocolos que utilizam etanol, ácido fórmico e acetonitrila

ou ácido trifluoroacético (BIER et al., 2017; CELANDRONI et al., 2019; FREIWALD; SAUER, 2009; URWYLER; GLAUBITZ, 2015).

Alguns autores demonstraram que a abordagem de extração com ácido fórmico 70% por metodologia de aplicação direta na lâmina de MALDI-TOF MS resulta em taxas mais altas de identificação de bactérias Gram-positivas, além de ser um método simples e rápido se comparado com outras abordagens de extração, que envolvem várias etapas de centrifugação (ALMUZARA et al., 2016; CHUDEJOVA et al., 2019; SUWANTARAT et al., 2016). Portanto, as 33 linhagens não identificadas foram submetidas novamente à análise proteômica, adicionando-se essa etapa de extração com ácido fórmico 70%, que foi preparado no dia da utilização, conforme orientações do fabricante. Sendo assim, das 33 linhagens antes não identificadas, 11 foram, então, identificadas, logo o percentual de linhagens não identificadas reduziu de 34,0% para 22,7% (Tabela 5). Deste modo, este estudo verificou que a utilização do ácido fórmico recém preparado na extração de proteínas proporcionou um aumento de 11,3% de linhagens identificadas pelo sistema do MALDI-TOF MS.

Para que a BD do programa Saramis pudesse ser ampliado foi necessário realizar a análise da sequência do gene 16S rRNA para identificar as linhagens do estudo, de modo que os resultados pudessem ser utilizados como padrão para comparação.

Tabela 5 - Comparação dos resultados de identificação por MALDI-TOF MS, realizando-se ou não etapa de extração com ácido fórmico 70%

Resultados de Identificação	Ausência de ácido fórmico 70%		Extração com ácido fórmico 70%	
	Número	Percentual	Número	Percentual
	Espécie	23	23,7%	29
Gênero	41	42,3%	46	47,4%
Inconclusivos	0	0,0%	0	0,0%
Não identificados	33	34,0%	22	22,7%
Número total de linhagens	97			

Fonte: (A autora, 2020).

4.3 Análise do gene 16S rRNA

As 97 linhagens foram, então, analisadas quanto à sequência do gene 16S rRNA e foi obtido um total de identificações de 94,9%, percentual significativamente superior ao obtido por MALDI-TOF MS (77,3%), considerando-se a soma de identificações em nível de gênero e em nível de espécie. Além disso, não houve linhagens não identificadas a partir desta metodologia e o percentual de resultados considerados inconclusivos foi de apenas 5,1% (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados de identificação por MALDI-TOF MS e análise do gene 16S rRNA

Resultados de Identificação	Metodologia			
	MALDI-TOF MS		16S rRNA	
	Número	Percentual	Número	Percentual
Espécie	29	29,9%	35	36,1%
Gênero	46	47,4%	57	58,8%
Inconclusivos	0	0,0%	5	5,1%
Identificações incorretas	0	0,0%	0	0,0%
Não identificados	22	22,7%	0	0,0%
Número total de linhagens	97			

Fonte: (A autora, 2020).

A análise do gene 16S rRNA pode apresentar baixa discriminação filogenética em nível de espécie e baixo poder discriminatório para alguns gêneros (SEUYLEMEZIAN et al., 2018), em função da natureza altamente conservada do gene (KI; ZHANG; QJAN, 2009; VOS et al., 2012). Esse baixo poder discriminatório pode ser confirmado com os resultados acima apresentados, quando se observa que a maioria das linhagens foi identificada somente em nível de gênero (58,8%) e que não se pôde concluir o gênero de cinco linhagens (5,1%), a partir desta abordagem.

Utilizando-se a análise do gene 16S rRNA como padrão de comparação, observou-se que não houve identificações incorretas a partir da análise por MALDI-TOF MS (Tabela 6), enquanto a partir do método VITEK® 2, obteve-se 26,8% de identificações incorretas (dados não mostrados). Esses resultados corroboram

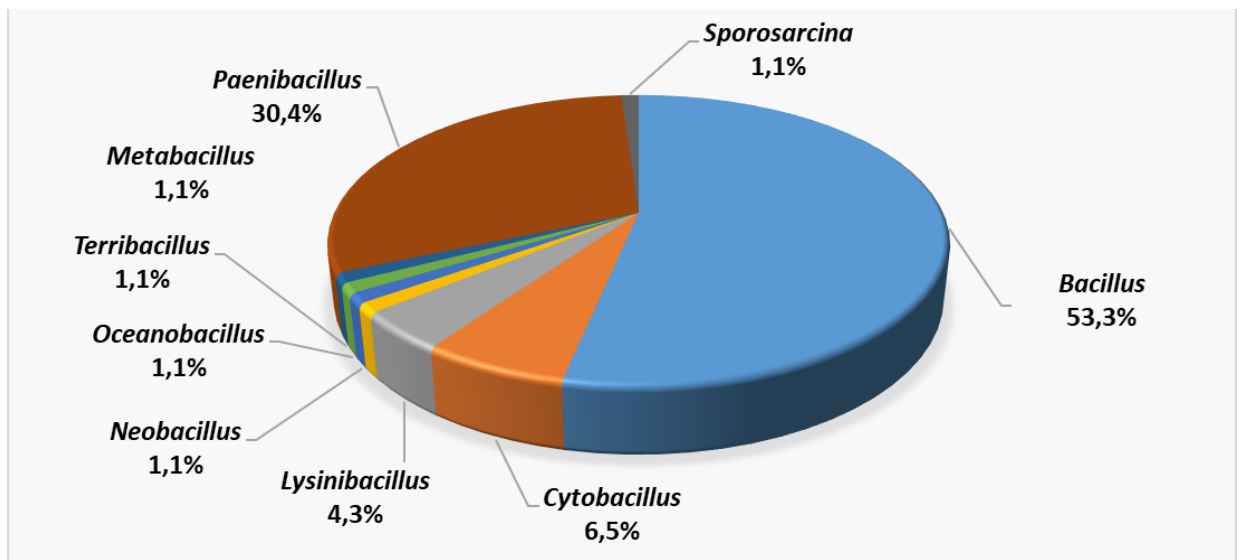
dados da literatura, que demonstraram que MALDI-TOF MS fornece resultados de identificação mais acurados que VITEK® 2, técnica também utilizada na rotina de identificação do LACOM. Martins et al. (2018) demonstraram que de 217 *Staphylococcus* coagulase negativos isolados da urina, 33 isolados foram identificados incorretamente por VITEK® 2, enquanto nenhuma identificação incorreta foi obtida a partir de MALDI-TOF MS. Já Guo et al. (2014) demonstraram que de 1.025 isolados clínicos, não foram obtidos resultados incorretos, em nível de gênero, a partir de MALDI-TOF MS, enquanto seis linhagens (0,58%) foram identificadas incorretamente a partir de VITEK® 2. Em nível de espécie, as taxas de erro de identificação obtidas foram de 5,56% para MALDI-TOF MS e 6,24% para VITEK® 2. Os artigos citados consideraram linhagens de origem clínica. Acredita-se que a diferença de acurácia entre as duas metodologias seja ainda mais evidente, considerando-se *Bacillus* e gêneros relacionados de origem ambiental, em função da deficiência da base de dados do VITEK® 2 no que se refere a estas linhagens, conforme demonstrado na Tabela 4. No entanto, não foram encontrados dados na literatura que comparem as duas metodologias em relação a este grupo de bactérias.

Conforme mencionado anteriormente, o LACOM de Bio-Manguinhos utiliza as metodologias VITEK® 2 Compact (bioMérieux, França) e VITEK® MS RUO (bioMérieux, França) para a identificação dos micro-organismos provenientes do monitoramento ambiental das áreas limpas, do monitoramento de água e de outras fontes. Durante o desenvolvimento do presente trabalho, obteve-se conhecimento na análise do gene 16S rRNA, a partir da utilização do kit MicroSEQ® Full Gene 16S rDNA (Thermo Fisher Scientific, EUA). Além disso, todas as etapas da referida análise puderam ser realizadas no próprio laboratório, já que o laboratório dispõe do equipamento de eletroforese capilar Analisador Genético Série 3500 (Applied Biosystems, EUA), que realiza a separação dos fragmentos amplificados. Esses dois fatores permitiram que a referida metodologia passasse a ser executada no laboratório, ampliando assim, o potencial de identificação dos micro-organismos isolados em Bio-Manguinhos. O POP, que já havia sido escrito pela colaboradora Luciane Medeiros, durante o desenvolvimento de sua tese de doutorado, foi revisado (ANEXO B) e os colaboradores do laboratório foram, efetivamente, treinados.

4.4 Gêneros identificados nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos

Os gêneros mais identificados em Bio-Manguinhos, a partir da análise do gene 16S rRNA, foram *Bacillus* (53,3%) e *Paenibacillus* (30,4%). Outros gêneros menos prevalentes foram *Cytobacillus* (6,5%), *Lysinibacillus* (4,3%), *Metabacillus* (1,1%), *Neobacillus* (1,1%), *Oceanobacillus* (1,1%), *Terribacillus* (1,1%) e *Sporosarcina* (1,1%) (Figura 2). Para cálculo destes percentuais, foram consideradas somente as 92 linhagens, cujo resultado em nível de gênero foi conclusivo, ou seja, estas linhagens apresentaram similaridade de sequência do gene 16S rRNA >95% com algum gênero bacteriano. Das cinco linhagens, cuja conclusão do gênero não foi possível, duas delas foram classificadas como *Brevibacterium/Peribacillus*. As outras três linhagens não apresentaram similaridade >98,7% em relação a nenhuma espécie, o que indica a possibilidade de novas espécies. As três linhagens apresentaram similaridade >95% com vários gêneros, sendo duas delas mais semelhantes a *Bacillus* e *Cytobacillus* e outra com *Bacillus* e *Domibacillus*.

Figura 2 - *Bacillus* e gêneros relacionados isolados das áreas produtivas de Bio-Manguinhos



Fonte: (A autora, 2020).

Medeiros (2015) já havia demonstrado a presença de *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* e *Terribacillus* entre os gêneros de BGPE isolados das áreas produtivas de Bio-Manguinhos, entre os anos de 2010 e 2014. A autora demonstrou

que, dentre 356 linhagens de BGPE isoladas, *Bacillus* foi o gênero mais encontrado (67%), seguido de *Brevibacillus* (13%), *Paenibacillus* (11%), *Alicyclobacillus* (6%), *Lysinibacillus* (1%), *Geobacillus* (1%) e *Terribacillus* (1%). No entanto, nem todas as linhagens foram identificadas a partir de análise do gene 16S rRNA. Outras metodologias foram utilizadas, como BBL Crystal, VITEK® 2 Compact e VITEK® MS RUO, o que pode justificar as divergências entre alguns gêneros isolados, comparando-se com o presente trabalho. As tabelas 2 e 4 demonstram que os gêneros *Sporosarcina* e *Terribacillus* não estão contemplados nas BD de VITEK® 2 e VITEK® MS RUO e que *Oceanobacillus* não está contemplado na BD de VITEK® 2. Nenhum dos três gêneros está contemplado entre as espécies identificadas por BBL Crystal, conforme manual do fabricante. Os gêneros *Cytobacillus*, *Metabacillus* e *Neobacillus* foram descritos recentemente, logo não houve tempo hábil de inclusão dos mesmos nos bancos de dados pelos respectivos fabricantes (PARTE, 2018; PATEL; GUPTA, 2020).

Assim como no presente trabalho, Bottale, Riera e Rabinovitch (2015) identificaram espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados em uma unidade farmacêutica produtora de vacinas, conforme já citado anteriormente. Além do gênero *Bacillus*, foram identificadas espécies dos gêneros *Alycyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Lysinibacillus* e *Virgibacillus*, através do sistema automatizado VITEK® 2. Do mesmo modo, Souza (2011) identificou espécies de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Lysinibacillus*, *Cohnella*, *Oceanobacillus* e *Paenisporosarcina* em amostras provenientes de testes de esterilidade de produtos farmacêuticos e do monitoramento ambiental da sala onde os testes são realizados, através da análise do gene 16S rRNA.

Portanto, pode-se observar que os gêneros de *Bacillus* e linhagens relacionadas encontrados no presente trabalho são, igualmente, prevalentes em salas limpas de outras unidades farmacêuticas. A presença destes gêneros bacterianos neste tipo de ambiente se justifica pela resistência de seus esporos, o que permite a sua sobrevivência em ambientes com baixas concentrações de nutrientes e à ação de sanitizantes comuns e de radiação UV (CELANDRONI et al., 2016; CHECINSKA et al., 2015; STAROSTIN et al., 2015).

Comparando-se as duas metodologias de identificação utilizadas, pode-se observar que dentre os 49 isolados identificados como *Bacillus* através da análise do gene 16S rRNA, 16,3% não foram identificados por MALDI-TOF MS. O percentual foi

semelhante, considerando-se as 28 linhagens do gênero *Paenibacillus*: 14,3% das linhagens não foram identificadas pela abordagem proteômica. Este percentual amplia consideravelmente em relação ao gênero *Lysinibacillus*: 25% das linhagens não foram identificadas por MALDI-TOF MS. Em relação aos gêneros menos prevalentes, a única linhagem isolada de *Oceanobacillus* foi identificada por MALDI-TOF MS, enquanto que os únicos representantes isolados dos gêneros *Sporosarcina* e *Terribacillus* não foram identificados por MALDI-TOF MS (Tabela 7). Vale ressaltar que as espécies recentemente reclassificadas como pertencentes aos gêneros *Cytobacillus*, *Metabacillus* e *Neobacillus* integravam, anteriormente, o gênero *Bacillus* (PATEL; GUPTA, 2020). Portanto, cinco dos seis isolados do gênero *Cytobacillus* foram identificados por MALDI-TOF MS como espécies do gênero *Bacillus*, pois quando as 97 linhagens foram analisadas por MALDI-TOF MS, esta mudança ainda não havia ocorrido. Apenas um isolado deste gênero não foi identificado (Tabela 7). Diante desse fato, pode-se considerar que não foram obtidas identificações incorretas a partir desta metodologia.

Tabela 7 – Percentual de isolados por gênero não identificados por MALDI-TOF MS em comparação à análise do gene 16S rRNA

Gênero	16S rRNA		MALDI-TOF MS	
	Número total	Não identificados		
		Número	Percentual (%)	
<i>Bacillus</i>	49	8	16,3	
<i>Cytobacillus</i>	6	1	16,7	
<i>Lysinibacillus</i>	4	1	25,0	
<i>Metabacillus</i>	1	1	100,0	
<i>Neobacillus</i>	1	1	100,0	
<i>Oceanobacillus</i>	1	0	0,0	
<i>Terribacillus</i>	1	1	100,0	
<i>Paenibacillus</i>	28	4	14,3	
<i>Sporosarcina</i>	1	1	100,0	

Fonte: (A autora, 2020).

O resultado acima reflete a defasagem da BD do programa Saramis em relação às espécies prevalentes nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos e, principalmente, em relação às espécies descritas na literatura (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação do número de espécies descritas na literatura, de cada gênero de *Bacillus* e linhagens relacionadas isoladas em Bio-Manguinhos, com o número de espécies presentes na base de dados do programa Saramis (VITEK® MS RUO)

Gêneros identificados	Espécies descritas	Base de dados do VITEK® MS RUO
<i>Bacillus</i>	200	38 (19,0 %)
<i>Cytobacillus</i>	11	0 (0,0 %)
<i>Lysinibacillus</i>	25	2 (8,0%)
<i>Metabacillus</i>	10	0 (0,0 %)
<i>Neobacillus</i>	12	0 (0,0 %)
<i>Oceanobacillus</i>	24	2 (8,3 %)
<i>Terribacillus</i>	4	0 (0,0 %)
<i>Paenibacillus</i>	253	23 (9,1 %)
<i>Sporosarcina</i>	14	0 (0,0 %)

Fonte: (PARTE, 2018).

A base de dados do programa Saramis contempla quatro (44,4%) dos nove gêneros isolados em Bio-Manguinhos e dispõe apenas de 19,0% das espécies descritas do gênero *Bacillus* e de menos de 10,0% das espécies descritas de *Lysinibacillus*, *Oceanobacillus* e *Paenibacillus*, respectivamente. Não há espécies de *Cytobacillus*, *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Terribacillus* e *Sporosarcina* na base de dados do programa Saramis (Tabela 8).

Na Tabela 9, pode-se analisar o percentual de isolados identificados em nível de gênero e em nível de espécie, a partir da análise do gene 16S rRNA, em relação a cada um dos gêneros encontrados em Bio-Manguinhos. Dentre as 49 linhagens de *Bacillus* isoladas em Bio-Manguinhos, apenas 18,4% foi identificada em nível de espécie. Este percentual foi semelhante em comparação a *Cytobacillus*: de seis isolados, apenas 16,7% foram identificados em nível de espécie. Em relação ao

gênero *Paenibacillus*, este percentual foi consideravelmente maior: 85,7%. O único isolado do gênero *Oceanobacillus* foi identificado em nível de espécie, enquanto as linhagens de *Lysinibacillus*, *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Terribacillus* e *Sporosarcina* foram identificadas somente em nível de gênero.

Tabela 9 – Percentual de identificação em nível de gênero e espécie a partir da análise do gene 16S rRNA.

Gêneros identificados a partir da análise do gene 16S rRNA	Em nível de gênero			Em nível de espécie	
	Número total	Número	Percentual (%)	Número	Percentual (%)
<i>Bacillus</i>	49	40	81,6	9	18,4
<i>Cytobacillus</i>	6	5	83,3	1	16,7
<i>Lysinibacillus</i>	4	4	100,0	0	0,0
<i>Metabacillus</i>	1	1	100,0	0	0,0
<i>Neobacillus</i>	1	1	100,0	0	0,0
<i>Oceanobacillus</i>	1	0	0,0	1	100,0
<i>Terribacillus</i>	1	1	100,0	0	0,0
<i>Paenibacillus</i>	28	4	14,3	24	85,7
<i>Sporosarcina</i>	1	1	100,0	0	0,0

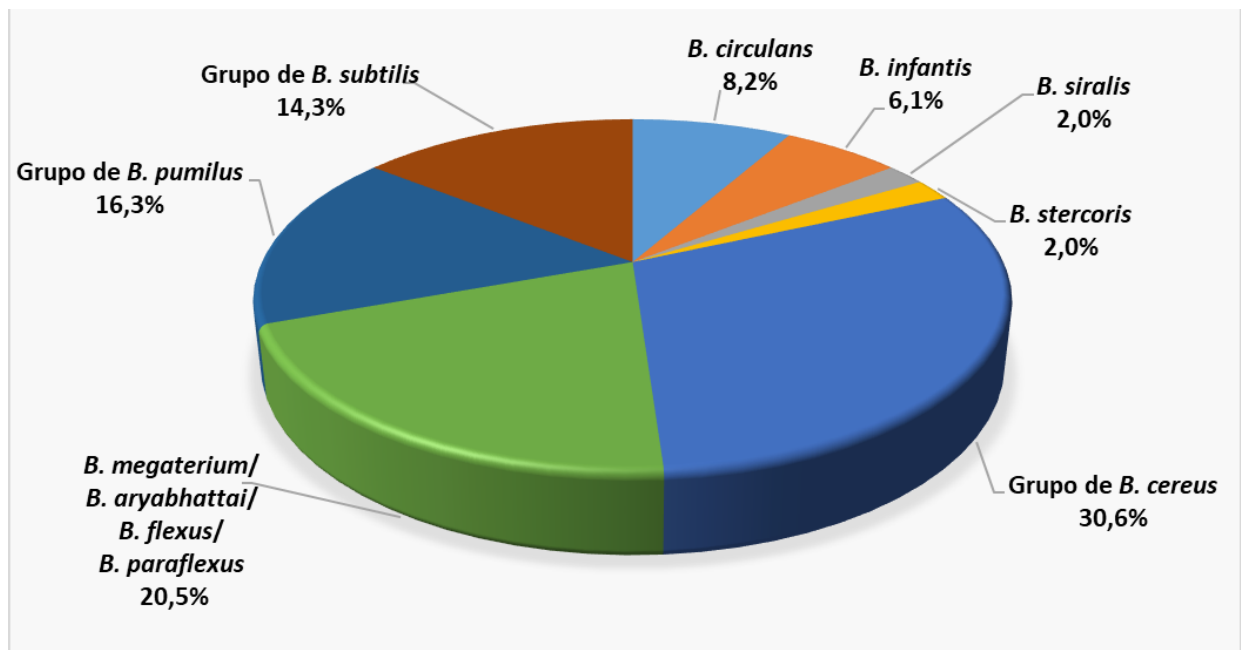
Fonte: (A autora, 2020).

Conforme descrito anteriormente, o gênero *Bacillus* representa 53,3% dos isolados no presente trabalho (Figura 2) e contempla um grupo bastante heterogêneo de bactérias. O gênero pertence à família Bacillaceae e a maioria das espécies se apresenta como BGPE aeróbios ou anaeróbios facultativos, primariamente isolados de solo, água, alimentos e amostras clínicas. No entanto, esta definição não contempla o gênero como um todo, visto que as espécies exibem uma ampla gama de propriedades fenotípicas, não havendo características fenotípicas ou moleculares que possam ser estendidas para todas as espécies de *Bacillus*. Além disso, alguns membros do gênero apresentam vasta diversidade filogenética e não compartilham com a linhagem tipo, *B. subtilis*, a mesma história evolutiva (ASH et al., 1991; LA DUC et al., 2004; PATEL; GUPTA, 2020). Por outro

lado, algumas espécies de *Bacillus* apresentam o gene 16S rRNA praticamente idêntico, tornando-se inviável distingui-las somente através desta metodologia (CELANDRONI et al., 2016; CUNHA et al., 2006, LV et al., 2016, SEUYLEMEZIAN et al., 2018; STAROSTIN et al., 2015).

No presente trabalho, 30,6% das linhagens de *Bacillus* foram identificadas como pertencentes ao grupo de *B. cereus*, sendo este o grupo mais prevalente em Bio-Manguinhos (Figura 3). As seguintes espécies apresentaram percentual de similaridade acima de 98,7% em relação às linhagens do referido grupo identificadas neste trabalho: *B. albus*, *B. luti*, *B. cereus*, *B. wiedmannii*, *B. tropicus*, *B. proteolyticus*, *B. paranthracis*, *B. nitratoreducens*, *B. fungorum*, *B. paramycoides*, *B. mobilis*, *B. anthracis*, *B. toyonensis*, *B. pacificus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*. A espécie *B. fungorum* foi recentemente descrita, tendo sido isolada de uma espécie de cogumelo shiitake, na China (LIU et al., 2020).

Figura 3 – Grupos/espécies de *Bacillus* isolados em Bio-Manguinhos



Fonte: (A autora, 2020).

Por conseguinte, a literatura demonstrou que o grupo *B. cereus*, também conhecido como *B. cereus sensu lato*, contempla pelo menos, oito espécies: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* e *B. toyonensis*. Seu genoma é altamente

conservado, variando de 5,2 a 5,5 Mb e contém sequências do gene 16S rRNA bastantes semelhantes, o que impossibilita a diferenciação entre as espécies somente a partir da análise deste gene (EHLING-SCHULZ; LERECLUS; KOEHLER, 2019; HA et al., 2019; LIU et al., 2015a).

No passado, as linhagens de *B. cereus* foram classificadas com base na sequência do gene 16S rRNA e em características como: presença ou ausência de plasmídeos de virulência (*B. anthracis* ou *B. cereus*), morfologia da colônia (*B. mycoides* ou *B. pseudomycoides*), habilidade termotolerante ou psicrófila (*B. weihenstephanensis* ou *B. cytotoxicus*) e peculiaridades relacionadas a doenças (*B. cereus* – tipo diarreico ou tipo emético, que causam intoxicação alimentar). No entanto, qualquer tipo de classificação tem se mostrado ineficaz em relação a este grupo (LIU et al., 2015a).

A espécie *B. cereus* é um importante patógeno oportunista, capaz de provocar doenças de origem alimentar, em humanos, enquanto *B. anthracis* é o agente etiológico da doença aguda e fatal antraz, que pode acometer animais e humanos. Por sua vez, *B. thuringiensis* é um conhecido patógeno de insetos e, por isso, já foi utilizado em biopesticidas (HA et al., 2019; RASKO et al., 2005). As espécies deste grupo podem ser diferenciadas de outros membros do gênero *Bacillus*, devido à sua incapacidade de produzir ácido a partir da produção de manitol e lecitinase, ao passo que a diferenciação intra-grupo pode ser realizada através de particularidades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. A identificação das espécies do grupo *B. cereus* utilizando PCR é questionável, uma vez que há estreita homologia entre as espécies do grupo, razão pela qual, alguns autores sugerem que, geneticamente, contemplam a mesma espécie (EHLING-SCHULZ; LERECLUS; KOEHLER, 2019; HA et al., 2019; HELGASON et al., 2000; RASKO et al., 2005).

O segundo grupo de espécies de *Bacillus* mais prevalente em Bio-Manguinhos, compreendendo 20,5% dos isolados foi: *B. megaterium*/ *B. aryabhatai*/ *B. flexus*/ *B. paraflexus* (Figura 3). Estas espécies podem ser encontradas em ambientes como solo, água e esgoto (BEREKA; SALAMA; ALKHARSAH, 2016; DOBRZANSKI et al., 2018; LARREA-MURRELL et al., 2018). Dados da literatura demonstraram a utilização de *B. megaterium*, *B. aryabhatai* e *B. flexus* em processos de biorremediação (ALRUMMAN; HESHAM; ALAMRI, 2016; MARWA et al., 2018; MEENA et al., 2016; PAZ et al., 2019) e de *B. megaterium* e *B. aryabhatai*

na produção de biopolímeros (BEREKA et al., 2016). Embora estas três espécies disponham de sequências do gene 16S rRNA bastante similares, *B. megaterium* e *B. aryabhatai* apresentaram semelhanças ainda mais relevantes, o que foi evidenciado no trabalho de Rao et al. (2019), que reclassificaram a espécie *B. aryabhatai*, visto que era um sinônimo heterotípico tardio de *B. megaterium*. Em virtude de suas semelhanças morfológicas, bioquímicas, quimiotaxonômicas e genômicas, poderiam ser consideradas a mesma espécie. Já *B. paraflexus* foi descrita por Chandna, Mayilraj e Kuhad (2013) como uma espécie filogeneticamente próxima de *B. flexus*. Dentre os dez isolados no presente trabalho, identificados através da análise do gene 16S rRNA, como pertencentes a este grupo, oito foram identificados como *B. megaterium*/*B. aryabhatai*/*B. flexus*, cujos percentuais de similaridade variaram de 99,9 a 100%, em relação a *B. megaterium* e *B. aryabhatai* e de 98,9 a 99,0%, em relação a *B. flexus*. Um dos isolados foi identificado somente como *B. aryabhatai* (99,6%) e *B. megaterium* (99,5%) e um outro demonstrou maior percentual de similaridade em relação a *B. flexus* (100%) do que em relação a *B. megaterium* (99,0%), *B. paraflexus* (98,8%), e *B. aryabhatai* (98,8%), o que corrobora os dados da literatura acima expostos (CHANDNA; MAYILRAJ; KUHAD, 2013; RAO et al., 2019).

O terceiro grupo do gênero *Bacillus* mais detectado (16,3%), no presente trabalho, foi o grupo *B. pumilus* (Figura 3), cujas espécies *B. safensis* subsp. *safensis*, *B. safensis* subsp. *osmophilus*, *B. australimaris*, *B. pumilus*, *B. zhangzouensis*, *B. altitudinis* e *B. xiamenensis* apresentaram percentual de similaridade entre 99,3 a 100%, em relação às linhagens isoladas.

Conforme a literatura, o grupo *B. pumilus* compreende as espécies *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. altitudinis*, *B. stratosphericus*, *B. aerophilus* e *B. xiamenensis*. Estas espécies, cujas sequências do gene 16S rRNA apresentam mais de 99% de similaridade, se encontram altamente relacionadas filogeneticamente. As espécies deste grupo têm aplicações biotecnológicas e farmacêuticas diversas, incluindo a utilização em probióticos para humanos e animais. Espécies do grupo *B. pumilus* podem ser encontradas em diversos ambientes marinhos, terrestres, grandes altitudes aéreas, e até mesmo, em salas limpas utilizadas na montagem de naves espaciais, sendo a capacidade de produzir esporos uma condição essencial para facilitar sua adaptação a nichos ecológicos tão distintos (BRANQUINHO et al., 2014; ESPARIZ et al., 2016; TIRUMALAI et al., 2018).

O quarto grupo de *Bacillus* mais encontrado nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos (Figura 3) foi o grupo de *B. subtilis* (14,3%), cujas espécies identificadas foram: *B. aerius*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. cabrialesii*, *B. glycinifermentans*, *B. halotolerans*, *B. haynesii*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. nakamurai*, *B. paralicheniformis*, *B. siamensis*, *B. sonorensis*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *stercoris*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. swezeyi*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis* e *B. velezensis*. Os percentuais de similaridade destas espécies em relação aos isolados do presente trabalho variaram de 98,7 a 100%.

O grupo *B. subtilis* foi composto, inicialmente por quatro espécies: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens*, quando descoberto há mais de 40 anos. Desde então, com a evolução da caracterização molecular, quimiotaixonômica e fisiológica do grupo, houve a descoberta de inúmeras espécies e a reclassificação de outras (CAULIER et al., 2019). Atualmente, o grupo contém várias espécies estreitamente relacionadas, como: *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. siamensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. sonorensis*, *B. paralicheniformis*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis* e *B. velezensis* (HARWOOD et al., 2019; HUANG et al., 2016). A espécie *B. cabrialesii* foi recentemente descrita, tendo sido isolada de uma espécie de trigo no México (VILLALOBOS et al., 2019).

B. subtilis e *B. licheniformis* são duas das espécies mais importantes comercialmente do grupo, sendo utilizadas na produção de diversos metabólitos (vitaminas, aminoácidos e antibióticos) e enzimas industriais (HARWOOD et al., 2019). A capacidade dos membros deste grupo de produzir diversos compostos microbianos favorece a sua distribuição em diversos locais, como solo, ambientes aquáticos, alimentos e na composição da microbiota intestinal de mamíferos e artrópodes (CAULIER et al., 2019). A classificação de espécies e subespécies desse grupo, muito próximas filogeneticamente entre si, com similaridade de 99 a 100% entre as sequências do gene 16S rRNA, tem sido bastante controversa e ainda comporta futuros desenvolvimentos (CAULIER et al., 2019; HUANG et al., 2016).

As espécies de *Bacillus* menos prevalentes nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos foram *B. circulans* (8,2%), *B. infantis* (6,1%), *B. siralis* (2,0%) e *B. stercoris* (2,0%) (Figura 3).

B. circulans é uma espécie bacteriana, inicialmente isolada em amostras de esgoto (PARTE, 2018), mas que pode ser também encontrada em solo, alimentos e

vegetais (SERRAINO et al., 2011; VIDHYALAKSHMI et al., 2016). Patil e Chaudhari (2013) reportaram a presença de *B. circulans* em solo contaminado com hidrocarbonetos e demonstraram que a linhagem é capaz de sobreviver em solventes orgânicos em pH alcalino. *B. circulans* também é capaz de produzir exopolissacarídeos, que são estruturas que garantem a sobrevivência bacteriana em biofilmes (VIDHYALAKSHMI et al., 2016).

Há poucos dados na literatura sobre *B. infantis* e *B. sibiralis*. *B. infantis* é uma espécie encontrada em ambientes marinhos, apesar de ter sido inicialmente isolada de cultura de sangue de paciente recém-nascido (KO et al., 2006, MASSILAMANY et al., 2016, RONZHEIMER et al., 2018). Outros autores isolaram *B. infantis* de solo e demonstraram a produção de proteases termoestáveis por esta espécie (SAGGU; MISHRA, 2017). Já a espécie *B. sibiralis* foi descrita por Petterson et al. (2000), a partir de amostras de ensilagem de grama. Não há outros trabalhos na literatura relacionados a esta espécie.

A espécie *B. subtilis* foi subdivida nas subespécies *B. subtilis* subsp. *subtilis* e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* por Nakamura, Roberts e Cohan (1999), com base em estudos relacionados à similaridade de DNA (60-70%) e em diferenças observadas na composição da parede celular (presença ou ausência de ribitol). A terceira subespécie denominada *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* foi descrita somente dez anos depois por Rooney et al. (2009), após identificação de um único clado durante análise de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) do grupo *B. subtilis*. Neste mesmo trabalho, foi reportado que esta espécie possui um único biomarcador identificado por MALDI-TOF MS, com m/z igual a 1.120,8, capaz de distingui-la das outras subespécies. A subespécie *B. subtilis* subsp. *stercoris*, encontrada no presente trabalho, foi descrita por Adelskov e Patel (2016 e 2017), com base em análises de *Average Nucleotide Identity based on BLAST* (ANIb), que sugerem que *B. subtilis* subsp. *stercoris* está distantemente relacionada a *B. subtilis* subsp. *subtilis* (95,6%), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (93%) e *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (92%). Recentemente, Dunlap, Bowman e Zeigler (2020) reclassificaram as quatro subespécies como espécies distintas, com base em estudos filogenéticos, fenotípicos e em genômica comparativa.

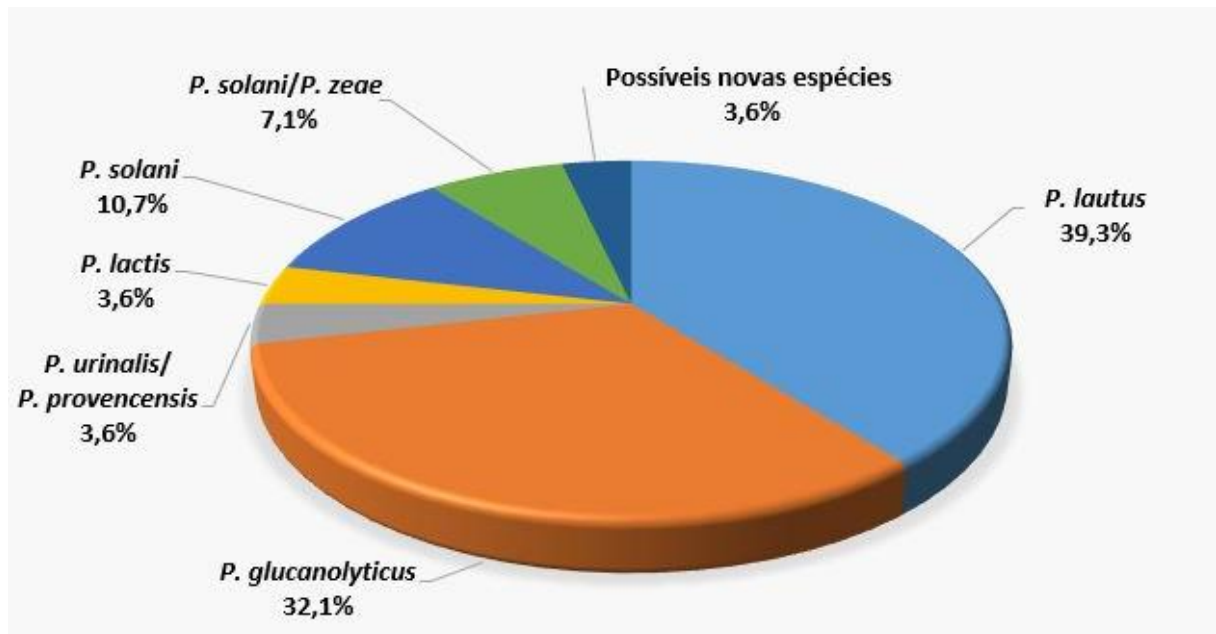
O gênero *Paenibacillus* foi encontrado em 30,4% dos isolados identificados em nível de gênero no presente trabalho, conforme descrito anteriormente (Figura 2). *Paenibacillus* contempla a família Paenibacillaceae e as espécies deste gênero

podem ser Gram-positivas, Gram-negativas e Gram-variáveis e ser isoladas dos mais variados ambientes; das regiões polares aos trópicos e dos ambientes aquáticos ao mais seco dos desertos, sendo solo e raízes de plantas os habitats mais comuns. Muitas espécies produzem antimicrobianos, que podem ser utilizados na medicina, ou como pesticidas, e enzimas, que podem ser utilizadas em biorremediação e na produção de reagentes químicos. Algumas espécies são conhecidas como promotoras do crescimento de plantas; outras como patógenos de abelhas ou outros invertebrados; enquanto outras são patógenos oportunistas de seres humanos (BAI et al., 2012; GRADY et al., 2016; MATHEWS; PAWLAK; GRUNDEN, 2014; MATHEWS; PAWLAK; GRUNDEN, 2016; YADAV; DUBEY, 2018).

Espécies do gênero *Paenibacillus* foram originalmente incluídas no gênero *Bacillus*. No início da década de 1990, estudos filogenéticos baseados na análise do gene 16S rRNA demonstraram que essas sequências resultavam em cinco grupos distintos e um deles originou o gênero *Paenibacillus*, em 1993. A espécie tipo do gênero é *P. polymyxa*. O nome *Paenibacillus* é derivado do advérbio em latim *paene*, cujo significado é quase, logo o nome tem sentido de “quase um *Bacillus*” (ASH et al., 1991; ASH; PRIEST; COLLINS, 1993; GRADY et al., 2016). Desde a criação do gênero, muitas espécies foram reclassificadas e outras descritas; portanto, atualmente, o gênero compreende 253 espécies (Tabela 8 (PARTE, 2018)).

Dentre as espécies de *Paenibacillus* isoladas no presente trabalho, *P. lautus* (39,3%) e *P. glucanolyticus* (32,1%) foram as mais prevalentes (Figura 4). *P. lautus* foi, inicialmente, descrito como *Bacillus lautus* por Nakamura (1984) e, posteriormente, reclassificado, como *P. lautus* por Heyndrickx et al. (1996). Esta espécie já foi isolada de solo, ambientes marinhos, amostras clínicas e apresenta pleomorfismo, podendo variar, em sua forma vegetativa, de bastonetes móveis a cocos imóveis (CELANDRONI et al., 2016; HEYNDRICKX et al., 1996; MANGWANI et al., 2014). Por sua vez, *P. glucanolyticus* foi, inicialmente, descrito como *Bacillus glucanolyticus* por Alexander e Priest (1989) e foi, posteriormente, reclassificado, como *P. glucanolyticus* por Shida et al. (1997). A espécie já foi isolada de solo e de amostras clínicas (ALEXANDER; PRIEST, 1989; CELANDRONI et al., 2016; FERRAND et al. 2013). Shida et al. (1997) também demonstraram, através da análise do gene 16S rRNA e de ensaios bioquímicos, que *P. lautus* e *P. glucanolyticus* são espécies intimamente relacionadas.

Figura 4 – Grupos/espécies de *Paenibacillus* isolados em Bio-Manguinhos



Fonte: (A autora, 2020).

A terceira espécie do gênero *Paenibacillus* mais frequentemente isolada no presente trabalho foi *P. solani* (10,7%), tendo os isolados apresentado 98,8% de similaridade com esta espécie. Por outro lado, 7,1% das linhagens deste gênero foram identificadas como *P. solani/P. zeae* (Figura 4), apresentando 99,0% e 98,7% de similaridade com estas espécies, respectivamente. *P. solani* foi uma espécie isolada de amostras de solo de campo de produção de batatas, na China (LIU et al., 2016), enquanto *P. zeae* foi isolada de sementes híbridas de milho, também na China (LIU et al., 2015b). Não foram encontrados outros trabalhos na literatura sobre estas espécies.

Tanto *P. lactis*, quanto *P. urinalis/P. provencensis* foram identificadas em 3,6% dos isolados (Figura 4). *P. lactis* foi inicialmente isolada em 2004 de amostras de leite cru e de leite pasteurizado (SCHELDELMAN et al., 2004). Dados mais recentes da literatura associaram esta espécie à produção de enzimas com potencial aplicação em diversas áreas industriais (ALI; HEMEDA; ABDELALIEM, 2019; BAI et al, 2012; MILANOVIC et al., 2017). As espécies *P. urinalis* e *P. provencensis* foram descritas por Roux, Fenner e Raoult (2008), a partir de amostras de urina e de fluido cerebrospinal humano, respectivamente, e foi demonstrado através da análise do gene 16S rRNA, que estas espécies estão estreitamente

relacionadas. Estudos posteriores demonstraram o isolamento de *P. provencensis* de amostra clínica de paciente com endocardite (PINHO-GOMES et al., 2017) e de frascos a serem utilizados em procedimentos de mesoterapia (GALMÉS-TRUYOLS et al., 2011).

Dentre os isolados identificados como *Paenibacillus*, 3,6% (uma linhagem – B399/17) apresentou < 98,7% de similaridade com outras linhagens do gênero, o que indica a possibilidade de novas espécies. Como já descrito anteriormente, não há muitos trabalhos na literatura sobre espécies identificadas em áreas limpas. Em função disso, é bem provável que estes ambientes representem uma fonte considerável de espécies a serem descritas.

Espécies do gênero *Cytobacillus* representaram 6,5% dos isolados no presente trabalho (Figura 2). Dos seis isolados encontrados, cinco (83,3%) pertenciam a *C. oceanisedimins/C. firmus* (99,1% a 99,6% de similaridade) e um (16,7%) foi identificado como *C. gottheilii* (99,9% de similaridade) (Tabela 10).

Conforme mencionado anteriormente, os gêneros *Cytobacillus*, *Metabacillus* e *Neobacillus* foram recentemente descritos e suas espécies pertenciam, anteriormente, ao gênero *Bacillus*. Os três gêneros ainda estão classificados como membros da família Bacillaceae (PATEL; GUPTA, 2020).

O gênero *Cytobacillus* é composto por bastonetes Gram-positivos ou Gram-variáveis esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, cujas espécies foram isoladas de ambientes diversos, como sedimentos marinhos, solo, minhocas, trato intestinal de humanos e unidades de produção farmacêutica (PATEL; GUPTA, 2020). *C. oceanisedimins* foi originalmente descrito como *B. oceanisedimins* por Zhang et al. (2010) e isolado de amostras de sedimentos marinhos da China e da Coreia (JUNG et al., 2016; ZHANG et al., 2010). Estudos filogenéticos a partir da análise do gene 16S rRNA e do genoma completo demonstraram que *B. oceanisedimins* e *B. firmus* compunham o mesmo ramo monofilético (PATEL; GUPTA, 2020; ZHANG et al., 2010). *C. firmus* foi originalmente descrito por Bredemann e Werner, em 1933, como *B. firmus* (PARTE, 2018). A espécie já foi isolada de sedimentos marinhos na China e de solos diversos e tem sido muito utilizada na produção de variadas enzimas, em processos de biorremediação e na agricultura, compondo, inclusive, fórmula comercial aplicada na promoção do crescimento de vegetais e na proteção contra patógenos (EL-ESAWI et al., 2018; GENG et al., 2014; MANDAL et al., 2014; MENDIS et al., 2018). Por sua vez, a

espécie *C. gottheilii*, inicialmente descrita como *B. gottheilii*, foi isolada a partir do monitoramento ambiental de salas limpas de uma unidade de produção de vacinas na Alemanha (SEILER et al., 2013). Posteriormente, foi isolada de amostras de solo e de mangue e utilizada na remediação de microplásticos e na produção de enzima com potencial aplicação na indústria de alimentos (AUTA et al., 2017; SELVARAJ; VYTILA, 2018).

O gênero *Lysinibacillus* abrange 4,3% das linhagens identificadas neste trabalho (Figura 2). Dentre as quatro linhagens do gênero encontradas, três (75%) foram identificadas como *L. fusiformis*/*L. sphaericus*/*L. xylanilyticus*/*L. macroides*/*L. pakistanensis* e uma (25%) foi identificada como *L. chungkukjangi*/*L. sinduriensis* (Tabela 10). As primeiras três linhagens mencionadas apresentaram de 99,7% a 99,9% de similaridade com *L. fusiformis* e de 98,7% a 99,2% de similaridade com *L. sphaericus*, *L. xylanilyticus*, *L. macroides* e *L. pakistanensis*. O outro isolado do gênero apresentou 100% de similaridade com *L. chungkukjangi* e 99,1% de similaridade com *L. sinduriensis*.

O gênero *Lysinibacillus* foi descrito por Ahmed et al. (2007) e contempla BGPE móveis, tolerantes a boro, isolados de solos agrícolas e de águas residuais. *Lysinibacillus* pertence à família Bacillaceae e a espécie tipo deste gênero é *L. boronitolerans*. O nome *Lysinibacillus* é proveniente do tipo de peptidoglicana (lisina-aspartato) presente na parede celular de seus membros, que anteriormente compreendiam o gênero *Bacillus* (AHMED et al., 2007; SULAIMAN et al., 2018).

A espécie *L. fusiformis* é uma das mais conhecidas do gênero e já foi associada a várias doenças em humanos, como úlceras, sepses severas e doenças respiratórias. No entanto, estudos demonstraram também a presença desta espécie em creme para uso cosmético e em formulações probióticas (CELANDRONI et al., 2019; SULAIMAN et al., 2018). *L. sphaericus* é um conhecido patógeno de insetos, compondo, inclusive, fórmulas comerciais para uso inseticida (BERRY, 2012). Por outro lado, há trabalhos demonstrando o isolamento de *L. xylanilyticus* de húmus de floresta na Coreia (LEE et al., 2010) e a presença desta espécie e de *L. macroides* em solos ricos em selênio na China (ZHANG et al., 2019). Além disso, outros autores verificaram a utilidade de *L. xylanilyticus* em processos de biodegradação de plásticos sintéticos e de filtros de papel de celulose (ESAMEILI et al., 2013, YOUSEF; MAWAD; ABEED, 2019) e de *L. macroides*, espécie inicialmente isolada de fezes de animais, em processos ecológicos de geração de energia verde

(COOREVITS et al., 2012; VANITHA et al., 2017). Já *L. pakistanensis*, originalmente isolada de solo, no Paquistão, apresentou potencial utilização no tratamento de águas residuais hipersalinas (AHMED et al., 2014; WU et al., 2020). As espécies *L. chungkukjangi* e *L. sinduriensis* foram isoladas de alimento e de sedimentos marinhos, respectivamente (JUNG et al., 2012; KIM et al., 2013). Não foram encontrados dados na literatura relacionando a presença das espécies acima mencionadas em áreas limpas.

Apenas uma linhagem foi isolada, no presente trabalho, dos gêneros *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Oceanobacillus*, *Sporosarcina* e *Terribacillus* (Tabela 10), o que representa 1,1% do total de linhagens (Figura 2).

Tabela 10 – Grupos/espécies de bastonetes Gram-positivos menos prevalentes nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos.

Grupos/espécies	Número de isolados
<i>Cytobacillus gottheilii</i>	1
<i>Cytobacillus oceanisediminis/C. firmus</i>	5
<i>Lysinibacillus chungkukjangi/L. sinduriensis</i>	1
<i>Lysinibacillus fusiformis/L. sphaericus/ L. xylanilyticus/L. macroides/L. pakistanensis</i>	3
<i>Metabacillus halosaccharovorans/M. niabensis</i>	1
<i>Neobacillus niacini/N. drentensis</i>	1
<i>Oceanobacillus caeni</i>	1
<i>Sporosarcina soli/S. contaminans/S. koreensis</i>	1
<i>Terribacillus saccharophilus/T. goriensis/T. halophilus</i>	1

Fonte: (A autora, 2020).

O gênero *Metabacillus* contempla bastonetes Gram-positivos ou Gram-variáveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos e formadores de esporos, cuja linhagem tipo é *M. jeotgali*. As espécies do gênero já foram isoladas de ambientes variados, como solo, intestino humano, sistemas de águas residuais, águas subterrâneas, aquíferos termais e lagos (PATEL; GUPTA, 2020). O único isolado deste gênero, neste trabalho, apresentou 99,7% e 99,2% de similaridade com *M.*

halosaccharovorans e *M. niabensis*, respectivamente. As espécies *M. halosaccharovorans* e *M. niabensis* foram, originalmente, isoladas de lago hipersalino, no Irã, e de compostagem de resíduos de algodão, na Coreia, respectivamente (KWON et al., 2007b; MERSHAD et al., 2013). Não há mais informações, na literatura, acerca destas espécies.

O gênero *Neobacillus* contempla espécies com as mesmas características descritas para o gênero acima; essas espécies foram isoladas de solo, pele e trato intestinal de humanos e raízes de plantas (PATEL; GUPTA, 2020). A espécie tipo *N. niacini* já foi isolada de solo, lodo ativado e ambientes marinhos e é capaz de utilizar nicotinato como única fonte de carbono, nitrogênio e energia. Recentemente, foi demonstrado que a espécie produz enzimas capazes de biodegradar polivinil-álcool (BIAN et al., 2019; KURATA et al., 2015; NAGEL; ANDREESEN, 1991). Por outro lado, estudos demonstraram que a espécie *N. drentensis* pode ser utilizada, no futuro, em processos de biorremediação de metais pesados e na produção de bioplásticos (HEYRMAN et al., 2004; KIM; LEE; WANG, 2014; PENKRUE et al., 2020). A única linhagem identificada como *Neobacillus* no presente trabalho apresentou 99,8% e 99,1% de similaridade com *N. niacini* e *N. drentensis*, respectivamente.

Lu, Nogi e Takami (2001) descreveram o gênero *Oceanobacillus*, cujo nome significa “*Bacillus* do oceano”, pois a linhagem tipo *O. iheyensis* foi isolada de mar profundo. O gênero pertence à família Bacillaceae e contempla BGPE aeróbios obrigatórios e extremamente halotolerantes. Apenas umas das linhagens manipuladas, no presente trabalho, foi identificada como *O. caeni*, apresentando similaridade de 99,9% com esta espécie. *O. caeni* foi originalmente isolada de lodo ativado de uma estação de tratamento de resíduos, na Coreia (NAM; BAE; LEE, 2008). Não foram encontrados, na literatura, outros trabalhos acerca desta espécie.

O gênero *Sporosarcina* foi descrito por Kluyver e Van Niel, em 1936, para linhagens de BGPE da família Bacillaceae, cujo formato celular se apresentava esférico e oval. A linhagem tipo do gênero é *S. ureae* e, atualmente, *Sporosarcina* pertence à família *Caryophanaceae* (KWON et al. 2007a; PARTE, 2018; YOON et al., 2001). A única linhagem deste trabalho identificada como *Sporosarcina* apresentou 99,9%, 99,0% e 98,8% de similaridade com as espécies *S. soli*, *S. contaminans* e *S. koreensis*, respectivamente (Tabela 10). *S. soli* e *S. koreensis* foram isoladas do solo de uma montanha, na Coreia, enquanto *S. koreensis* foi

isolada do chão de uma sala limpa industrial, na Suíça (KAMPFER et al., 2010; KWON et al., 2007a). Dados da literatura demonstraram a produção ecológica de nanopartículas de ouro e prata por *S. koreensis* e potencial utilização de *S. soli* em processos de biorremediação de solos contaminados por cobre (KANG et al., 2016; SINGH et al., 2016).

O último gênero encontrado no presente estudo foi *Terribacillus*, que foi descrito por An et al. (2007) como BGPE aeróbios móveis ou imóveis. *T. saccharophilus* é a linhagem tipo do grupo e já foi isolada de solo e de raízes de vegetais (AN et al., 2007; KRISHNAMURTHI; CHAKRABARTI, 2008; SALOMON et al., 2016). Apenas um isolado, neste trabalho, foi identificado como *Terribacillus*, apresentando 100%, 100% e 99,1% de similaridade com as espécies *T. saccharophilus*, *T. goriensis* e *T. halophilus*, respectivamente. *T. goriensis* foi isolado de água costeira, na Coreia (KIM et al., 2007) e *T. halophilus* de solo de campo, no Japão e de lagos salinos, na Tunísia (AN et al., 2007; ESSGHAIER et al., 2009). Não foram encontrados, na literatura, outros trabalhos sobre estas espécies.

4.5 Análise filogenética a partir da análise do gene 16S rRNA por gênero

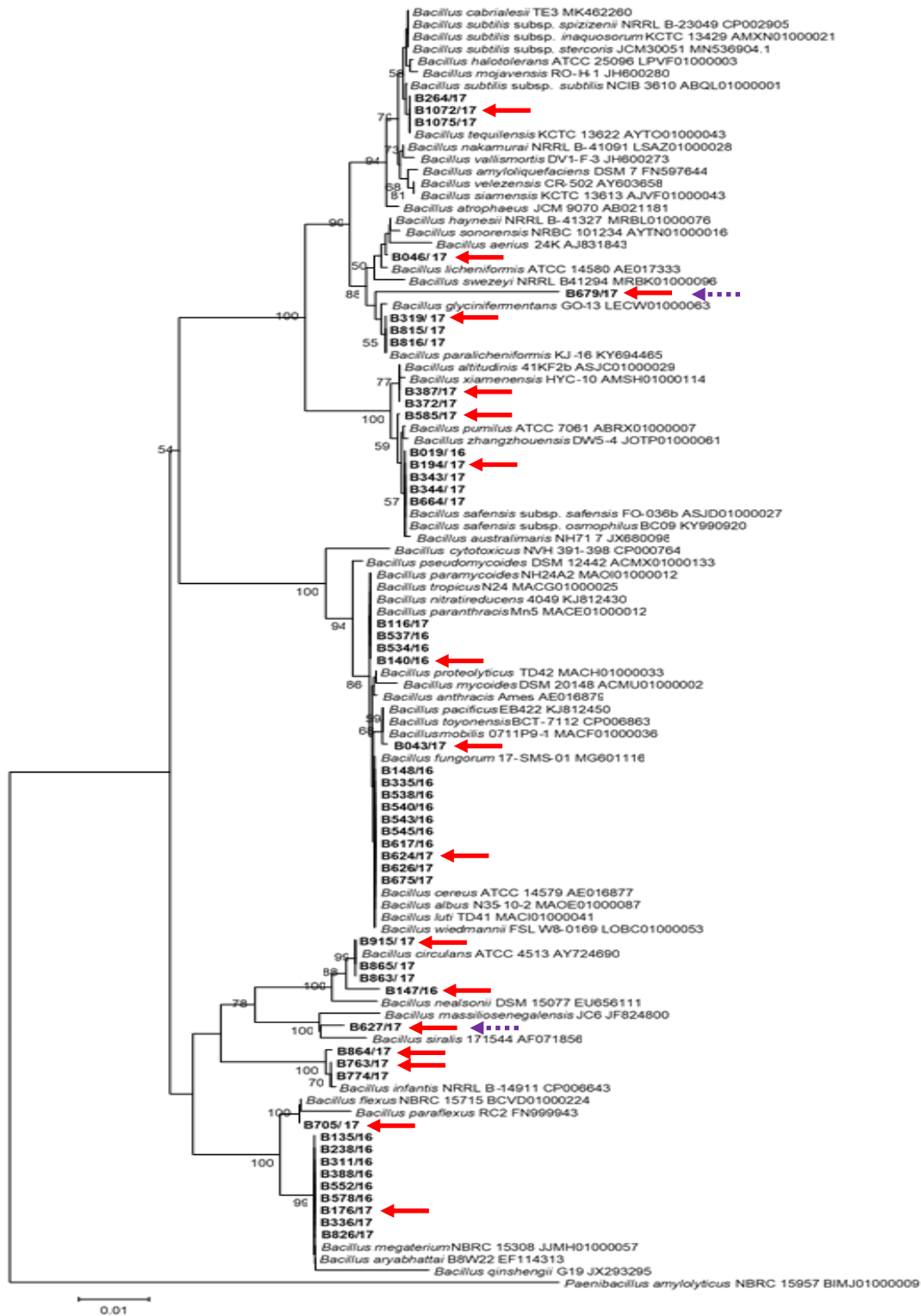
Conforme demonstrado acima, não foi possível atingir a identificação em nível de espécie de todas as linhagens avaliadas. Para isso, seria necessário o sequenciamento de outros genes *housekeeping*, o que não seria possível para as 97 linhagens, em virtude de tempo e custo. Por isso, realizou-se então a análise filogenética dos isolados, por gênero, de modo que uma linhagem, de cada grupo taxonômico encontrado, fosse selecionada para as etapas de sequenciamento subsequentes.

Dentre as 49 linhagens identificadas como *Bacillus*, a partir da análise filogenética com base no gene 16S rRNA, foram identificados 17 grupos taxonômicos, dos quais um isolado de cada, foi selecionado para a análise de outros genes *housekeeping* (Figura 5). Pode-se observar a baixa resolução do gene 16S rRNA para a identificação de *Bacillus*, já que apenas 18,3% das linhagens deste gênero foram identificadas em nível de espécie (Figura 3).

O primeiro grupo taxonômico observado foi o ramo composto pelas linhagens B264/17, B1072/17 e B1075/17, pertencentes ao grupo *B. subtilis*. O ramo composto por B319/17, B815/17 e B816/17 também foi considerado como pertencente ao

grupo *B. subtilis*, porém as linhagens estão mais próximas das espécies *B. paralicheniformis* e *B. glycinifermentans* e, por isso, foram consideradas grupos taxonômicos distintos, assim como B046/17, que apresentou maior similaridade com *B. licheniformis* (Figura 5).

Figura 5 - Árvore filogenética das linhagens identificadas como *Bacillus* (1.317 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta vermelha contínua - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*, seta lilás tracejada - possíveis novas espécies.

As linhagens B372/17 e B387/17 compreendem o mesmo ramo que as espécies *B. altitudinis* e *B. xiamenensis*. Por outro lado, as linhagens B019/17, B194/17, B343/17, B344/17 e B664/17 pertencem ao mesmo ramo que as espécies *B. safensis* subsp. *safensis*, *B. safensis* subsp. *osmophilus* e *B. australimaris*. Já a linhagem B585/17 compreende um ramo distinto, mais próximo da *B. pumilus*. As oito linhagens pertencem ao grupo *B. pumilus*, porém resultam em três grupos taxonômicos distintos (Figura 5).

O grupo de espécies mais encontrado no presente trabalho foi *B. cereus*, conforme demonstrado na Figura 3. As 15 linhagens identificadas como pertencentes a este grupo contemplam três diferentes ramos. As linhagens B116/17, B537/16, B534/16 e B140/16 compreendem o mesmo ramo que *B. paramycoides*, *B. tropicus*, *B. nitratreducens* e *B. paranthracis*. Já B043/17 integra o mesmo ramo que *B. mobilis*, *B. toyonensis* e *B. pacificus*. Por outro lado, as linhagens B148/16, B335/16, B538/16, B540/16, B543/16, B545/16, B617/16, B624/17, B626/17 e B675/17 pertencem ao mesmo ramo que *B. cereus*, *B. albus*, *B. luti* e *B. wiedmannii*.

As linhagens B915/17, B865/17, B863/17 e B147/16 foram identificadas como *B. circulans*, porém a última compreendeu um ramo distinto das três primeiras (Figura 5), o que pode ser explicado pelo percentual de similaridade bem mais baixo em relação a *B. circulans* (99,1%), em comparação às três primeiras (99,9%).

De acordo com a análise filogenética realizada, é possível que duas linhagens de *Bacillus* isoladas sejam novas espécies, já que ficaram muito distantes das linhagens tipo mais próximas: B679/17 e B627/17 (Figura 5). Para ratificar essa hipótese, as sequências do gene 16S rRNA dessas linhagens também foram comparadas com as sequências tipo depositadas no *GenBank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A linhagem B679/17 havia sido identificada como *B. subtilis* subsp. *stercoris* com 98,8% de similaridade, conforme o banco de dados *EZBioCloud* (<https://www.ezbiocloud.net/>; YOON et al., 2017). Comparando-se esta sequência com o *GenBank*, todos os percentuais de similaridade ficaram abaixo de 98,7%, o que indica a possibilidade de nova espécie (NGUYEN et al., 2016, SEUYLEMEZIAN et al., 2018), sendo as linhagens mais próximas *B. haynesii* (98,0%) e *B. paralicheniformis* (98,0%). Já a linhagem B627/17 foi identificada como *B. soralis* com 98,8% de similaridade, conforme o banco de dados *EZBioCloud* e com 98,5% de similaridade, conforme o *GenBank*, resultados que também sugerem a possibilidade de nova espécie. Esta diferença de resultados entre os bancos de

dados se deve aos diferentes algoritmos, ferramentas de pesquisa, análise filogenética e alinhamento das sequências utilizadas em cada um deles (PARK et al., 2012). O banco de dados *EZBioCloud* foi utilizado neste trabalho, para análise do gene 16S rRNA, pois as sequências depositadas são curadas e as informações taxonômicas corretas são mantidas e atualizadas com frequência (YOON et al., 2017).

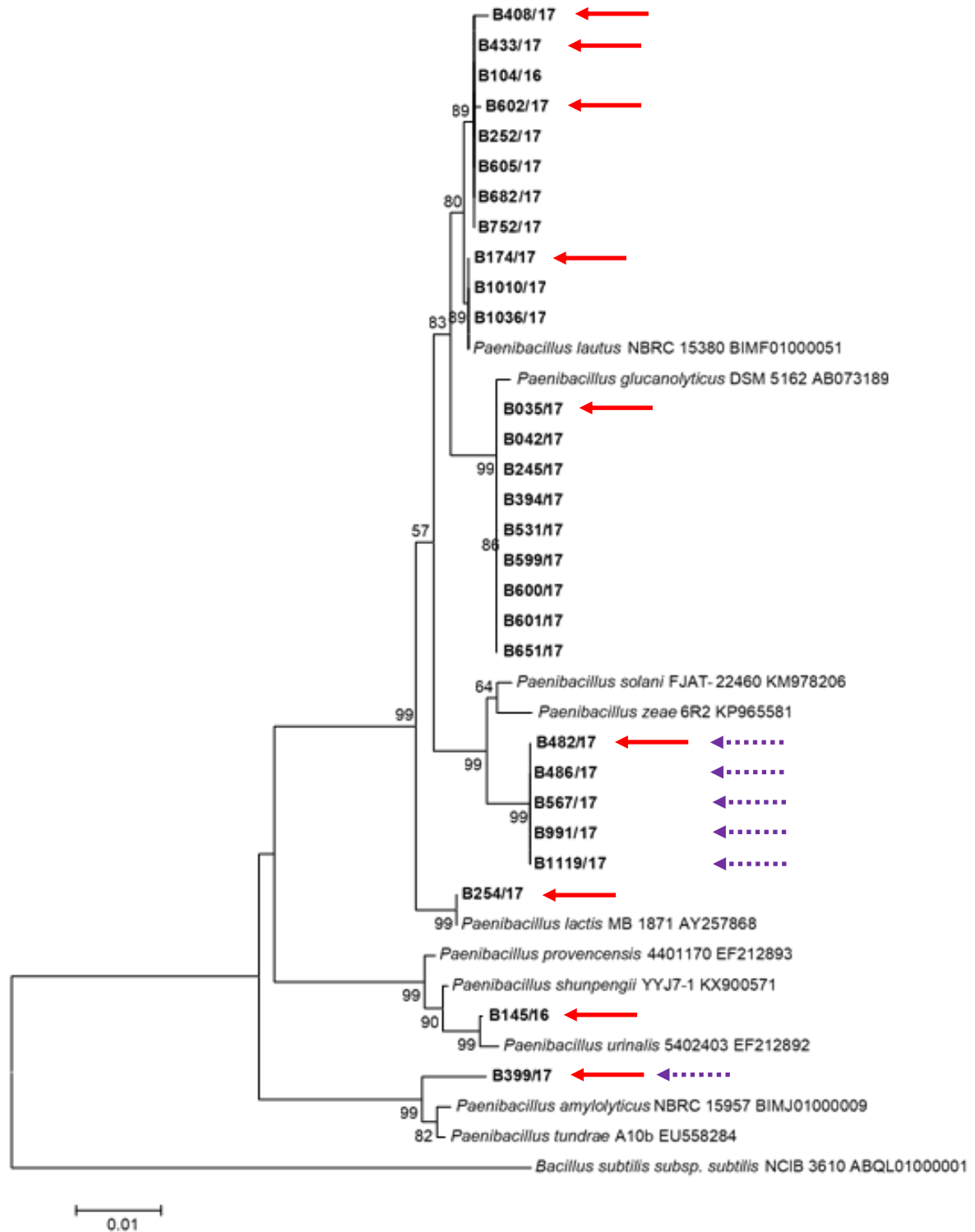
As linhagens B864/17, B763/17 e B774/17 foram identificadas como *B. infantis*, porém B864/17 ficou alocada em um ramo distinto das outras (Figura 5), apesar dos percentuais de similaridade próximos destas linhagens em relação a *B. infantis*: 99,8% (B864/17) e 99,9% (B763/17 e B774/17).

Dez linhagens foram identificadas, no presente trabalho, como pertencentes ao grupo de espécies *B. megaterium*//*B. flexus*/*B. paraflexus*, conforme demonstrado anteriormente, sendo que nove linhagens compreendem o mesmo ramo que *B. megaterium* (B135/16, B238/16, B311/16, B388/16, B552/16, B578/16, B176/17, B336/17 e B826/17), enquanto uma delas (B705/17) pertence ao mesmo ramo que *B. flexus* (Figura 5). Vale lembrar que *B. aryabhatai* foi recentemente reclassificada por ser considerada um sinônimo heterotípico tardio de *B. megaterium* (RAO et al., 2019).

Dentre as 28 linhagens identificadas como *Paenibacillus*, a partir da análise filogenética com base no gene 16S rRNA, foram identificados nove grupos taxonômicos, dos quais um isolado de cada, foi selecionado para a análise de outros genes *housekeeping* (Figura 6). Quanto a este gênero, a análise do gene 16S rRNA apresentou maior resolução, do que em relação ao gênero *Bacillus*, já que a maior parte das linhagens foi identificada em nível de espécie (86%) (Figura 4).

As linhagens B408/17, B433/17, B104/16, B602/17, B252/17, B605/17, B682/17, B752/17, B174/17, B1010/17 e B1036/17 foram identificadas como *P. lautus*. No entanto, B174/17, B1010/17 e B1036/17 integram um ramo diferente das outras linhagens. Apesar das linhagens B408/17, B433/17, B104/16, B602/17, B252/17, B605/17, B682/17, B752/17 pertencerem ao mesmo ramo, B408/17 e B602/17 apresentam diferenças nas sequências, em relação às outras linhagens. Por isso, dentre as linhagens identificadas como *P. lautus*, quatro delas foram selecionadas para as etapas subsequentes de sequenciamento (Figura 6).

Figura 6 - Árvore filogenética das linhagens identificadas como *Paenibacillus* (1.203 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta vermelha contínua - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*, seta lilás tracejada – possíveis novas espécies.

As linhagens B035/17, B042/17, B245/17, B394/17, B531/17, B599/17, B600/17, B601/17 e B651/17 foram identificadas como *P. glucanolyticus* e todas elas compõem o mesmo ramo filogenético, logo apenas uma delas foi selecionada para análises posteriores (Figura 6).

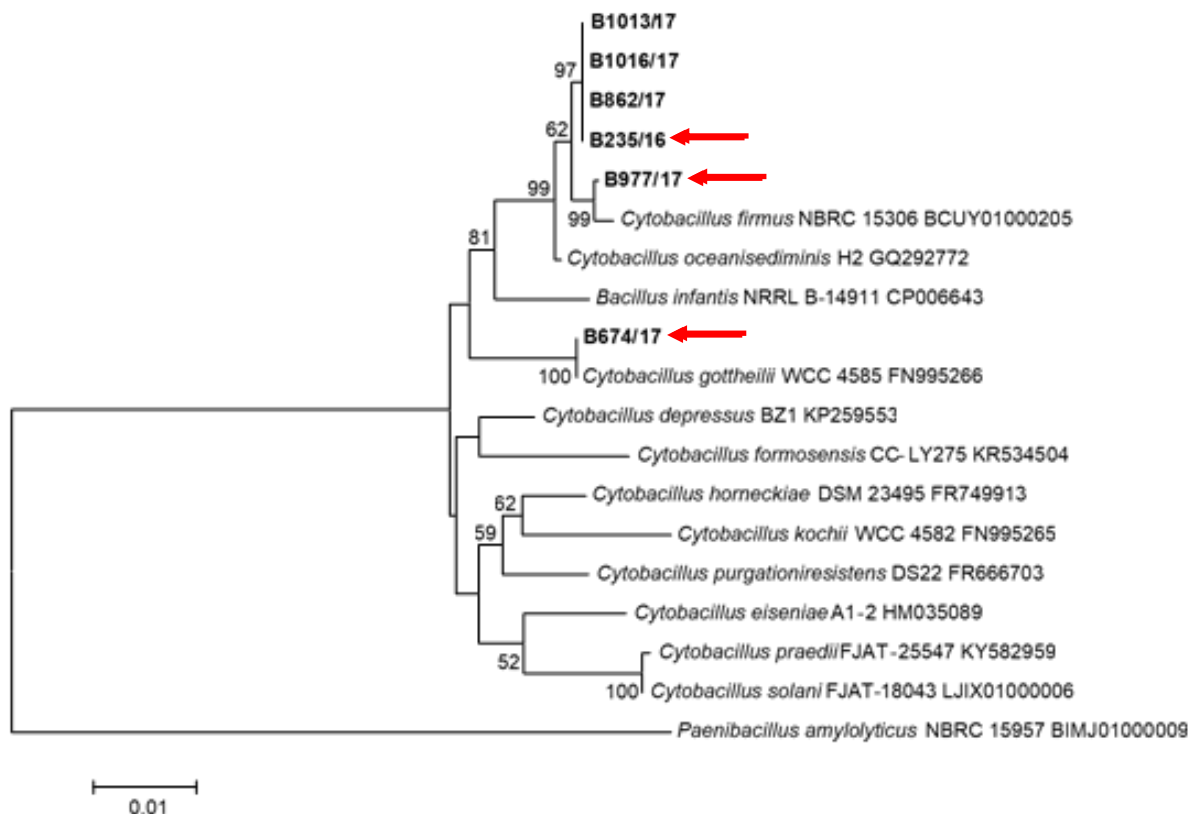
Já as linhagens B482/17, B486/17, B567/17 foram identificadas como *P. solani* com percentual de similaridade de 98,8% e B991/17 e B1119/17 como *P. solani/P. zaeae*, com similaridade de 99,0% em relação a *P. solani* e 98,7% em comparação com *P. zaeae*. No entanto, as cinco linhagens compuseram o mesmo ramo, sendo este um ramo distinto daquele composto pelas linhagens tipo de *P. solani* e *P. zaeae* (Figura 6), o que indica a possibilidade de cinco isolados de uma mesma nova espécie. Para confirmar essa teoria, as sequências do gene 16S rRNA dessas cinco linhagens foram analisadas após comparação com o *GenBank*: os percentuais de similaridade variaram de 98,6% a 98,8%, em relação a *P. solani* e de 98,0% a 98,3%, em relação a *P. zaeae*; resultados semelhantes aos encontrados com a utilização do banco de dados *EzBioCloud*, o que demonstra que esses percentuais se encontram próximos ao limite de 98,7%, abaixo do qual se considera uma nova espécie (NGUYEN et al., 2016; SEUYLEMEZIAN et al., 2018). Como os cinco isolados pertenciam ao mesmo ramo, apenas um deles foi selecionado para as próximas etapas de sequenciamento.

Conforme demonstrado na Figura 6, a linhagem B254/17 integra o mesmo ramo de *P. lactis*, tendo sido identificada com 99,1% de similaridade em relação a esta espécie. Já B145/16 compõe o mesmo ramo de *P. urinalis* o que indica pertencer a esta espécie, embora tenha apresentado 99,7% de similaridade com *P. urinalis* e 98,8% de similaridade com *P. provencensis*. A linhagem B399/17 pertence a um ramo único, o que indica a possibilidade de nova espécie. Ao comparar a sequência de B399/17 com os bancos de dados *EzBioCloud* e *GenBank*, a espécie mais próxima era *P. amylolyticus* (98,6% e 98,3%, respectivamente), com percentual de similaridade abaixo de 98,7%, o que sugere uma possível nova espécie.

Em relação ao gênero *Cytobacillus*, a análise do gene 16S rRNA permitiu a identificação em nível de espécies de apenas uma linhagem (16,7%), dentre as seis isoladas. A linhagem B674/17 foi identificada como *C. gottheilii* com 99,9% de similaridade, o que é confirmado a partir da análise filogenética, já que ambas compõem o mesmo ramo. Já as linhagens B1013/17, 1016/17, B862/17, B235/16 foram identificadas como *C. oceanisediminis* (99,6%)/*C. firmus* (99,1% a 99,3%), a

partir da análise do gene 16S rRNA, conforme já discutido anteriormente. No entanto, a linhagem B977/17 demonstrou maior similaridade em relação a *C. firmus* (99,5%) do que em relação a *C. oceanisediminis* (99,1%), o que se reflete na árvore filogenética construída, já que B977/17 pertence ao mesmo ramo que *C. firmus* e as outras quatro linhagens compõem um mesmo ramo, mais próximo ao ramo de *C. oceanisediminis*. Em função disso, B674/17, B977/17 e uma das outras quatro linhagens (B235/16) foram selecionadas para as próximas etapas de sequenciamento, para confirmação das espécies (Figura 7).

Figura 7 - Árvore filogenética das linhagens identificadas como *Cytobacillus* (1.379 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*).



Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta vermelha - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes housekeeping.

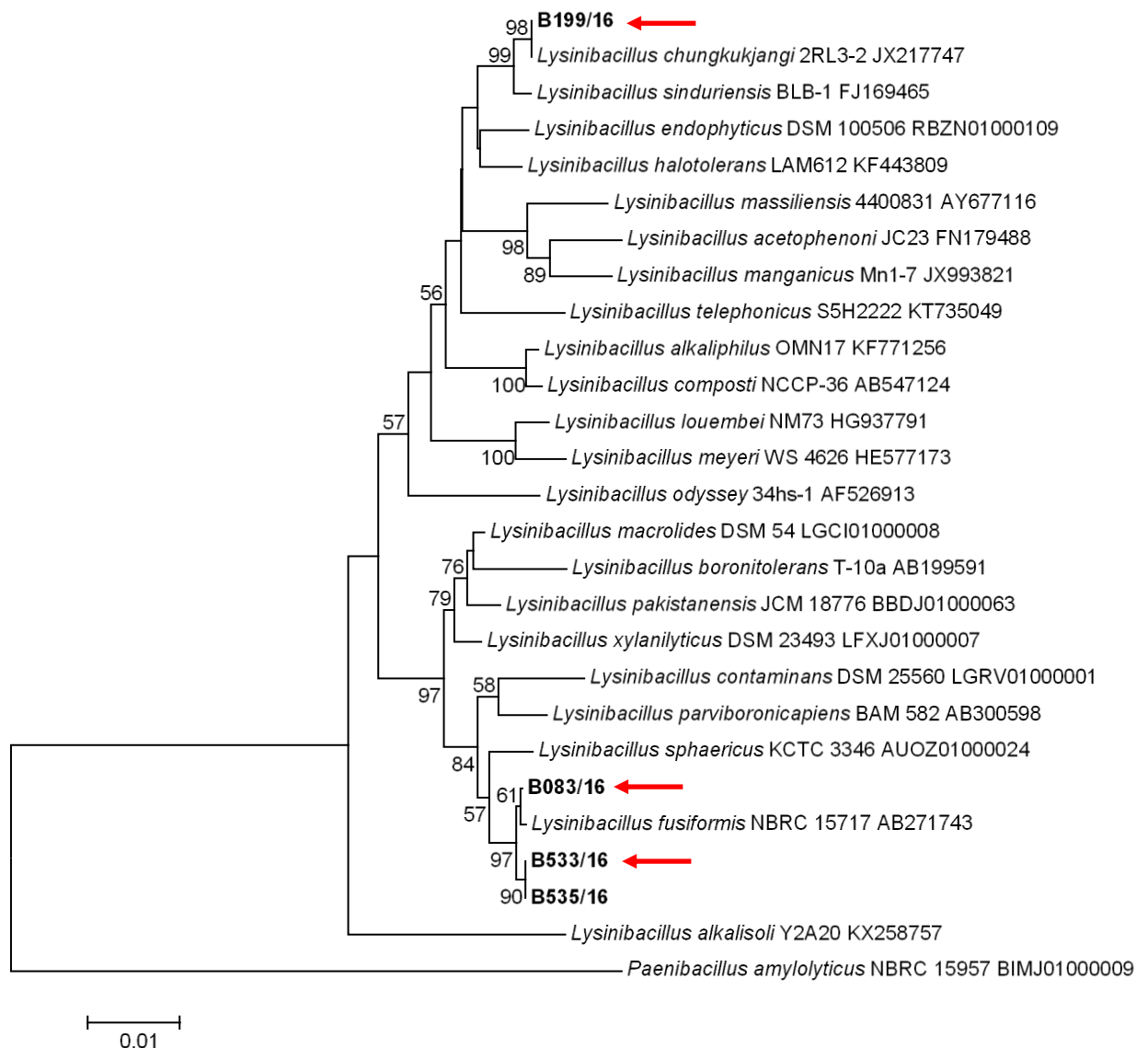
Quanto ao gênero *Lysinibacillus*, a análise do gene 16S rRNA não demonstrou resolução suficiente para a identificação em nível de espécie de nenhum dos quatro isolados encontrados. No entanto, apesar da linhagem B199/16 ter sido identificada como *L. chungkukjangi* (100%)/*L. sinduriensis* (99,1%), conforme já demonstrado anteriormente, o percentual de similaridade em relação à primeira espécie é bem maior (0,9%) do que em relação à segunda. Isto é corroborado pela análise filogenética realizada, que demonstra que B199/16 compõe o mesmo ramo que *L. chungkukjangi*, logo poderia ser considerada como pertencente a esta espécie. Além disso, em um trabalho de revisão que aborda a análise do gene 16S rRNA para a identificação e a descoberta de novas espécies, WOO et al. (2008) sugeriram que valores de corte maiores que 99,0%, ou até mesmo, de 99,5% podem ser utilizados para a identificação bacteriana, em alguns gêneros. Mesmo assim, esta linhagem foi selecionada para as próximas etapas, para confirmação da espécie. Situação semelhante ocorreu em relação às linhagens B083/16, B533/16 e B535/16. Conforme discutido anteriormente, apesar da análise do gene 16S rRNA indicar cinco possíveis espécies, estas linhagens apresentaram similaridade significativamente maior em relação a *L. fusiformis* (99,9%) do que em relação às espécies *L. sphaericus*, *L. xylanilyticus*, *L. macroides* e *L. pakistanensis* (98,7% a 99,2%). Além disso, a árvore filogenética demonstra que as três linhagens possuem o mesmo ancestral comum que *L. fusiformis*, enquanto as outras espécies pertencem a ramos distintos. A linhagem B083/16 apresentou ainda maior proximidade em relação a *L. fusiformis* que B533/16 e B535/16. Por isso, B083/16 e uma das últimas linhagens (B533/16) foram selecionadas para as próximas etapas de sequenciamento (Figura 8).

O único isolado do gênero *Metabacillus* encontrado no presente trabalho foi identificado como *M. halosaccharovorans* (99,7%)/*M. niabensis* (99,3%), a partir da análise do gene 16S rRNA, apresentando maior similaridade em relação à primeira espécie, o que pode ser demonstrado na árvore filogenética construída, já que a linhagem pertence ao mesmo ramo que *M. halosaccharovorans* (Figura 9). De qualquer forma, esta linhagem também foi selecionada para as próximas etapas para confirmação da espécie.

O mesmo raciocínio foi aplicado em relação ao único isolado do gênero *Neobacillus*. A linhagem B583/16 foi identificada como *N. niacini* (99,8%)/*N. drentensis* (99,1%), a partir da análise do gene 16S rRNA. A análise filogenética

demonstrou que B583/16 pertence ao mesmo ramo que *N. niacini*. Mesmo assim, esta linhagem foi selecionada para as próximas etapas de sequenciamento, para confirmação da espécie (Figura 10).

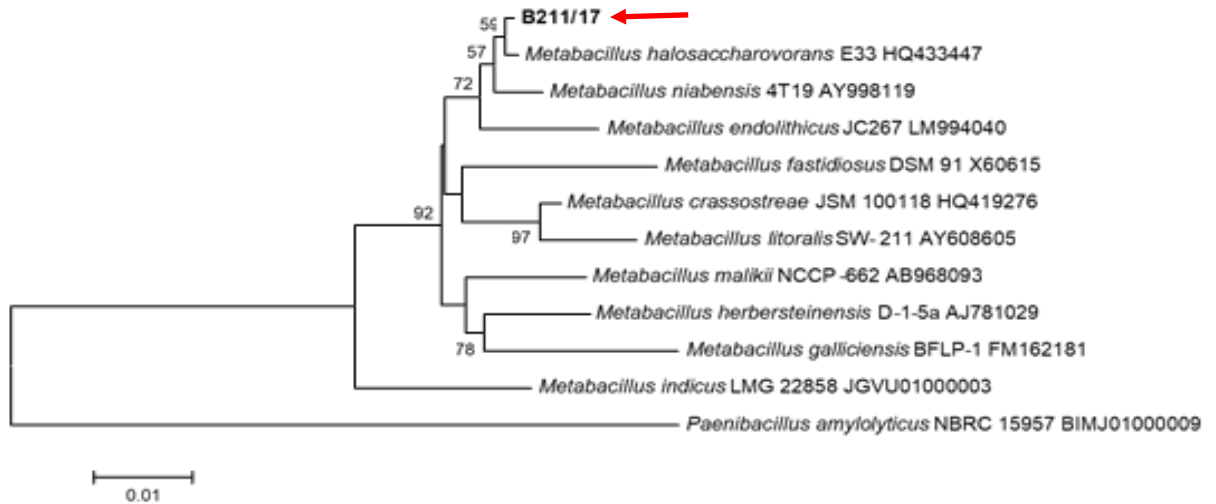
Figura 8 - Árvore filogenética das linhagens identificadas como *Lysinibacillus* (1.333 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta vermelha - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes housekeeping.

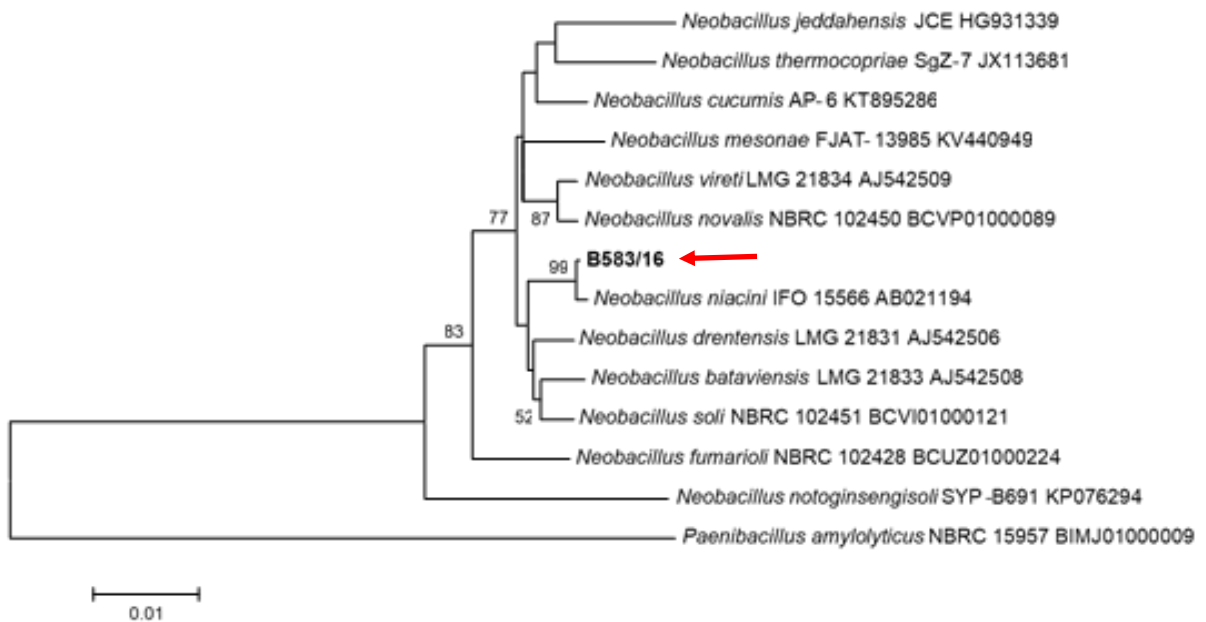
Figura 9 - Árvore filogenética da linhagem identificada como *Metabacillus* (1.337 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta vermelha - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*.

Figura 10 - Árvore filogenética da linhagem identificada como *Neobacillus* (1.354 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)

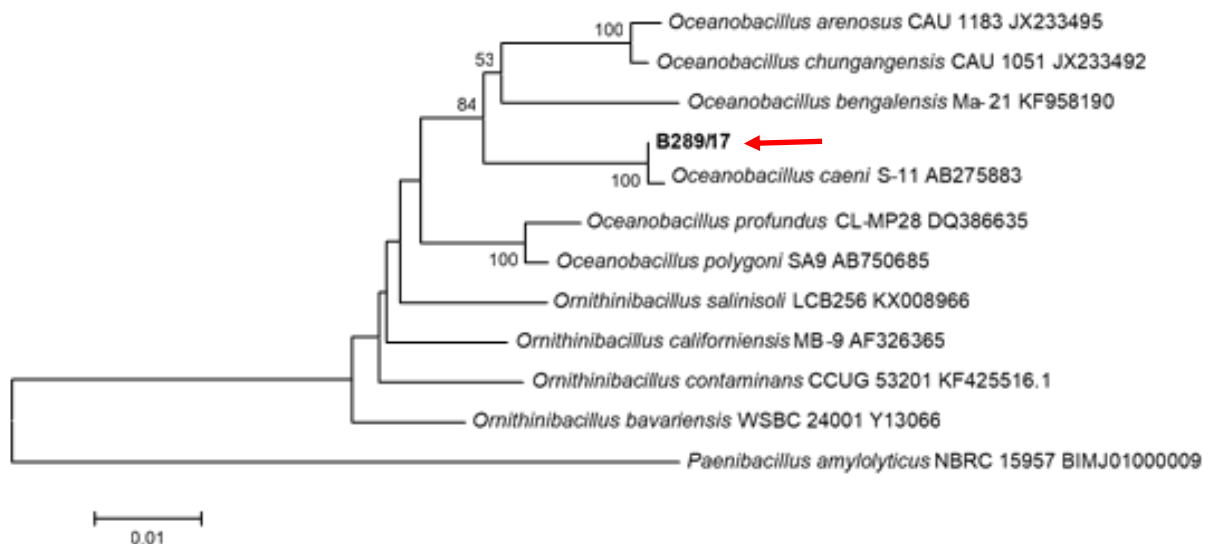


Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta vermelha - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*.

O único isolado do gênero *Oceanobacillus* encontrado no presente trabalho foi identificado, a partir da análise do gene 16S rRNA como *O. caeni*, com 99,6% de similaridade em relação a esta espécie, o que pode ser demonstrado na árvore filogenética construída, já que a linhagem pertence ao mesmo ramo que *O. caeni*, localizando-se este ramo bem distante das outras espécies do gênero (Figura 11). De qualquer forma, a linhagem B289/17 também foi selecionada para as próximas etapas de sequenciamento, para confirmação da espécie.

Figura 11 - Árvore filogenética da linhagem identificada como *Oceanobacillus* (1.348 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)

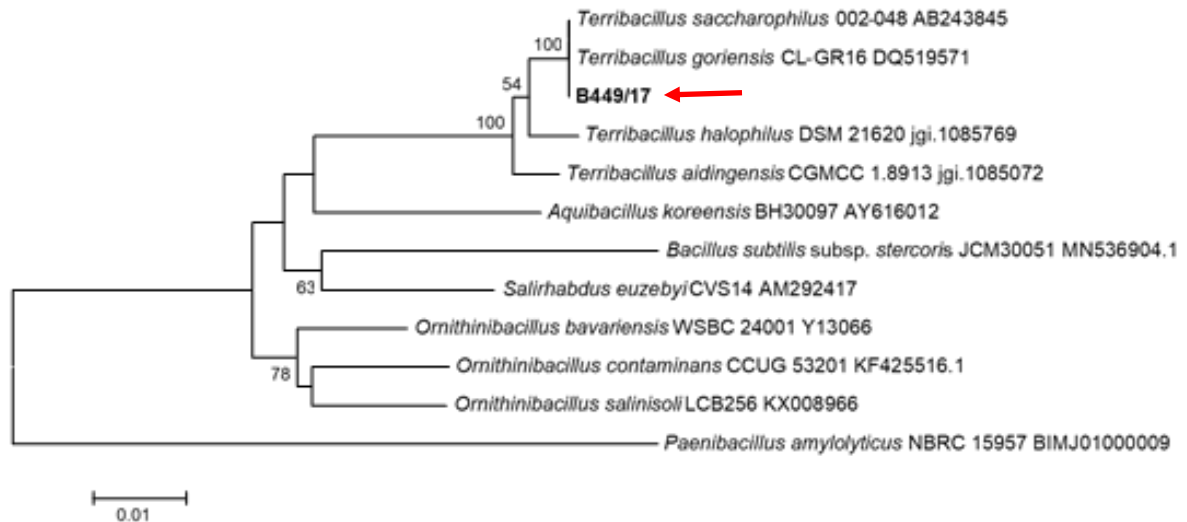


Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta vermelha - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*.

A linhagem B449/17 foi o único isolado do gênero *Terribacillus* encontrado no presente trabalho, tendo sido identificado, a partir da análise do gene 16S rRNA como *T. saccharophilus* (100%)/*T. goriensis* (100%)/*T. halophilus* (99,1%). A diferença significativa de similaridade com as primeiras espécies em relação a *T. halophilus* foi de 0,9%, o que foi corroborado pela análise filogenética, já que a linhagem pertence ao mesmo ramo que *T. saccharophilus* e *T. goriensis*, e *T. halophilus* integra um ramo distinto. Portanto, B449/17 foi selecionada para as próximas etapas de sequenciamento, para tentativa de definição da espécie como *T. saccharophilus* ou *T. goriensis* (Figura 12).

Figura 12 - Árvore filogenética da linhagem identificada como *Terribacillus* (1.362 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

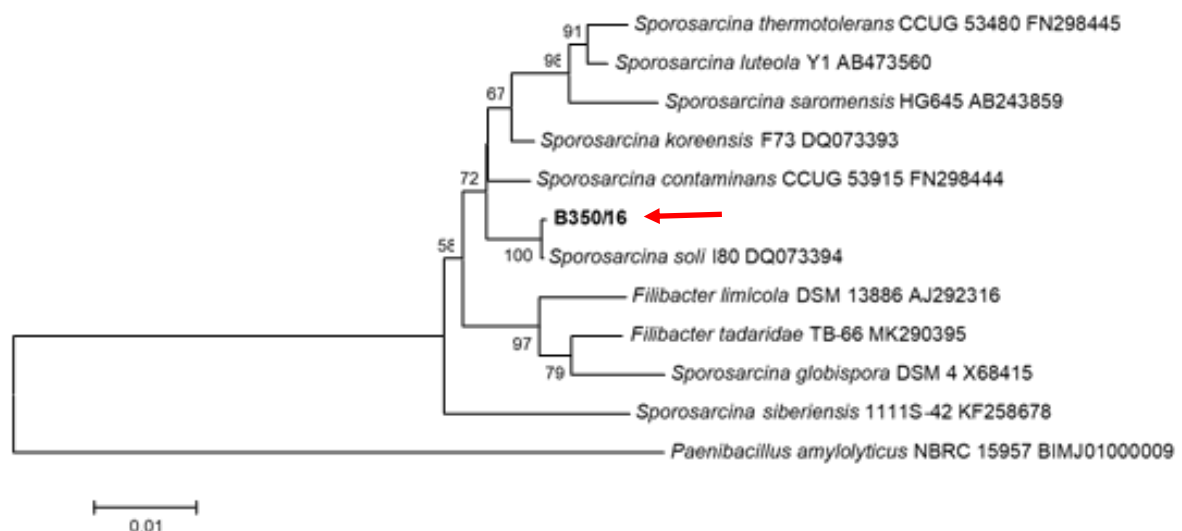
Legenda: Seta vermelha - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*.

A linhagem B350/16 foi o único isolado do gênero *Sporosarcina* encontrado no presente trabalho, tendo sido identificado, a partir da análise do gene 16S rRNA como *S. soli* (99,9%)/*S. contaminans* (99,0%)/*S. koreensis* (98,8%). A diferença significativa de similaridade com *S. soli* é bem significativa em relação às outras duas espécies (0,9% a 1,1%) e isto se reflete na árvore filogenética construída, já que B350/16 pertence ao mesmo ramo que *S. soli* e *S. contaminans*, e *S. koreensis* integram ramos distintos. Portanto, é bem provável que B350/16 pertença à espécie *S. soli*. De qualquer forma, B350/16 foi selecionada para as próximas etapas de sequenciamento, para confirmação da espécie (Figura 13).

Conforme descrito anteriormente, as linhagens B282/17 e B289/16 foram identificadas a partir da análise do gene 16S rRNA como *Brevibacterium frigoliterans* (99,8 a 99,9%)/*Peribacillus simplex* (99,7% a 99,8%)/*P. muralis* (99,6 a 99,7%)/*P. butanolivorans* (99,5 a 99,6%). Isto demonstra que, muitas vezes, a resolução da análise do gene 16S rRNA é incapaz de definir, inclusive, o gênero bacteriano. É possível, que *Brevibacterium frigoliterans* seja, futuramente, reclassificado como pertencente ao gênero *Peribacillus*, em função da maior proximidade filogenética com espécies de *Peribacillus* do que em relação a espécies de *Brevibacterium*, o que pode ser observado na árvore filogenética construída a

partir das sequências do gene 16S rRNA (Figura 14). Para confirmar esta hipótese, uma outra árvore filogenética foi construída, incluindo-se somente as dez espécies com maior similaridade com os referidos isolados e a linhagem tipo do gênero *Brevibacterium* (*B. linens*). Como pode ser observado na Figura 15, a linhagem *B. linens* está mais distante filogeneticamente de B282/17, B289/16 e *B. frigolitolerans* do que a espécie *P. amylolyticus*, inserida como grupo de fora. Este resultado faz sentido, já que o gênero *Brevibacterium* integra a família Brevibacteriaceae, cuja ordem é Micrococcales; enquanto as famílias Paenibacillaceae e Bacillaceae, referentes aos gêneros *Paenibacillus* e *Peribacillus*, respectivamente, integram a ordem Caryophanales. Portanto, é muito provável que as linhagens B289/16 e B282/17 pertençam ao gênero *Peribacillus*, assim como *B. frigolitolerans*. Na tentativa de obtenção de mais dados para a confirmação dessas hipóteses, uma das linhagens isoladas (B289/16) foi selecionada para a análise de outros genes *housekeeping* (Figura 14).

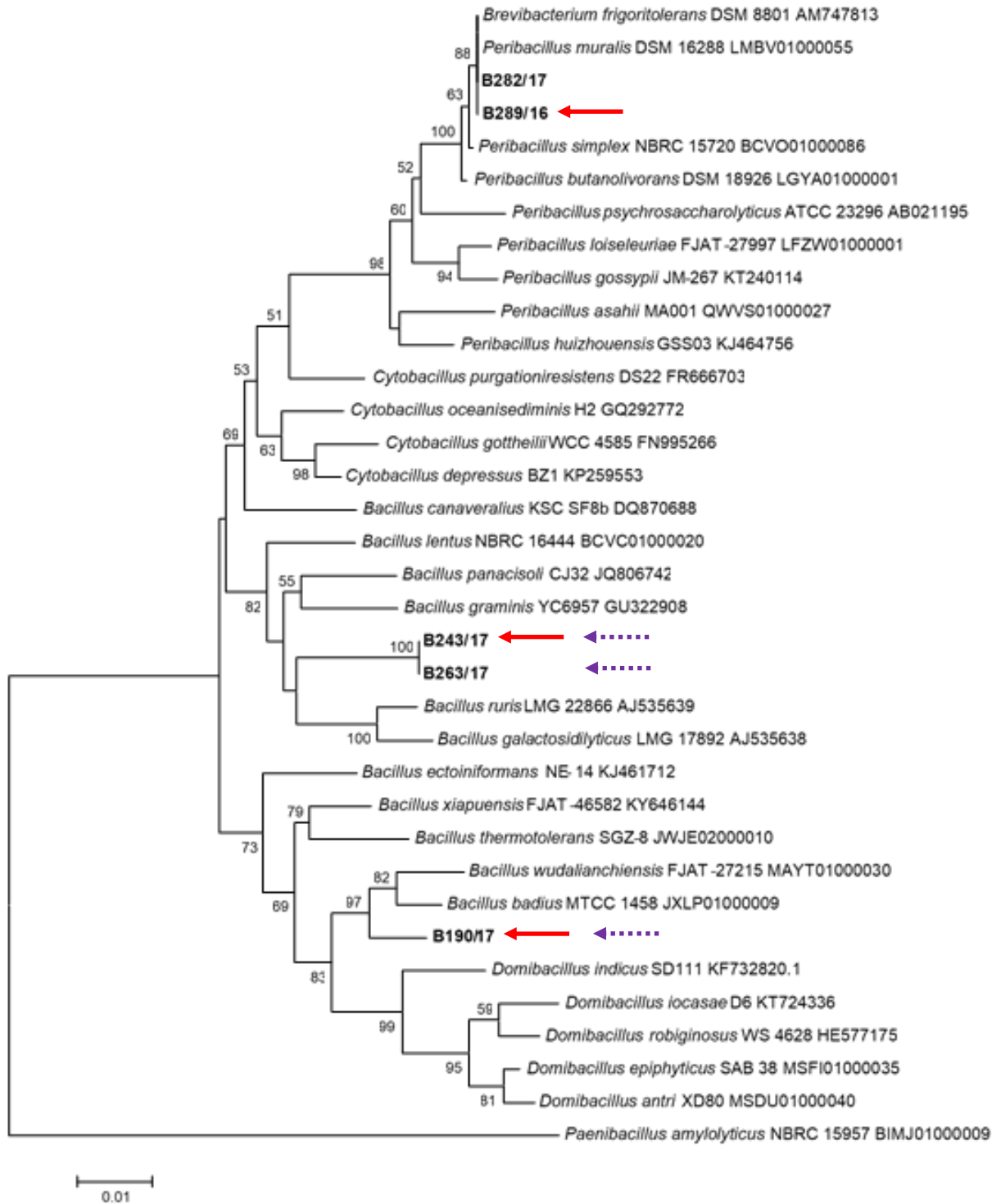
Figura 13 - Árvore filogenética da linhagem identificada como *Sporosarcina* (1.358 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta vermelha - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*.

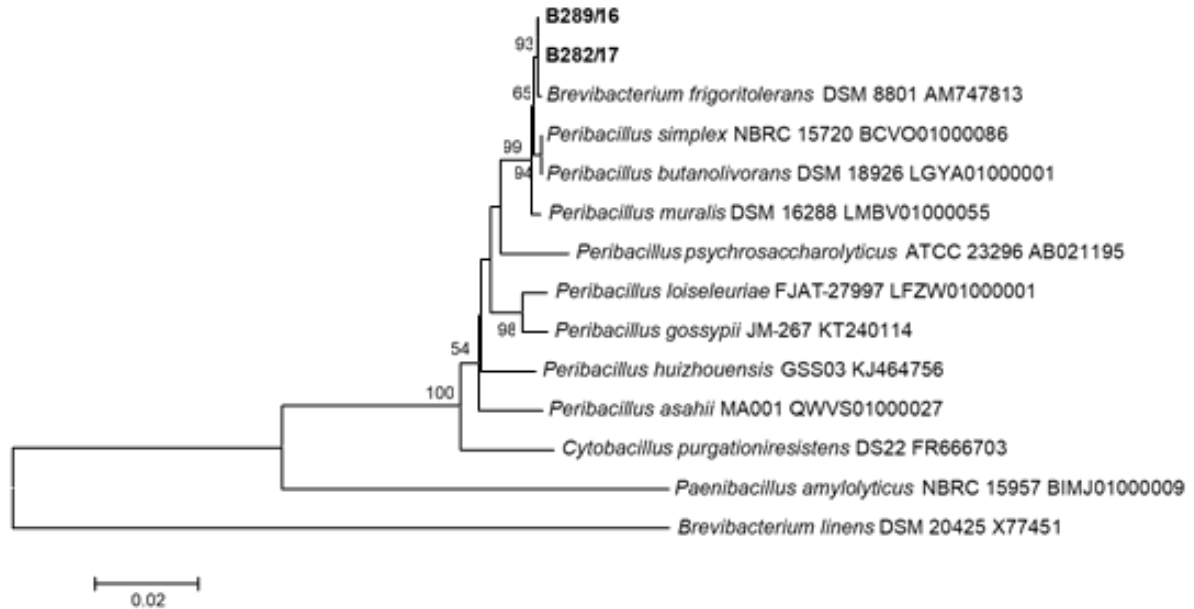
Figura 14 - Árvore filogenética das linhagens sem gênero definido (1.263 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta vermelha - linhagens selecionadas para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*; seta lilás tracejada - possíveis novas espécies.

Figura 15 - Árvore filogenética das linhagens B289/16 e B282/17 (1.371 pb) baseada nas sequências do gene 16S rRNA com a linhagem tipo de *Brevibacterium* e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

A partir da análise do gene 16S rRNA também não foi possível definir os gêneros das linhagens B243/17, B263/17 e B190/17. Além disso, todas as possíveis espécies apresentaram percentual de similaridade abaixo de 98,7%, em ambos os bancos de dados *EzBioCloud* e *GenBank*, indicando a possibilidade de novas espécies. Espécies de *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Mesobacillus*, *Neobacillus* e *Falsibacillus* apresentaram percentuais de similaridade > 95%, em relação às linhagens B243/17 e B263/17, porém espécies do gênero *Bacillus* apresentaram maior proximidade com estas linhagens, o que indica maior probabilidade de pertencerem ao gênero *Bacillus*. Uma destas linhagens (B243/17) foi selecionada para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*, na tentativa de maior resolução taxonômica (Figura 14). Espécies de *Bacillus*, *Domibacillus*, *Cytobacillus*, *Neobacillus* e *Falsibacillus* apresentaram percentuais de similaridade > 95%, em relação à linhagem B190/17. No entanto, espécies do gênero *Bacillus* apresentam maior proximidade com esta linhagem, conforme análise filogenética, com base no gene 16S rRNA. A linhagem B190/17 também foi selecionada para o sequenciamento de outros genes *housekeeping*, na tentativa de maior resolução taxonômica (Figura 14).

4.6 Análise filogenética dos genes *rpoB* e *gyrB*

Conforme já demonstrado, a análise comparativa do gene 16S rRNA tem sido bastante utilizada para a identificação e classificação bacteriana atualmente. Esta técnica tem sido particularmente importante na identificação de linhagens bacterianas com perfis fenotípicos incomuns, linhagens raras, de crescimento lento ou não-cultiváveis. No entanto, apresenta baixa resolução na diferenciação de alguns grupos bacterianos, como espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados, que compreendem algumas espécies tão estreitamente relacionadas, que são referenciadas como grupos taxonômicos (HUANG et al, 2016, SEUYLEMEZIAN et al., 2018, WOO et al., 2008). Isto pôde ser observado no presente trabalho com os grupos *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis* e para as espécies *B. megaterium*, *B. flexus* e *B. paraflexus*, por exemplo. Além disso, as bactérias podem apresentar várias cópias do gene 16S rRNA, em seu genoma, podendo variar de 1 a 19 cópias em alguns grupos, como entre espécies de *B. cereus*, o que pode gerar identificações diversas, dependendo da cópia amplificada, tornando a identificação ambígua e imprecisa (LIU et al., 2015a; SEUYLEMEZIAN et al., 2018; VOS et al., 2012). Em função das limitações apresentadas, vários autores sugerem que a análise de outros genes pode ser mais eficiente na diferenciação de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados.

Mohkam et al. (2016) demonstraram que os genes *rpoB* e *recA* propiciam discriminação quatro e duas vezes maior, respectivamente, de espécies de *Bacillus*, que o gene 16S rRNA. Branquinho et al. (2014) argumentaram que o sequenciamento de *rpoB* e *gyrB* provou ter sido útil na resolução taxonômica de espécies de *Bacillus*. Já Yoon et al. (2017) sugeriram que *gyrB* e *recA* apresentam maior resolução filogenética que o gene 16S rRNA, enquanto Woo et al. (2008) também sugeriram a análise de *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase, para auxiliar na identificação de espécies bacterianas. Do mesmo modo, Sting et al. (2019) demonstraram a utilidade da análise do gene *rpoB* na identificação de várias espécies bacterianas. No entanto, os autores argumentaram que não há iniciadores universais para sequenciamento desse gene, como há para 16S rRNA, sendo necessário o desenho de iniciadores para a amplificação e sequenciamento da região hipervariável, compreendida entre as posições 2.400 e 3.300 do gene, que possui cerca de 3.500 pb. Vos et al. (2012) argumentaram que a

análise do gene *rpoB* oferece algumas vantagens em relação ao gene 16S rRNA, como o fato de estar presente em cópia única no genoma bacteriano e apresentar menor taxa de conservação em relação ao primeiro. Além disso, muitas sequências de *rpoB* se encontram disponíveis em bases de dados públicas (KI et al., 2009), o que permite a comparação com as linhagens desejadas. Já La Duc et al. (2004) e Wei et al. (2018) sugeriram a amplificação e sequenciamento do gene *gyrB*, para a diferenciação de algumas espécies do grupo *B. cereus*. Os autores argumentaram que este gene é altamente conservado, porém apresenta taxa de evolução molecular mais rápida que o gene 16S rRNA; possui cerca de 2.000 pb e já há alguns pares de iniciadores descritos na literatura, que podem ser utilizados na diferenciação de algumas espécies. O gene *gyrB* codifica a subunidade B da proteína DNA girase, que é uma topoisomerase do tipo II essencialmente importante na mediação do superenrolamento negativo do cromossomo bacteriano, afetando assim, os processos de replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA bacteriano (WEI et al., 2018).

Diante do acima exposto, decidiu-se pela análise dos genes *rpoB* e *gyrB* na tentativa de maior resolução das espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados isoladas no presente trabalho. Os iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de *rpoB* e *gyrB* foram selecionados com base nos trabalhos de KI et al. (2009) e Yamamoto e Harayama (1998), respectivamente. Wang et al. (2007) também utilizaram o par de iniciadores (para *gyrB*) descrito por Yamamoto e Harayama (1998) para a identificação e análise taxonômica de membros do grupo *B. subtilis*.

Não há na literatura um percentual de corte sugerido para identificação de gênero e espécie com base nas análises dos genes *rpoB* e *gyrB* como existe em relação ao gene 16S rRNA (SEUYLEMEZIAN et al., 2018; WOO et al., 2008). Em função disso, no presente trabalho, esta análise foi feita caso a caso, considerando-se a análise filogenética destes três genes.

A Figura 16 representa a análise filogenética das linhagens do gênero *Bacillus*, com base no sequenciamento dos genes *rpoB* (Figura 16a) e *gyrB* (Figuras 16b a 16e). Foram feitas árvores filogenéticas por grupos de espécies, para análise do *gyrB*, pois do contrário, o tamanho das sequências ficaria muito curto, o que poderia resultar em perda de resolução.

Conforme a análise filogenética, com base no sequenciamento do gene 16S rRNA, a linhagem B1072/17 integrou o mesmo ramo do grupo *B. subtilis* apresentando maior similaridade em relação a *B. tequilensis* e *B. subtilis* subsp. *subtilis* (Figura 5). No entanto, a análise filogenética com base no sequenciamento dos genes *rpoB* e *gyrB* apresentou maior resolução que o gene 16S rRNA, demonstrando que a linhagem B1072/17 pode ser considerada como *B. subtilis* subsp. *subtilis* (Figura 16a e 16b), que foi recentemente reclassificada como *B. subtilis* (DUNLAP; BOWMAN; ZEIGLER, 2020).

As linhagens B046/17, B319/17 e B679/17 também foram identificadas como pertencentes ao grupo *B. subtilis*, com base na análise do gene 16S rRNA. No entanto, a análise filogenética deste gene revelou uma maior probabilidade de B046/17 pertencer à espécie *B. licheniformis* e de B319/17 pertencer à espécie *B. paralicheniformis*. Já a linhagem B679/17 se apresentou como possível nova espécie (Figura 5). O resultado obtido se confirmou com a análise filogenética do gene *rpoB*, para as linhagens B046/17 e B319/17 (Figura 16a). A linhagem B679/17 foi disposta em um ramo único, distinto de B319/17 (Figura 16a), embora a distância evolutiva entre elas seja menor, considerando-se a análise do gene *rpoB*, do que em relação ao gene 16S rRNA (Figura 5). Outros testes devem ser realizados, posteriormente, para melhor caracterização dessa linhagem e confirmação ou não da hipótese de nova espécie. A árvore filogenética baseada em *gyrB* demonstrou maior proximidade de B319/17 em relação a *B. licheniformis* (Figura 16c), o que diverge dos resultados obtidos para *rpoB* (Figura 16a) e 16S rRNA (Figura 5). Com base nestes resultados, a linhagem B319/17 foi definida como *B. licheniformis*/*B. paralicheniformis*, para fins de inserção na BD do programa Saramis. Não foi possível a amplificação do gene *gyrB* da linhagem B046/17 e a sequência deste gene obtida para a linhagem B679/17 ficou curta e de baixa qualidade, por isso não foi incluída na árvore filogenética apresentada.

A análise do gene *rpoB* confirmou a identificação da linhagem B585/17 como *B. pumilus* (Figura 16a) com maior resolução do que a análise do gene 16S rRNA (Figura 5). A sequência do gene *gyrB* desta linhagem ficou curta e de baixa qualidade, por isso não foi incluída na árvore filogenética apresentada.

As análises dos genes *rpoB* (Figura 16a) e *gyrB* (Figura 16b) se mostraram mais eficazes na discriminação das espécies do grupo *B. pumilus*, inclusive na separação das subespécies de *B. safensis*, do que a análise do gene 16S rRNA

(Figura 5). A linhagem B194/17, que havia sido identificada como pertencente ao grupo *B. pumilus* pode ser considerada como *B. safensis* subsp. *osmophilus*, com base na análise de *rpoB* (Figura 16a). A análise de *gyrB* permitiu a identificação da linhagem como *B. safensis*, porém não foi possível a discriminação da subespécie (Figura 16d).

Conforme descrito anteriormente, *B. aryabhatai* e *B. megaterium* são a mesma espécie. A análise do gene *rpoB* confirmou a distância evolutiva desta espécie em relação a *B. flexus*, embora pertençam a um grupo de espécies estreitamente relacionadas, considerando-se a sequência do gene 16S rRNA. A linhagem B705/17 foi, então, confirmada como *B. flexus*, com base na análise do gene *rpoB* (Figura 16a). Não foram encontrados depósitos de sequências dos genes *rpoB* e *gyrB* de *B. paraflexus* no *GenBank*, por isso esta espécie não foi incluída nas árvores filogenéticas da Figura 16. Tanto a árvore filogenética do gene 16S rRNA (Figura 5), quanto do gene *rpoB* (Figura 16a) confirmaram a identificação da linhagem B176/17 como *B. megaterium*. Não foi possível a amplificação do gene *gyrB* das linhagens B176/17 e B705/17.

Figura 16 - Árvore filogenética com base nos genes *rpoB* (a) e *gyrB* (b, c, d, e) das linhagens identificadas como *Bacillus* (994 pb/1.015 pb/848 pb/900 pb/787 pb) e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)

(continua)

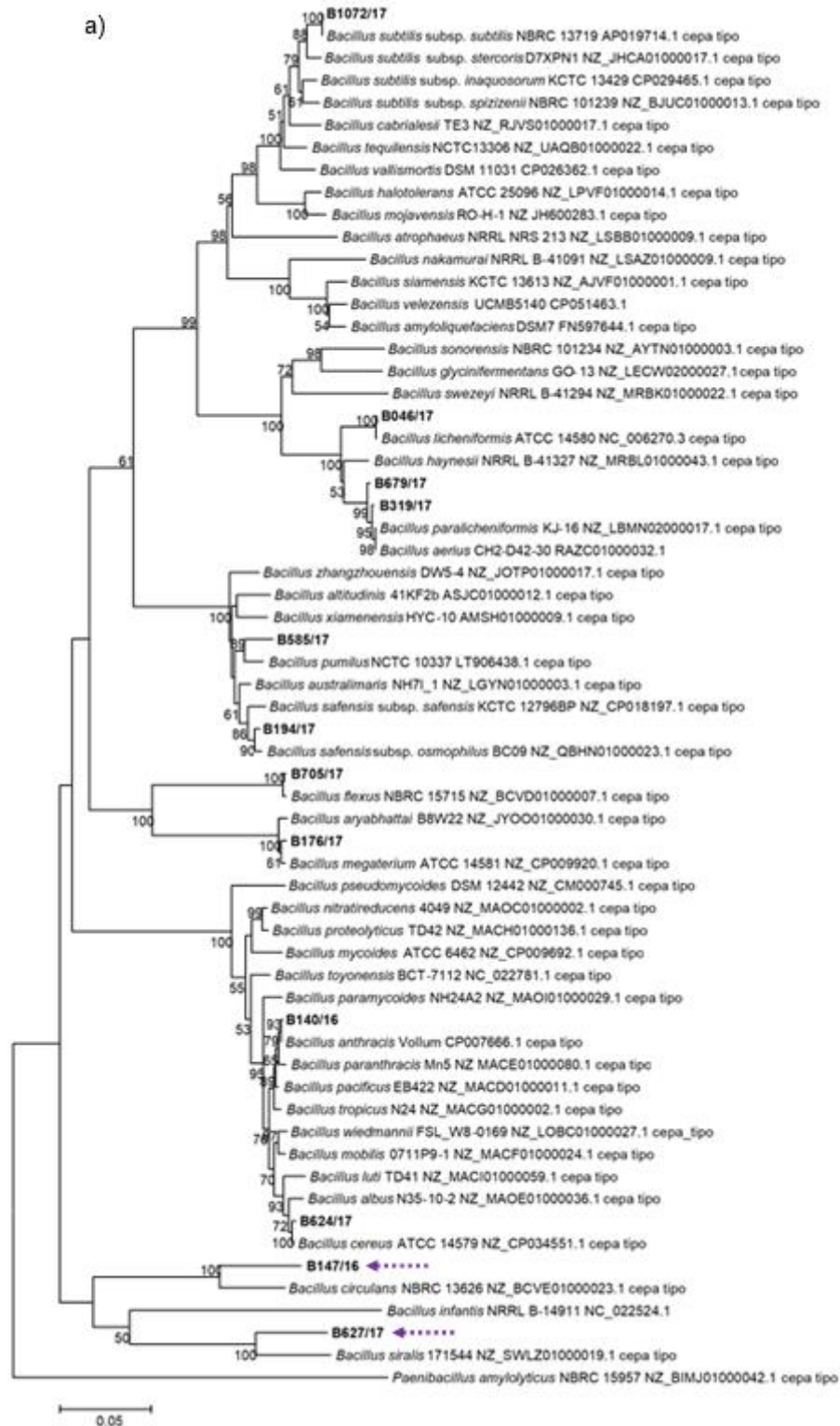
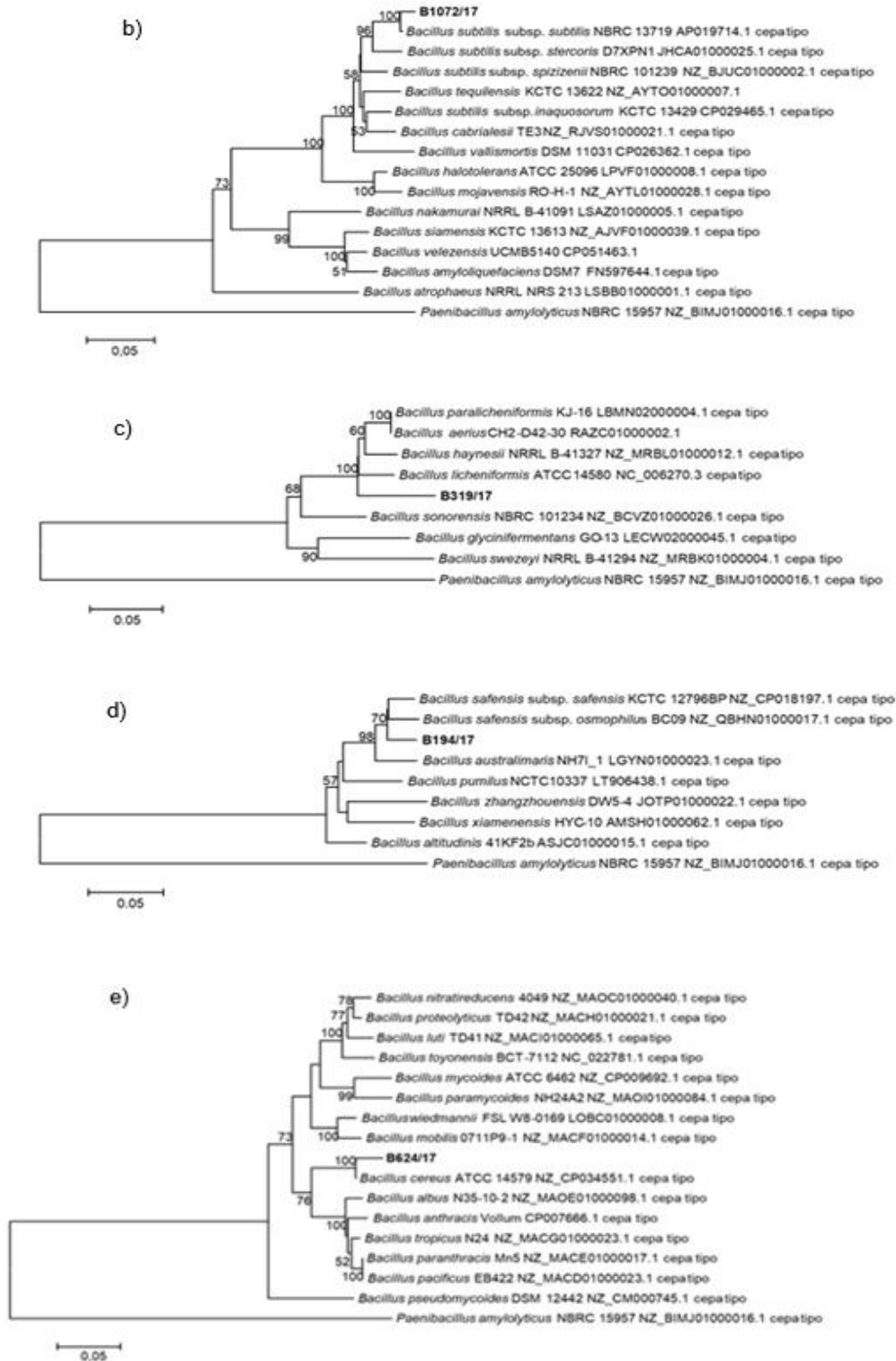


Figura 16 - Árvore filogenética com base nos genes *rpoB* (a) e *gyrB* (b, c, d, e) das linhagens identificadas como *Bacillus* (994 pb/1.015 pb/848 pb/900 pb/787 pb) e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)

(conclusão)



Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta lilás tracejada – possíveis novas espécies.

As linhagens B140/16 e B624/17 foram identificadas como pertencentes ao grupo *B. cereus* com base na análise do gene 16S rRNA, conforme demonstrado anteriormente. Na árvore filogenética construída (Figura 5), pode-se observar a impossibilidade de distinção entre várias espécies desse grupo. A análise filogenética a partir do sequenciamento dos genes *rpoB* (Figura 16a) e *gyrB* (Figura 16e) permitiu uma resolução significativamente melhor entre espécies do grupo *B. cereus*. A linhagem B140/16 apresentou maior proximidade evolutiva com *B. anthracis* e *B. paranthracis* (Figura 16a), enquanto B624/17 demonstrou maior semelhança com *B. cereus* (Figura 16a e 16e). A sequência do gene *gyrB* de B140/16 ficou curta e de baixa qualidade, por isso não foi incluída na árvore filogenética apresentada. Não foram encontrados depósitos de sequências de *B. fungorum* (pertencente ao grupo *B. cereus*) no *GenBank*, por isso esta espécie não foi incluída nas árvores filogenéticas da Figura 16. Portanto, com base nas análises filogenéticas dos genes 16S rRNA, *rpoB* e *gyrB*, a linhagem B140/16 foi definida como *B. anthracis/B. paranthracis* e B624/17 como *B. cereus*.

A análise filogenética baseada nas sequências do gene *rpoB* das linhagens de *Bacillus* demonstrou que B147/16 pertence ao mesmo ramo que *B. circulans* e que B627/17 pertence ao mesmo ramo que *B. soralis*. No entanto, tanto em um caso como em outro, há uma certa distância evolutiva entre as linhagens isoladas neste trabalho e as linhagens tipo mais próximas, o que evidencia a hipótese de novas espécies. Quanto a B147/16, esta hipótese não ficou tão evidente na análise do gene 16S rRNA (Figura 5); porém a análise do gene *rpoB* corroborou esta hipótese quanto à linhagem B627/17 (Figura 16a). Não foi possível a amplificação do gene *gyrB* de B627/17 com o par de primer utilizados. Quanto a B147/16, obteve-se uma sequência curta e de baixa qualidade, a partir da amplificação de *gyrB*, por isso a linhagem não foi incluída nas árvores filogenéticas da Figura 16. Outros estudos deverão ser realizados para a melhor caracterização dessas linhagens. Para fins de inserção na BD do programa Saramis, as linhagens B147/16 e B627/17 serão inseridas como *Bacillus* spp.

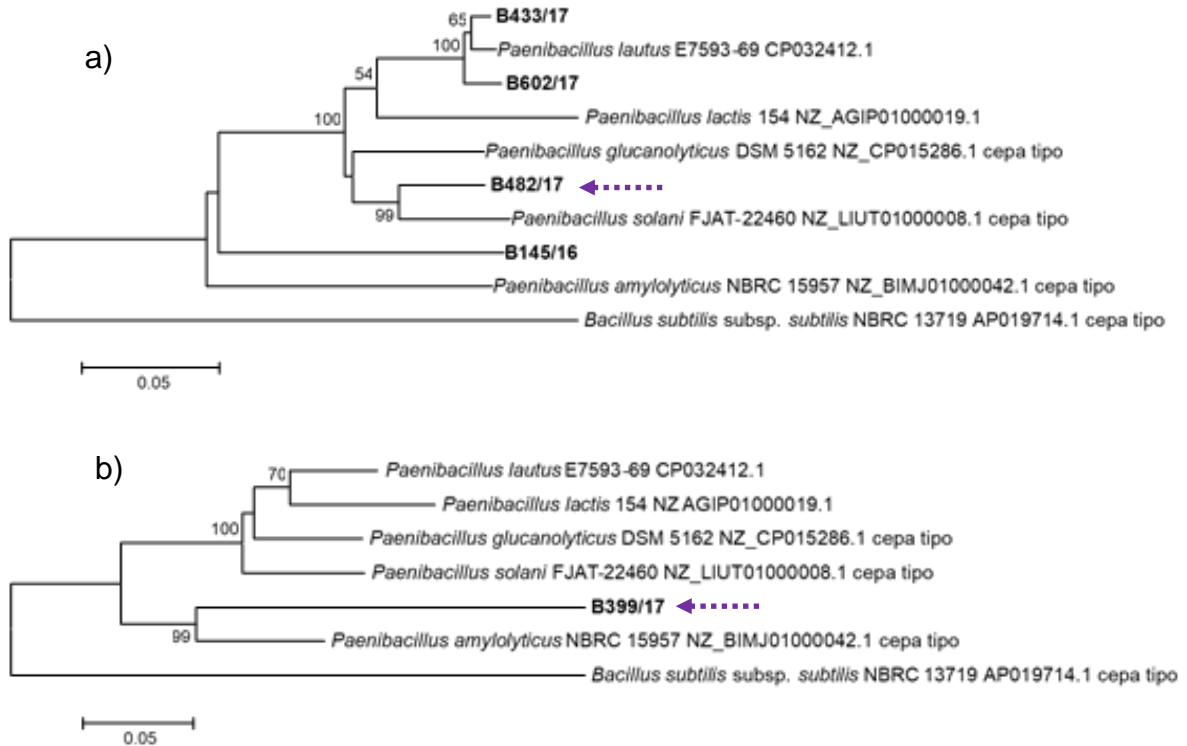
Não foi possível a amplificação do gene *rpoB* das linhagens B043/17, B387/17, B763/17, B864/17 e B915/17, logo a definição de espécies/grupos desses isolados foi realizada somente a partir da análise do gene 16S rRNA.

Pode-se observar que a análise filogenética das linhagens de *Bacillus* com base nos genes *rpoB* e *gyrB* apresentou resolução significativamente melhor na

diferenciação de espécies, geneticamente muito próximas, integrantes de grupos como *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. megaterium* e *B. flexus*.

Como pode ser observado na Figura 17a, a partir da análise filogenética do gene *rpoB*, as linhagens B433/17 e B602/17 podem ser consideradas como pertencentes à espécie *P. lautus*, corroborando o resultado obtido a partir da análise do gene 16S rRNA (Figura 6). Pode-se observar uma maior distância evolutiva da linhagem B482/17 em relação a *P. solani*, na análise do gene *rpoB* (Figura 17a) do que na análise do gene 16S rRNA (Figura 6) o que corrobora a hipótese de possível nova espécie. Não foram encontradas sequências de *rpoB* de *P. zeae* no *GenBank*, por isso esta linhagem não foi incluída na árvore filogenética (Figura 17a). Da mesma forma, não foram encontradas sequências de *rpoB* de *P. urinalis* e *P. provencensis* no *GenBank*, por isso, não houve como compará-las com a linhagem B145/16 (Figura 17a), que apresentou similaridade de 99,7% e 98,8% em relação a estas espécies, respectivamente, conforme análise do gene 16S rRNA. Em função disso, esta linhagem foi considerada como *P. urinalis*, considerando-se somente a análise filogenética do gene 16S rRNA (Figura 6). A linhagem B399/17 foi demonstrada em uma árvore filogenética distinta (Figura 17b), pois o tamanho da sequência de *rpoB* amplificada desta linhagem foi bem menor (845 pb) em relação às outras linhagens (>1.100 pb). Para que não houvesse perda muito significativa nas sequências das outras linhagens, optou-se por analisá-la separadamente (Figura 17b). A árvore filogenética demonstra uma distância significativa de B399/17 em relação a *P. amylolyticus*, espécie mais próxima, conforme a análise filogenética do gene 16S rRNA (Figura 6), o que evidencia a possibilidade de B399/17 representar uma nova espécie (Figura 17b).

Figura 17 - Árvore filogenética com base no gene *rpoB* das linhagens identificadas como *Paenibacillus* (1.017 pb/794 pb) e a linhagem *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: Seta lilás tracejada – possíveis novas espécies.

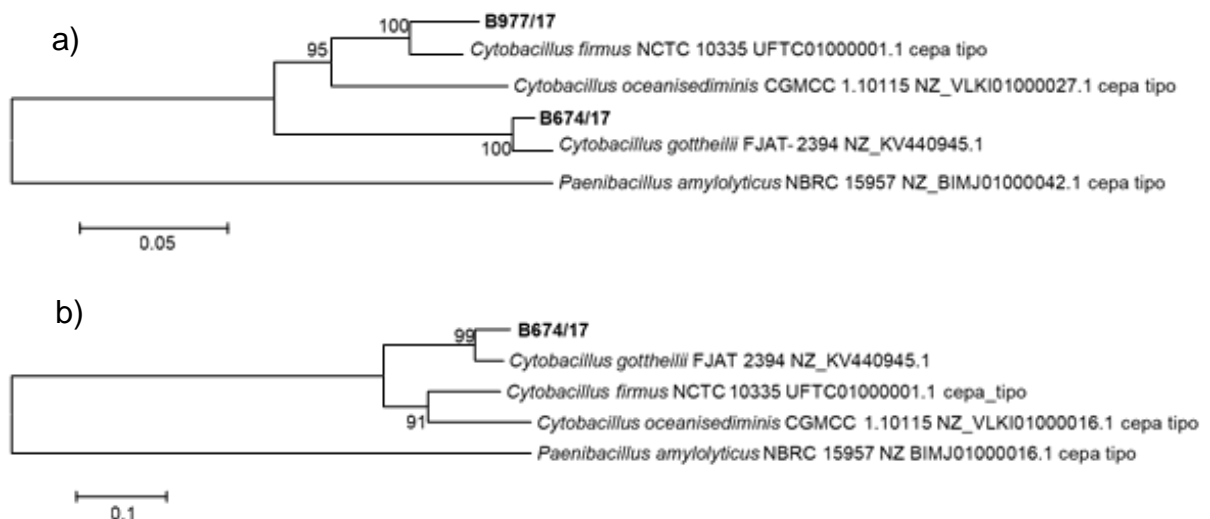
O gene *rpoB* das linhagens B408/17, B174/17, B035/17, B254/17, foi amplificado, porém as sequências obtidas ficaram muito curtas e a qualidade do sequenciamento foi baixa. Em virtude disso, essas sequências não foram incluídas na árvore filogenética construída (Figura 17).

Não foi possível a amplificação do gene *gyrB* de B035/17, B174/17, B254/17, B399/17, B408/17, B433/17, B482/17 e B602/17. Foi possível a amplificação de apenas 585 pb de B145/16. No entanto, como não havia depósito de sequências de *gyrB* no *GenBank* de *P. urinalis* e de *P. provencensis*, não havia como comparar esta linhagem, logo não foi feita a árvore filogenética de *gyrB* para as linhagens do gênero *Paenibacillus*. A definição de espécies das linhagens B035/17, B174/17 e B254/17 foi realizada, portanto, somente com base na análise filogenética do gene 16S rRNA (Figura 6).

As linhagens B977/17 e B674/17 foram identificadas como *Cytobacillus firmus* e *Cytobacillus gotheilii*, respectivamente, a partir da análise filogenética do gene 16S

rRNA (Figura 7). A análise filogenética baseada no gene *rpoB* (Figura 18a) confirmou esse resultado para ambas as linhagens. Já a análise filogenética do gene *gyrB* (Figura 18b) demonstrou o mesmo resultado para a linhagem B674/17. Não foi possível a amplificação do gene *rpoB* da linhagem B235/16 e do gene *gyrB* das linhagens B235/16 e B977/17, com os iniciadores utilizados. Portanto, a linhagem B235/16 foi definida como *C. oceanisediminis*/*C. firmus*, já que não foi possível a distinção das espécies, somente conforme a análise do gene 16S rRNA (Figura 7).

Figura 18 - Árvore filogenética com base no gene *rpoB* (a) e *gyrB* (b) das linhagens identificadas como *Cytobacillus* (1.205 pb/986 pb) e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



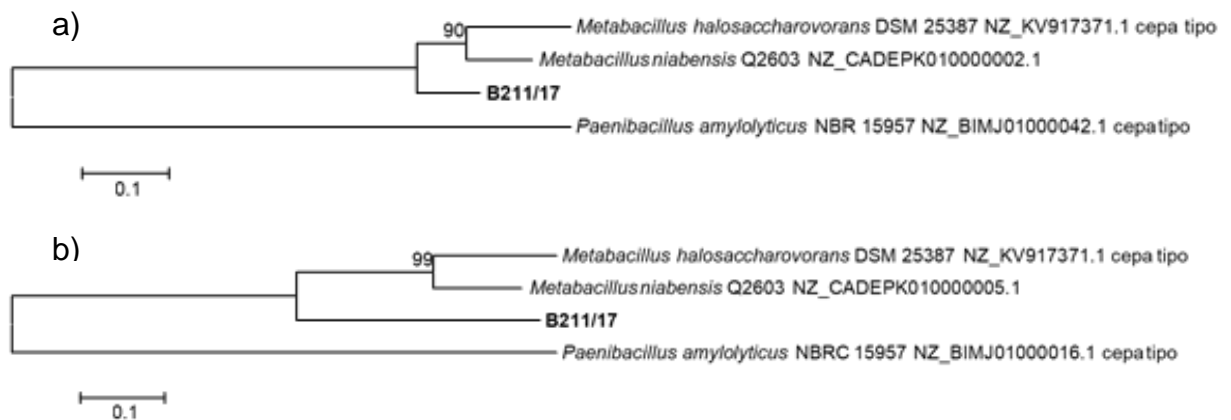
Fonte: (A autora, 2020).

As sequências de *rpoB* e *gyrB* obtidas para as linhagens B083/16, B199/16 e B533/16 ficaram muito curtas e de baixa qualidade, por isso essas árvores filogenéticas não foram construídas para o gênero *Lysinibacillus*. A conclusão quanto a espécie destas linhagens se baseou somente nos resultados obtidos a partir da análise filogenética do gene 16S rRNA (Figura 8).

A linhagem B211/17 apresentou maior similaridade em relação a *M. halosaccharovorans* (99,7%) do que em relação a *M. niabensis* (99,3%), considerando-se a análise do gene 16S rRNA, o que refletiu na árvore filogenética contruída (Figura 9). A análise filogenética dos genes *rpoB* (Figura 19a) e *gyrB* (Figura 19b) demonstrou um maior distanciamento evolutivo de B211/17 em relação às duas espécies citadas, não sendo possível a confirmação da espécie. Isto se

tornou ainda mais evidente na árvore filogenética de *gyrB* (Figura 19b), o que pode ter ocorrido em função do menor tamanho de sequência analisado (769 pb). Diante desses fatos, a linhagem B211/17 foi considerada como *M. halosaccharovorans*/*M. niabensis* para fins de inserção na BD do programa Saramis.

Figura 19 - Árvore filogenética com base nos genes *rpoB* (a) e *gyrB* (b) da linhagem identificada como *Metabacillus* (1.179 pb/769 pb) e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)

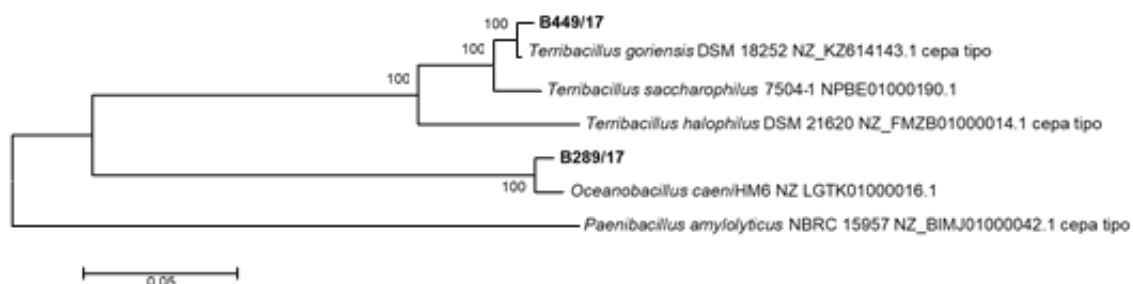


Fonte: (A autora, 2020).

Não foi possível a amplificação dos genes *rpoB* e *gyrB* da linhagem B583/16 (*Neobacillus*). Conforme análise do gene 16S rRNA, B583/16 apresentou 99,8% de similaridade em relação a *N. niacini* e 99,1% em comparação a *N. drentensis*. Esta diferença se refletiu na árvore filogenética construída, que demonstrou B583/16 no mesmo ramo que *N. niacini* e *N. drentensis* integrando um ramo diferente (Figura 10). Com base neste resultado, B583/16 foi considerada como *N. niacini* para fins de inserção na BD do programa Saramis.

A linhagem B449/17 apresentou maior similaridade com *T. saccharophilus* (100%) e *T. goriensis* (100%), a partir da análise do gene 16S rRNA, do que em relação a *T. halophilus* (99,1%). Já a partir da análise do gene *rpoB*, houve maior similaridade com *T. goriensis* (98,8%) do que com *T. saccharophilus* (97,0%), o que pode ser observado na árvore filogenética construída (Figura 20). Portanto, a linhagem B449/17 foi considerada como *T. goriensis*, não sendo necessária a análise do gene *gyrB*.

Figura 20 - Árvore filogenética com base no gene *rpoB* das linhagens identificadas como *Oceanobacillus* e *Terribacillus* (1.155 pb) e a linhagem *Paenibacillus amylolyticus* como grupo de fora (*Neighbour-Joining*)



Fonte: (A autora, 2020).

Já a linhagem B289/17 foi identificada como *Oceanobacillus caeni* tanto a partir da análise do gene 16S rRNA como do gene *rpoB* (Figura 20), não sendo considerado necessário o sequenciamento do gene *gyrB* para definição da espécie.

A partir da análise do gene 16S rRNA, a linhagem B350/16 apresentou 99,9% de similaridade em relação a *S. soli*, 99,0% em comparação a *S. contaminans* e 98,8% em relação a *S. koreensis*. Essa diferença significativa de percentual em comparação a *S. soli* e *S. contaminans* (0,9%) se refletiu na árvore filogenética do gene 16S rRNA (Figura 13), que demonstrou que B350/16 está contida no mesmo ramo que *S. soli* e que *S. contaminans* e *S. koreensis* integram ramos distintos. Não foi possível a amplificação do gene *rpoB* de B350/16 com os iniciadores utilizados. Além disso, não há depósito de sequências referentes aos genes *rpoB* e *gyrB* de *S. soli* e *S. contaminans* no *GenBank*, por isso, não foi realizada a amplificação de *gyrB* de B350/16, já que não seria possível a comparação. Em função dos fatos apresentados a linhagem B350/16 foi definida como *S. soli*, com base nos resultados da análise do gene 16S rRNA.

Como não foi possível a amplificação dos genes *rpoB* e *gyrB* de B289/16, B190/17 e de B243/17 com os iniciadores selecionados no presente trabalho, somente a análise do gene 16S rRNA foi considerada para fins de definição de gênero (Figura 14). Não foi possível a definição do gênero de B289/16, já que a linhagem integrou o mesmo ramo que espécies de gêneros diferentes (*Brevibacterium frigoritolerans*, *Peribacillus muralis* e *P. simplex*). As linhagens B243/17 e B190/17 parecem ser novas espécies. No entanto, a árvore filogenética do gene 16S rRNA demonstra que B243/17 pertence ao gênero *Bacillus*, já que

espécies de outros gêneros estão bem mais distantes evolutivamente. Quanto à linhagem B190/17, a árvore filogenética de 16S rRNA demonstra uma certa distância evolutiva entre as espécies de *Domibacillus* e os ramos compostos por B190/17 e *B. baudius* e *B. wudalianchiensis*. No entanto, optou-se pela realização de ensaios posteriores de caracterização, para que se tenha maior segurança em relação ao gênero desta linhagem. Em função dos fatos supracitados, apenas a linhagem B243/17 foi inserida na BD do programa Saramis, como *Bacillus* spp. As linhagens B289/16 e B190/17 não serão inseridas na referida BD, até que sejam melhor caracterizadas.

Conforme demonstrado acima, não foi possível a amplificação das sequências de *rpoB* e *gyrB* de várias das linhagens isoladas no presente trabalho. Os iniciadores utilizados na amplificação de *rpoB* foram desenhados por Ki et al. (2009) a partir do alinhamento e comparação de sequências de *rpoB* de bactérias do filo Firmicutes, que contempla a ordem Caryophanales e a classe Bacilli, onde estão incluídas as famílias das linhagens encontradas no presente trabalho (Bacillaceae, Caryophanaceae e Paenibacillaceae). O autor não descreveu quais sequências foram utilizadas para o desenho dos iniciadores. De qualquer modo, dentre as 40 linhagens selecionadas no presente trabalho, foi possível a amplificação e sequenciamento de *rpoB* de 55% delas (Tabela 11). Mesmo os iniciadores tendo sido desenhados para amplificação das bactérias do filo Firmicutes, os mesmos não foram adequados para a amplificação de *rpoB* de todas as linhagens avaliadas. Já os iniciadores degenerados utilizados na amplificação de *gyrB* foram desenhados por Yamamoto e Harayama (1998) a partir de sequências de bactérias Gram-positivas, como *B. subtilis* e Gram-negativas, como *E. coli*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. alkanolytica* e *P. fluorescens*, a fim de se obter iniciadores universais para amplificação e sequenciamento de *gyrB*. Posteriormente, Wang et al. (2007) utilizaram esses iniciadores com sucesso na amplificação e sequenciamento de 32 linhagens do grupo *B. subtilis*. No entanto, no presente trabalho, foi possível a amplificação e sequenciamento de somente 15% das linhagens de *Bacillus* e gêneros relacionados selecionadas (Tabela 11). Por outro lado, conforme demonstrado anteriormente, foi possível o sequenciamento do gene 16S rRNA das 97 linhagens isoladas no presente trabalho, utilizando-se o *kit* MicroSEQ® Full Gene 16S rDNA (Thermo Fisher Scientific, EUA), que contempla iniciadores universais e cuja metodologia proposta já foi validada pelo fabricante. Portanto, apresenta-se

como uma alternativa eficaz e relativamente rápida, já que pode ser executada em 48 h, para a análise do gene 16S rRNA em laboratórios de microbiologia na Indústria Farmacêutica. Além disso, pode-se observar o quanto a disponibilidade de iniciadores universais e metodologias previamente validadas otimiza o sequenciamento de genes bacterianos. A ausência desses fatores para a amplificação dos genes *rpoB* e *gyrB* dificultou a realização desta etapa do trabalho. Além disso, os iniciadores utilizados foram encomendados no início do desenvolvimento do trabalho, para garantir que fossem recebidos em tempo hábil. Naquele momento, não se sabia ainda quais espécies seriam encontradas, impossibilitando o desenho de iniciadores mais específicos. Ademais, conforme demonstrado anteriormente, *Bacillus* e gêneros relacionados contemplam uma ampla diversidade de linhagens, o que justifica a reclassificação de muitas delas em novos gêneros, nos últimos anos. Este fato dificulta o desenho de iniciadores capazes de amplificar todas as linhagens avaliadas. Iniciadores mais adequados serão desenhados, posteriormente, para que se possa concluir a amplificação e sequenciamento de *rpoB* e *gyrB* das linhagens encontradas no presente trabalho.

Tabela 11 - Quantitativo de linhagens selecionadas para sequenciamento de *rpoB* e *gyrB*

Gênero	Nº de linhagens selecionadas	Nº de linhagens sequenciadas (<i>rpoB</i>)	Percentual (%)	Nº de linhagens sequenciadas (<i>gyrB</i>)	Percentual (%)
<i>Bacillus</i>	17	12	70,6	4	23,5
<i>Cytobacillus</i>	3	2	66,7	1	33,3
<i>Lysinibacillus</i>	3	0	0,0	0	0,0
<i>Metabacillus</i>	1	1	100,0	1	100,0
<i>Neobacillus</i>	1	0	0,0	0	0,0
<i>Oceanobacillus</i>	1	1	100,0	Não realizado	
<i>Paenibacillus</i>	9	5	55,6	0	0,0
<i>Sporosarcina</i>	1	0	0,0	Não realizado	
<i>Terribacillus</i>	1	1	100,0	Não realizado	
Indefinido	3	0	0,0	0	0,0
Total	40	22	55,0	6	15,0

Fonte: (A autora, 2020).

Os resultados obtidos também demonstraram que somente a análise genética, com base no sequenciamento de genes *housekeeping*, em muitos casos, não é suficiente para que sejam definidas espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados. A técnica conhecida por MLSA tem se apresentado como uma alternativa promissora para a discriminação de espécies de *Bacillus* (CARTER et al., 2018, MOHKAM et al., 2016). No entanto, a ausência de sequências tipo de outros genes *housekeeping* nos bancos de dados dificulta a identificação de muitas linhagens, em função da ausência de parâmetros para comparação. Liu et al. (2015a) sugeriram a análise do genoma completo para a diferenciação de espécies estritamente relacionadas, como o grupo de *B. cereus*, por exemplo. Outros autores demonstraram a necessidade de uma identificação polifásica, incluindo análises genéticas e fenotípicas, de modo a se obter informações mais precisas, não somente na discriminação de espécies conhecidas, como na caracterização de novas espécies (STAROSTIN et al., 2015; WOO et al., 2008).

4.7 Inserção dos SuperSpectra referentes às linhagens isoladas em Bio-Manguinhos na BD do programa Saramis

A partir da análise filogenética das linhagens isoladas em Bio-Manguinhos, com base nos genes 16S rRNA, *rpoB* e *gyrB*, o Quadro 4 foi elaborado para orientar a inserção dessas linhagens na BD do programa Saramis.

Conforme previamente mencionado, cada linhagem selecionada foi semeada em dois meios de cultura (TSA e ASC) e submetida a três períodos de incubação distintos (24, 48 e 72 h), de modo a simular as condições de incubação utilizadas na rotina de análise do laboratório, a fim de que os SS inseridos pudessem contemplar o máximo de variações possíveis relacionadas à expressão proteica das linhagens. Como cada amostra foi aplicada em oito replicatas, dentre os 48 espectros de referência gerados, entre 18 e 24 eram selecionados para a construção do SS, conforme mencionado anteriormente. Um SS é um espectro de referência teórico criado a partir de um determinado número de replicatas e deve conter picos com frequência acima de 70% entre as replicatas, de modo a garantir que aqueles picos sejam representativos daquela espécie (BIOMERIEUX, 2012). Após seleção destes picos, o SS obtido é comparado com toda a BD do programa Saramis, que calcula o número de picos equivalentes em relação às linhagens presentes na BD. Se esse número for muito elevado, significa que o SS a ser inserido, referente à linhagem analisada, é muito semelhante a uma outra espécie presente na BD, o que pode gerar identificações errôneas. Nestes casos, muitas vezes, é necessária a criação de SS combinados, ou seja, considerando grupo de espécies muito semelhantes, que não puderam ser discriminadas a partir desta metodologia.

O manual do fabricante estabelece três condições essenciais para a criação de um SS: a soma dos pesos dos picos não deve exceder 1.400 pontos; a soma dos pesos dos picos equivalentes de espécies não alvo não deve exceder 600 pontos; e o peso atribuído aos picos deve compreender entre 30 e 40 pontos, aproximadamente. Supõem-se, por exemplo, que após a seleção dos picos mais frequentes do suposto SS (>70%), foram obtidos 44 picos e que após a comparação destes picos com a BD, a primeira linhagem não alvo encontrada apresentou 25 picos equivalentes ao SS recém construído. Ao se dividir 1.400 (nº máximo de pontos) por 44 (nº de picos obtidos), foi obtido o valor de 31, que significa o peso

inicial a ser atribuído a cada um dos 44 picos selecionados. No entanto, ao se multiplicar 31 por 25 (picos equivalentes da linhagem não-alvo), foi obtido o valor de 775 (>600). Isto significa que o SS recém-criado não atende às condições essenciais estabelecidas, que garantem que não haja correspondências significativas com espectros de espécies diferentes da espécie alvo, fornecendo assim resultados de identificação altamente confiáveis.

Conforme demonstrado no Quadro 4, as linhagens de *Bacillus* B140/16 (*B. anthracis*/*B. paranthracis*), B194/17 (*B. safensis*), B585/17 (*B. pumilus*), B624/17 (*B. cereus*) e as linhagens B083/16 e B533/16 (*L. fusiformis*) não foram inseridas na BD do programa Saramis exatamente como foram identificadas, em função dos SS obtidos terem apresentado semelhança muito significativa em relação a espécies muito próximas. Como na análise por MALDI-TOF MS são obtidos perfis de proteínas, em sua maior parte ribossomais (RYZHOV; FENSELAU, 2001), este resultado é esperado, já que estas linhagens possuem o gene 16S rRNA, que codifica a subunidade 16S do ribossoma bacteriano, praticamente idêntico ao de outras espécies, conforme demonstrado anteriormente. Rahi, Prakash e Shouche (2016) sugeriram que ambas as metodologias fornecem resultados semelhantes. No entanto, outras proteínas abundantes na célula também são obtidas (JANG; KIM, 2018). As referidas linhagens foram semeadas em meios de cultura não seletivos, os quais não induzem expressões fenotípicas diferenciadas, que poderiam gerar perfis proteômicos significativamente distintos, possivelmente capazes de distinguir as linhagens identificadas de outras espécies estreitamente relacionadas. Sendo assim, os SS referentes a estas linhagens foram inseridos como grupo de espécies (Quadro 4).

Quadro 4 – Definição de espécies para inserção na base de dados do programa Saramis e o nome do SuperSpectrum inserido (continua)

Linhagem	Nome da espécie/grupo	SS inserido
B140/16	<i>Bacillus anthracis/paranthracis</i>	Grupo <i>B. cereus</i> (picos muito semelhantes a outras espécies do grupo).
B147/16	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
B043/17	Grupo <i>Bacillus cereus</i>	Grupo <i>Bacillus cereus</i>
B046/17	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
B176/17	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
B194/17	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i>	Grupo <i>B. pumilus</i> (picos muito semelhantes a outras espécies do grupo).
B319/17	<i>Bacillus licheniformis/paralicheniformis</i>	<i>Bacillus</i> spp. (picos muito semelhantes a outras espécies do gênero).
B387/17	Grupo <i>Bacillus pumilus</i>	Grupo <i>B. pumilus</i>
B585/17	<i>Bacillus pumilus</i>	Grupo <i>B. pumilus</i>
B624/17	<i>Bacillus cereus</i>	Grupo <i>B. cereus</i>
B627/17	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
B679/17	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
B705/17	<i>Bacillus flexus</i>	<i>B. flexus</i>
B763/17	<i>Bacillus infantis</i>	<i>B. infantis</i>
B864/17	<i>Bacillus infantis</i>	<i>B. infantis</i>
B915/17	<i>Bacillus circulans</i>	<i>B. circulans</i>
B1072/17	<i>Bacillus subtilis</i>	Não foi possível a criação do SS (picos muito semelhantes aos de <i>B. amyloliquefaciens</i>). Identificada como <i>B. subtilis</i> .
B145/16	<i>Paenibacillus urinalis</i>	<i>Paenibacillus urinalis</i>
B035/17	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	Não foi possível a criação de SS para <i>P. glucanolyticus</i> (picos muito semelhantes aos de <i>P. lautus</i>), nem de SS para <i>P. glucanolyticus/lautus</i> (picos muito semelhantes aos de <i>P. macerans</i>). Identificada como <i>Paenibacillus</i> spp.

Quadro 4 – Definição de espécies para inserção na base de dados do programa Saramis e o nome do SuperSpectrum inserido (conclusão)

Linhagem	Nome da espécie/grupo	SS Inserido
B174/17	<i>Paenibacillus lautus</i>	Não foi possível a criação de SS para <i>P. lautus</i> (picos muito semelhantes aos de <i>P. glucanolyticus</i>), nem de SS para <i>P. glucanolyticus/lautus</i> (picos muito semelhantes aos de <i>P. macerans</i>). Identificada como <i>Paenibacillus</i> spp.
B254/17	<i>Paenibacillus lactis</i>	<i>Paenibacillus lactis</i>
B399/17	<i>Paenibacillus</i> spp.	<i>Paenibacillus</i> spp.
B408/17	<i>Paenibacillus lautus</i>	Idem a B174/17
B433/17	<i>Paenibacillus lautus</i>	Idem a B174/17
B482/17	<i>Paenibacillus</i> spp.	<i>Paenibacillus</i> spp.
B602/17	<i>Paenibacillus lautus</i>	Idem a B174/17
B235/16	<i>Cytobacillus oceanisediminis/firmus</i>	<i>Cytobacillus oceanisediminis/firmus</i>
B674/17	<i>Cytobacillus gottheilii</i>	<i>Cytobacillus gottheilii</i>
B977/17	<i>Cytobacillus firmus</i>	<i>Cytobacillus firmus</i>
B083/16	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (picos muito semelhantes aos de <i>L. sphaericus</i>)
B199/16	<i>Lysinibacillus chungkukjangi</i>	<i>Lysinibacillus</i> spp. (picos muito semelhantes aos de <i>L. fusiformis/sphaericus</i>)
B533/16	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (picos muito semelhantes aos de <i>L. sphaericus</i>)
B211/17	<i>Metabacillus halosaccharovorans/niabensis</i>	<i>Metabacillus halosaccharovorans/niabensis</i>
B583/16	<i>Neobacillus niacini</i>	<i>Neobacillus niacini</i>
B289/17	<i>Oceanobacillus caeni</i>	<i>Oceanobacillus caeni</i>
B449/17	<i>Terribacillus goriensis</i>	<i>Terribacillus goriensis</i>
B350/16	<i>Sporosarcina soli</i>	<i>Sporosarcina soli</i>
B289/16	<i>Brevibacterium/Peribacillus</i>	SS não inserido (gênero indefinido)
B190/17	<i>Bacillus/Domibacillus</i>	SS não inserido (gênero indefinido)
B243/17	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.

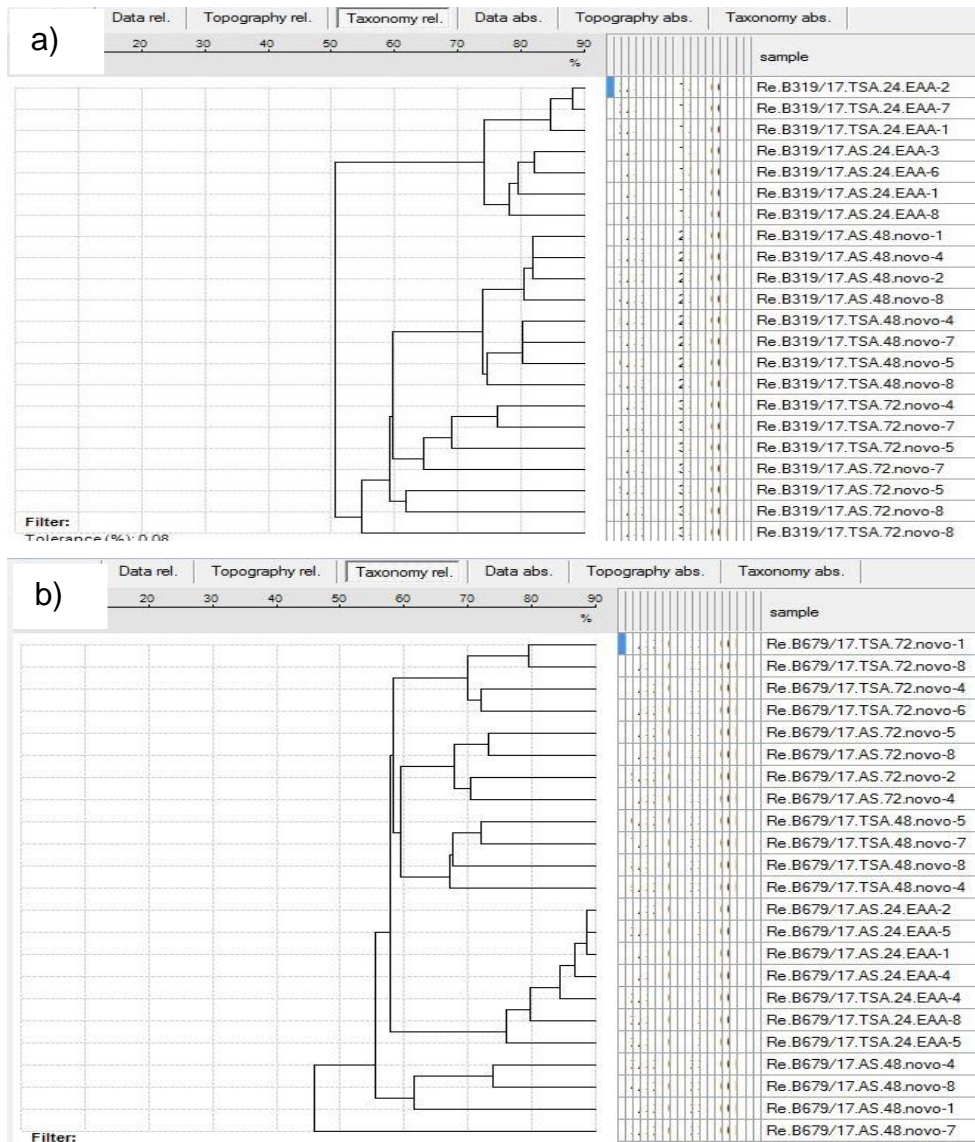
Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: SS: SuperSpectrum.

Não foi possível a inserção do SS referente à linhagem B1072/17, pois os picos do SS contruído apresentaram elevada semelhança com a espécie *B. amyloliquefaciens*, o que não permitiu que os parâmetros exigidos pelo fabricante para criação do SS fossem atingidos. Como a linhagem já havia sido identificada como *B. subtilis*, não houve a necessidade de criação do SS. Fato semelhante ocorreu com as linhagens de *Paenibacillus* B035/17 (*P. glucanolyticus*) e B174/17, B408/17, B433/17, B602/17 (*P. lautus*). Os espectros obtidos para as espécies *P. lautus* e *P. glucanolyticus* apresentaram tamanha semelhança, que não foi possível a construção de SS capazes de refletir as diferenças entre elas, nas condições utilizadas. Tentou-se, então, construir um SS combinando as duas espécies: *P. glucanolyticus/P. lautus*. No entanto, isto também não foi possível, pois o SS proposto apresentou elevada semelhança com o SS de *P. macerans* presente na BD. Neste caso, optou-se pela não inserção do SS, já que as linhagens foram identificadas, pelo menos, em nível de gênero (Quadro 4).

Inicialmente, as linhagens B319/17 e B679/17 não puderam ser inseridas na BD, pois a metodologia de extração utilizada não foi capaz de gerar a produção de espectros. As linhagens produziam tamanha quantidade de muco, principalmente com 24 e 48 h de incubação, que dificultava a transferência de massa celular para o poço da lâmina. Diante disto, outros protocolos de extração foram utilizados, como a aplicação prévia de 1 µL de etanol absoluto (Merck Millipore), 1 µL de ácido fórmico 70% (Merck Millipore) e 1 µL de acetonitrila (Merck Millipore) sobre a porção da colônia transferida à lâmina, antes da aplicação da matriz CHCA (CELANDRONI et al., 2019). No entanto, este procedimento resultou na obtenção de espectros anômalos, que geravam identificações errôneas. Procedeu-se então, conforme descrito por BIER et al. (2017): uma porção das colônias foi suspensa em 900 µL de etanol absoluto. Após centrifugação a 16.000 g durante 2 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi seco à temperatura ambiente, por 10 min. Adicionou-se, então, ao sedimento 10 µL de ácido fórmico 70% e, após homogeneização, 10 µL de acetonitrila. Após nova centrifugação, nas mesmas condições, aplicou-se 1 µL do sobrenadante ao poço da lâmina e após secagem, foi adicionado 1 µL de matriz. Desta vez, foram gerados espectros, porém não foram obtidos dendrogramas homogêneos, ou seja, com mais de 70% de semelhança, a partir deste protocolo (Figura 21).

Figura 21 – Dendrogramas obtidos a partir dos espectros das linhagens B319/17 (a) e B679/17 (b)



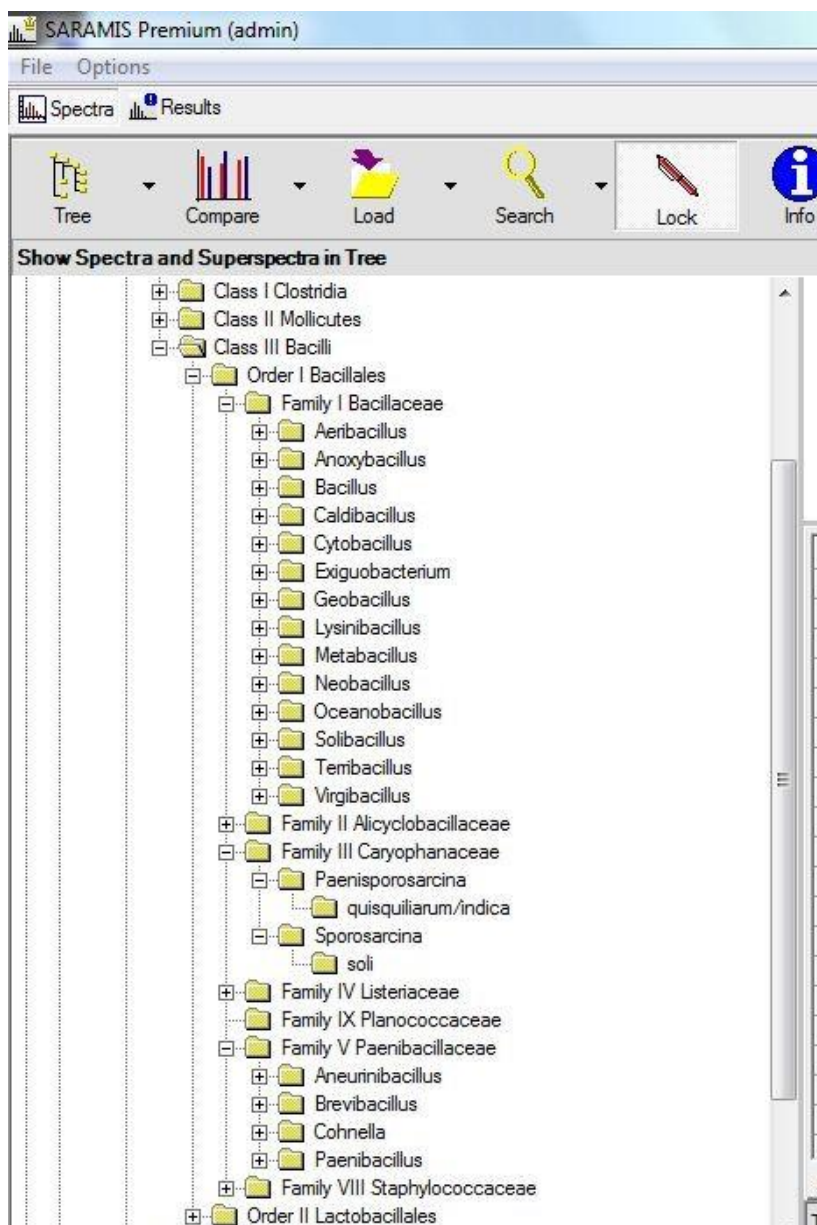
Fonte: (A autora, 2020).

Diante do acima exposto, optou-se por criar os SS, utilizando-se os espectros de referência (ER) obtidos a partir das amostras incubadas somente por 24 h, já que apresentavam mais de 70% de semelhança. Além disso, após 24 h de incubação, havia menor quantidade de muco, o que facilitava a transferência de uma porção da colônia para o tubo contendo etanol absoluto.

As outras linhagens foram inseridas na BD do programa Saramis, conforme demonstrado no Quadro 4, logo foram inseridos 32 SS na referida BD. O nome do SS foi inserido da seguinte forma: gênero_espécie_Bio-Manguinhos+número sequencial para cada espécie/grupo. Exemplo 1: *Bacillus_circulans*_Bio-

Manguinhos1. Exemplo 2: Bacillus_cereus group_Bio-Manguinhos2. Nos casos em que a espécie/grupo não constava na BD, novas pastas foram criadas, no arquivo “Tree” (Figura 22), de acordo com a sua classificação taxonômica.

Figura 22 – Arquivo “Tree” da base de dados do programa Saramis contendo pastas conforme a classificação taxonômica das espécies.



Fonte: (A autora, 2020).

4.8 Inserção dos SuperSpectra referentes às linhagens selecionadas da CBAS (IOC/Fiocruz) na BD do programa Saramis

A fim de se obter uma BD mais robusta, 21 linhagens da CBAS, previamente isoladas de áreas limpas de instituições diversas e identificadas por análise do gene 16S rRNA, foram selecionadas para inserção na BD do programa Saramis (Quadro 5).

As linhagens 3404 e 3405 não foram inseridas na BD (Quadro 5), pois foram identificadas como *T. goriensis* e *L. fusiformis/sphaericus*, respectivamente. Como a análise do gene 16S rRNA não permitiu uma identificação em nível de espécie e as linhagens foram identificadas a partir dos SS previamente inseridos no programa, optou-se pela não inserção desses SS.

As linhagens 3428 e 3439 foram inseridas como *Bacillus* spp e *Paenibacillus* spp. respectivamente, já que o resultado da análise do gene 16S rRNA não permitiu a identificação em nível de espécie, oferecendo como possibilidades quatro espécies diferentes. Quando a identificação possibilitava até três espécies, o SS foi inserido contendo os nomes das três espécies, que foi o caso das linhagens 3492 e 3504, que foram previamente identificadas como *Paenibacillus favisporus/P. cineris/P. rhizosphaerae* e *Paenibacillus dentriformis/P. thiaminolyticus/P. popilliae*, respectivamente. Já o SS referente à linhagem 3540, previamente identificada como *Paenibacillus tundrae/P. amylolyticus* foi inserido como *Paenibacillus* spp., pois os picos gerados apresentaram equivalência muito alta em relação ao SS de outra espécie de *Paenibacillus* (*P. pabuli*). O mesmo ocorreu em relação à linhagem 3584, previamente identificada como *P. timonensis*, cujo SS foi inserido como *Paenibacillus* spp, visto que os picos obtidos apresentaram equivalência muito alta em relação ao SS de *P. barengoltzii*. Os SS referentes às linhagens 3311 e 3482, que representam possíveis novas espécies, foram inseridos na BD do programa Saramis como *Paenibacillus* spp e *Cohnella* spp., respectivamente.

Quadro 5 – Linhagens da Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) selecionadas para inserção na base de dados do programa Saramis e o nome do SuperSpectrum inserido

Linhagem	Identificação por análise do gene 16S rRNA	SS inserido
3311	<i>Paenibacillus</i> spp. (provável nova espécie)	<i>Paenibacillus</i> spp.
3373A	<i>Paenibacillus fonticola</i>	<i>Paenibacillus fonticola</i>
3399	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus circulans</i>
3404	<i>Terribacillus saccharophilus/goriensis/halophilus</i>	SS não inserido, pois o sequenciamento não definiu uma única espécie. Identificada como <i>T. goriensis</i> .
3405	<i>Lysinibacillus macroides/boronitolerans/fusiformis</i>	SS não inserido, pois o sequenciamento não definiu uma única espécie. Identificada como <i>L. fusiformis/sphaericus</i> .
3424B	<i>Paenibacillus fonticola</i>	<i>Paenibacillus fonticola</i>
3428	<i>Bacillus jeotgali/thioparans/boroniphilus/selenatarsenatis</i>	<i>Bacillus</i> spp.
3439B	<i>Paenibacillus amylolyticus/xylanexedens/cellulosilyticus/kobensis</i>	<i>Paenibacillus</i> spp.
3441	<i>Bacillus koreensis</i>	<i>Bacillus koreensis</i>
3456	<i>Bacillus onubensis</i>	<i>Bacillus onubensis</i>
3476	<i>Bacillus onubensis</i>	<i>Bacillus onubensis</i>
3482	<i>Cohnella</i> spp. (provável nova espécie)	<i>Cohnella</i> spp
3492	<i>Paenibacillus favisporus/cineris/rhizosphaerae</i>	<i>Paenibacillus favisporus/cineris/rhizosphaerae</i>
3504	<i>Paenibacillus dentriformis/thiaminolyticus/popilliae</i>	<i>Paenibacillus dentriformis/thiaminolyticus/popilliae</i>
3535	<i>Oceanobacillus sojiae</i>	<i>Oceanobacillus sojiae</i>
3537	<i>Bacillus</i> spp. (provável nova espécie)	<i>Bacillus</i> spp.
3540	<i>Paenibacillus tundrae/amylolyticus</i>	<i>Paenibacillus</i> spp.
3552	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum/indica</i>	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum/indica</i>
3564	<i>Paenibacillus humicus</i>	<i>Paenibacillus humicus</i>
3568	<i>Paenibacillus humicus</i>	<i>Paenibacillus humicus</i>
3584	<i>Paenibacillus timonensis</i>	<i>Paenibacillus</i> spp.

Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: SS: SuperSpectrum.

A partir das linhagens da CBAS foram inseridos 19 SS na BD do programa Saramis. O nome do SS foi inserido da seguinte forma: gênero_espécie_CBAS+número sequencial para cada espécie/grupo. Exemplo: *Paenibacillus fonticola*_CBAS1. Nos casos em que a espécie/grupo não constavam na BD, novas pastas foram criadas, no arquivo “*Tree*” (Figura 22), de acordo com a sua classificação taxonômica.

No total, 51 SS foram inseridos na BD do programa Saramis. Os ER gerados para cada linhagem, a partir dos quais os SS foram construídos, também foram inseridos nas pastas referentes a espécie/grupo as quais pertenciam. Na Tabela 12 pode ser observado que 19 espécies/grupos representaram acréscimos à BD do programa Saramis, já que não estavam previamente presentes. Vale ressaltar que após a ampliação da BD, sete gêneros foram incluídos. Não havia linhagens pertencentes aos gêneros *Cohnella*, *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Paenisporosarcina*, *Sporosarcina* e *Terribacillus* na BD. No caso do gênero *Cytobacillus*, já havia espectros de referência e SS na BD referentes à espécie *B. firmus*, que foi recentemente reclassificada como *C. firmus*. Após a ampliação da BD, novos ER e SS foram inseridos para esta espécie e também para *C. oceanosediminis/firmus* e a pasta para o gênero *Cytobacillus* foi criada.

Tabela 12 – Número de espectros de referência e SuperSpectra referentes às linhagens isoladas no presente trabalho inseridas na base de dados do programa Saramis (continua)

Espécie/grupo	Antes		Depois	
	ER	SS	ER	SS
<i>Bacillus cereus</i> group	19	9	77	12
<i>Bacillus circulans</i>	33	2	71	4
<i>Bacillus flexus</i>	0	0	25	1
<i>Bacillus infantis</i>	2	0	50	2
<i>Bacillus koreensis</i>	0	0	20	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	25	4	64	5
<i>Bacillus megaterium</i>	19	3	40	4

Tabela 12 – Número de espectros de referência e SuperSpectra referentes às linhagens isoladas no presente trabalho inseridas na base de dados do programa Saramis (conclusão)

Espécie/grupo	Antes		Depois	
	ER	SS	ER	SS
<i>Bacillus onubensis</i>	0	0	44	2
<i>Bacillus pumilus</i> group	0	0	70	3
<i>Bacillus</i> spp.	33	0	184	7
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	0	0	24	0
<i>Cohnella</i> spp.	0	0	22	1
<i>Cytobacillus gottheilli</i>	0	0	23	1
<i>Cytobacillus firmus</i>	17	3	41	4
<i>Cytobacillus oceanisediminis/firmus</i>	0	0	21	1
<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i>	0	6	36	8
<i>Lysinibacillus</i> spp.	0	0	19	1
<i>Metabacillus halosaccharovorans/niabensis</i>	0	0	24	1
<i>Neobacillus niacini</i>	0	0	23	1
<i>Oceanobacillus caeni</i>	6	1	24	2
<i>Oceanobacillus sojae</i>	16	1	40	2
<i>Paenibacillus dendritiformis/thiaminolyticus/popilliae</i>	0	0	43	1
<i>Paenibacillus favisporus/cineris/rhizosphaerae</i>	0	0	24	1
<i>Paenibacillus fonticola</i>	0	0	32	2
<i>Paenibacillus gluconolyticus</i>	34	2	52	2
<i>Paenibacillus humicus</i>	0	0	47	2
<i>Paenibacillus lactis</i>	12	2	30	3
<i>Paenibacillus lautus</i>	29	2	49	2
<i>Paenibacillus</i> spp.	15	0	208	6
<i>Paenibacillus urinalis</i>	0	0	18	1
<i>Paenisporosarcina qusquiliarum/indica</i>	0	0	24	1
<i>Terribacillus goriensis</i>	0	0	19	1
<i>Sporosarcina soli</i>	0	0	18	1
Total	260	35	1506	86

Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: ER: espectros de referência, SS: SuperSpectra.

Portanto, houve um acréscimo na BD do programa Saramis de 245,7% (86), em relação ao número inicial de SS (35) e de cerca de 580,0% (1.506), em relação ao número inicial de espectros de referência (260), no que se refere às espécies encontradas no presente trabalho (Tabela 12).

4.9 Verificação da funcionalidade dos SuperSpectra inseridos na BD do programa Saramis

A última etapa do presente trabalho consistiu na submissão das 97 linhagens isoladas em Bio-Manguinhos e das 21 linhagens selecionadas da CBAS, novamente, à análise proteômica por MALDI-TOF MS, de modo a constatar se estas linhagens seriam identificadas após a inserção dos referidos SS.

Pode-se observar na Tabela 13 que após a ampliação da BD do programa Saramis, o percentual de linhagens não identificadas reduziu de 22,7% para apenas 3,1%. Esperava-se que três linhagens não fossem identificadas já que ainda não constavam na BD, sendo elas: B289/16, B190/17 e B282/17. Este resultado se confirmou. Conforme descrito anteriormente, estas linhagens não foram incluídas na BD, pois não foi possível a confirmação do gênero a qual pertencem: B289/16 e B282/17 – *Brevibacterium* ou *Peribacillus* e B190/17 – *Bacillus* ou *Domibacillus*.

Tabela 13 – Resultados de identificação, por MALDI-TOF MS, das linhagens isoladas em Bio-Manguinhos antes e depois da inserção dos SuperSpectra

Resultados de Identificação das Linhagens Isoladas em Bio-Manguinhos	Antes da Inserção dos SS		Após a Inserção dos SS	
	Número	Percentual	Número	Percentual
Em nível de espécie	29	29,9%	29	29,9%
Em nível de gênero	46	47,4%	65	67,0%
Não identificado	22	22,7%	3	3,1%
Nº total de linhagens				97

Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: SS: SuperSpectra.

A Tabela 13 também demonstra que o percentual de identificação em nível de gênero aumentou de 47,4% para 67,0%, principalmente em função das linhagens que passaram a ser identificadas, após a introdução dos respectivos SS na BD do programa Saramis. Já o percentual de identificação em nível de espécie se manteve em 29,9%. Isto ocorreu, pois ao passo que algumas linhagens previamente identificadas em nível de espécie, apresentaram maior similaridade com os SS inseridos na BD referentes a grupos de espécies ou ao gênero, do que em relação

aos SS referentes a espécies criados pelo fabricante; outras linhagens antes não identificadas passaram a ser identificadas em nível de espécie. Não foram obtidas identificações incorretas. O APÊNDICE A contém um quadro demonstrando os resultados de identificação das 97 linhagens antes e depois da ampliação da BD do programa Saramis (Quadro 7).

A Tabela 14 demonstra que das 21 linhagens cedidas pela CBAS, somente três foram inicialmente identificadas em nível de espécie (14,3%) e somente duas em nível de gênero (9,5%), ou seja, a maioria delas (16) não foi identificada (76,2%) por MALDI-TOF MS. Após a ampliação da BD, todas as linhagens passaram a ser identificadas, sendo 47,6% em nível de espécie e 52,4% em nível de gênero. O APÊNDICE B contém um quadro demonstrando os resultados de identificação das 21 linhagens antes e depois da ampliação da BD do programa Saramis (Quadro 8).

Tabela 14 – Resultados de identificação, por MALDI-TOF MS, das linhagens cedidas pela Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) antes e depois da inserção dos SuperSpectra

Resultados de Identificação das Linhagens da CBAS	Antes da Inserção dos SS		Após a Inserção dos SS	
	Número	Percentual	Número	Percentual
Em nível de espécie	3	14,3%	10	47,6%
Em nível de gênero	2	9,5%	11	52,4%
Não identificado	16	76,2%	0	0,0%
Nº total de linhagens			21	

Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: SS: SuperSpectra.

Os resultados apresentados demonstram que a criação de uma BD customizada para MALDI-TOF MS contendo as linhagens isoladas localmente é essencial para que se obtenha resultados mais precisos a partir desta metodologia. Celandroni et al. (2016) sugeriram que a não identificação de *B. simplex*, *P. glucanolyticus*, *P. amylolyticus* e *P. lautus* por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, EUA) ocorreu em função do número limitado de perfis de espectros na BD. Este resultado é interessante, pois no presente trabalho as linhagens pertencentes às espécies *P. glucanolyticus* e *P. lautus* não foram identificadas em nível de espécie, somente em nível de gênero. Os dois SS presentes na BD, referentes a cada uma

delas, não se mostraram capazes de identificá-las, o que pode evidenciar a dificuldade de construção de SS capazes de diferenciar estas duas espécies por esta metodologia.

Sulaiman et al. (2018) também enfatizaram a importância de perfis de espectros de massa adequados nas BD associadas a MALDI-TOF MS para que se obtenham identificações precisas. Os autores demonstraram a identificação de cinco dentre nove linhagens de *L. fusiformis* como *L. fusiformis/L. sphaericus* por VITEK® MS (bioMérieux, França, programas IVD e Saramis); três delas foram identificadas em nível de espécie e uma delas não foi identificada. Os autores também reportaram que havia perfis proteômicos referentes a *L. sphaericus* e *L. fusiformis* nas referidas BD, porém não definiram a quantidade. De qualquer forma, os espectros presentes na BD não foram suficientes para identificar as nove linhagens isoladas. Na versão do programa Saramis utilizada no presente trabalho, não havia SS referentes às espécies *L. fusiformis* e *L. sphaericus* na BD, constando somente seis SS referentes a *L. fusiformis/L. sphaericus* (Tabela 12), o que inviabilizou a identificação em nível de espécie das linhagens deste gênero encontradas no presente trabalho.

Alguns autores sugerem a possibilidade de análise de picos de baixa m/z (abaixo de 3.000) para diferenciar espécies de *Bacillus* geneticamente muito próximas, como *B. cereus* e *B. thuringiensis* e linhagens de *B. cereus* produtoras ou não de toxinas eméticas (HA et al, 2016, ULRICH et al, 2019). Portanto, estudos posteriores devem ser realizados de modo a buscar novas abordagens por MALDI-TOF MS para a diferenciação de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados estreitamente relacionadas e, conseqüentemente, para a inserção destes SS na BD do programa Saramis.

Seuylemezian et al. (2018) construíram uma BD para MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, EUA) a partir de bactérias isoladas de salas limpas utilizadas para a montagem de naves especiais e sugeriram que, além de promover identificação precisa, em tempo real e de alto processamento, a contínua inserção de novos espectros ampliará a identificação de espécies pertencentes a grupos taxonômicos e auxiliará na detecção de potenciais novas espécies preservadas na coleção microbiológica do laboratório. Os autores sugeriram que a criação de um banco de dados para MALDI-TOF MS de livre acesso ampliaria consideravelmente o estudo de micro-organismos de origem ambiental.

Realmente, não há um número considerável de trabalhos, na literatura, abordando a utilização de MALDI-TOF MS para o estudo de bactérias de origem ambiental em comparação a estudos envolvendo linhagens de interesse médico e alimentar. Rahi, Prakash e Shouche (2016) argumentaram que há a necessidade de expandir as BD que contemplam micro-organismos de origem ambiental, incluindo um número o mais variado possível de linhagens, já que as BD construídas costumam contemplar grupos microbianos específicos, conforme o interesse de cada laboratório. Pretende-se, a partir deste trabalho, ampliar a BD do programa Saramis, incluindo-se outras classes de micro-organismos ambientais rotineiramente isolados, como bastonetes Gram-negativos não fermentadores, fungos e leveduras, ampliando assim, o potencial de identificação de micro-organismos do LACOM de Bio-Manguinhos, através do desenvolvimento de futuras dissertações e teses. Além disso, é possível a disponibilização dos arquivos referentes aos SS construídos, o que pode render futuras parcerias com outras unidades da Fiocruz e/ou outros institutos de pesquisa, que tenham interesse nessa metodologia.

Portanto, a construção de uma BD customizada para MALDI-TOF MS demonstra ser uma ferramenta promissora para a identificação bacteriana. Além da técnica apresentar rapidez, acurácia e facilidade de execução, oferece um menor custo, quando comparada a outras metodologias. Conforme já mencionado, atualmente, o LACOM de Bio-Manguinhos utiliza as metodologias VITEK® 2 e VITEK® MS para a identificação dos micro-organismos isolados de diversas fontes. O Quadro 6 demonstra o custo por análise das metodologias VITEK® 2, VITEK® MS e MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA. O cálculo foi realizado considerando-se os principais insumos utilizados para a execução de cada uma delas. Pode-se observar que o custo por amostra de VITEK® MS é quase 3 vezes menor que o custo de VITEK® 2 e cerca de 20 vezes menor que MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA.

Quadro 6 - Custo por análise das metodologias utilizadas no presente trabalho

Metodologia	Custo por amostra (R\$)
VITEK® 2	60
VITEK® MS	23
MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA	470

Fonte: (A autora, 2020).

Deste modo, torna-se mais viável economicamente para o laboratório a identificação por MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA ou o sequenciamento de outros genes *housekeeping*, somente quando não houver identificação adequada por VITEK® 2 ou VITEK® MS. Nestes casos, após a análise genética, essas linhagens deverão ser inseridas na BD do programa Saramis, a fim de serem identificadas adequadamente por VITEK® MS, quando novamente isoladas.

Após a ampliação da BD do programa Saramis, realizou-se um levantamento para avaliar quantas linhagens de BGPE isoladas na rotina do laboratório foram identificadas a partir dos SS inseridos durante o desenvolvimento do presente trabalho. Nos meses de março a agosto de 2020, 189 linhagens deste grupo bacteriano foram isoladas e 85 foram identificadas a partir dos SS construídos, o que representa 45,0% do total (Tabela 15). Deste modo, torna-se evidente o benefício que a ampliação da BD para *Bacillus* e gêneros relacionados promoveu ao LACOM de Bio-Manguinhos. Além disso, esta BD poderá ser útil não somente a Bio-Manguinhos, mas também a outras unidades da Fiocruz, viabilizando diversas parcerias em futuros projetos de pesquisa na área de identificação de bactérias de origem ambiental e na área de taxonomia como uma das ferramentas para a descrição de novas espécies.

Tabela 15 – BGPE identificados na rotina do Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) a partir dos SuperSpectra inseridos na base de dados do programa Saramis

Meses	Número de BGPE Isolados no Laboratório	BGPE Identificados a partir dos SS Inseridos na BD	
		Número	Percentual (%)
Março	46	14	30,4
Abril	23	15	65,2
Maio	20	7	35,0
Junho	32	20	62,5
Julho	25	13	52,0
Agosto	43	16	37,2
Total	189	85	45,0

Fonte: (A autora, 2020).

Legenda: BGPE: bastonetes Gram-positivos esporulados; BD: base de dados; SS: SuperSpectra.

5 CONCLUSÃO

As 97 linhagens de *Bacillus* e gêneros relacionados selecionadas, no presente trabalho, foram submetidas à caracterização proteômica por MALDI-TOF MS e, inicialmente, 33 linhagens não foram identificadas. Após a inserção de etapa de extração prévia com ácido fórmico 70%, este número reduziu para 22.

As 97 linhagens foram identificadas através da análise do gene 16S rRNA:

- Dentre 92 linhagens, foram identificados os seguintes gêneros: *Bacillus* (53,3%), *Paenibacillus* (30,4%), *Cytobacillus* (6,5%), *Lysinibacillus* (4,3%) e *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Oceanobacillus*, *Terribacillus* e *Sporosarcina* (1,1% para cada gênero).
- Os resultados foram inconclusivos, quanto ao gênero, para cinco linhagens: duas - *Brevibacterium/Peribacillus*, uma - *Bacillus/Domibacillus*, e uma - *Bacillus/Cytobacillus*.

A análise do gene 16S rRNA não foi capaz de identificar todas as linhagens em nível de espécie, em função de algumas delas pertencerem a grupos taxonômicos que compartilham alta similaridade no gene 16S rRNA, como os grupos *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis* e *B. megaterium/B. flexus*.

A utilização do kit MicroSEQ® Full Gene 16S rDNA se mostrou extremamente eficiente, permitindo o sequenciamento do gene 16S rRNA das 97 linhagens analisadas. Por ser uma metodologia validada e padronizada, desponta como uma ferramenta eficaz para a análise do gene 16S rRNA em laboratórios de microbiologia industriais.

A análise filogenética das linhagens, com base no gene 16S rRNA permitiu a identificação de 40 perfis taxonômicos, para sequenciamento dos genes *rpoB* e *gyrB*. Foi possível a amplificação de *rpoB* de 22 linhagens e de *gyrB* de seis linhagens, com os iniciadores utilizados. Posteriormente, os genes *rpoB* e *gyrB* das linhagens restantes serão sequenciados, utilizando-se iniciadores específicos para cada gênero.

Após análise dos genes 16S rRNA, *rpoB* e *gyrB*, das 40 linhagens selecionadas, 26 foram identificadas em nível de espécie, 12 em nível de gênero e para duas delas, não foi possível a definição do gênero.

Conforme os resultados obtidos, 12 linhagens foram apontadas como possíveis novas espécies, sendo cinco do gênero *Bacillus* (dois isolados com o mesmo perfil taxonômico), seis do gênero *Paenibacillus* (cinco isolados com o mesmo perfil taxonômico), e um com gênero indefinido (*Bacillus/Domibacillus*). Essas linhagens serão posteriormente, melhor caracterizadas, depositadas em coleções de referência internacionais e os resultados referentes à descrição das possíveis novas espécies serão publicados.

A partir das linhagens isoladas em Bio-Manguinhos, foram incluídos 32 SS na BD do programa Saramis, sendo 14 SS referentes a espécies e 18 referentes a grupos de espécies/gênero. Não foi possível a inserção de alguns SS referentes a espécies, pois os picos obtidos apresentavam alta equivalência em relação a espécies já presentes na BD, o que inviabilizava a criação dos SS.

Inicialmente, duas linhagens não puderam ser inseridas na BD do programa Saramis, pois o protocolo de extração utilizado não foi capaz de gerar espectros. Outros protocolos de extração foram testados, adicionando-se etanol absoluto e acetonitrila. Os espectros obtidos, considerando-se os tempos de incubação de 24, 48 e 72 h apresentaram-se muito heterogêneos, não sendo possível a criação de SS confiáveis. Em função disso, somente para estas duas linhagens, os SS foram criados a partir dos espectros obtidos somente com amostras incubadas por 24 h.

A partir das 21 linhagens cedidas pela CBAS, 19 SS foram inseridos na BD. Duas não foram inseridas, pois seu perfil já havia sido introduzido na BD, a partir das linhagens isoladas em Bio-Manguinhos. No total, a BD do programa Saramis foi ampliada em 51 SS.

Após a inserção dos SS, das 97 linhagens isoladas em Bio-Manguinhos, apenas três (3,1%) não foram identificadas por MALDI-TOF MS, pois seu perfil de espectros não estava contemplado na BD do programa Saramis. Todas as 21 linhagens cedidas pela CBAS foram identificadas por MALDI-TOF MS.

Portanto, a identificação molecular de *Bacillus* e gêneros relacionados, através do sequenciamento de genes *housekeeping* e a introdução desses espectros no programa Saramis, de modo a se obter uma base de dados customizada, em relação às espécies bacterianas isoladas localmente, se mostrou uma ferramenta extremamente promissora e eficaz na identificação de *Bacillus* e gêneros relacionados de origem farmacêutica industrial.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. S.; PINTO, T. J. A.; OLIVEIRA, D. C. Áreas limpas: estudo de correlação entre partículas viáveis e não-viáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 177-184, 2003.

ADELKOV, J.; PATEL, B. K. C. A molecular phylogenetic framework for *Bacillus subtilis* using genome sequences and its application to *Bacillus subtilis* subspecies *stecoris* strain D7XPN1, an isolate from a commercial food-waste degrading bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 96, 2016.

ADELKOV, J.; PATEL, B. K. C. Erratum to: A molecular phylogenetic framework for *Bacillus subtilis* using genome sequences and its application to *Bacillus subtilis* subspecies *stecoris* strain D7XPN1, an isolate from a commercial food-waste degrading bioreactor. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 142, 2017.

ADIBPOUR, N.; HOSSEININEZHAD, M.; PAHLEVANLO, A. Application of spore-forming probiotic *Bacillus* in the production of Nabat-A new functional sweetener. **LWT-Food Science and Technology**, p. 108277, 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Guia da qualidade para sistemas de purificação de água para uso farmacêutico**. Brasília: ANVISA, 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501339/Guia+de+Qualidade+para+Sistemas+de+Purifica%C3%A7%C3%A3o+de+%C3%81gua+para+Uso+Farmac%C3%AAutico/35afe39c-30a4-4714-87b5-0c421d5deb27>. Acesso em: 13 abr. 2020. 2013a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Guia da qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica**. Brasília: ANVISA, 2013. Disponível em: http://conforlab.com.br/legislacao/qualidade_do_ar_final.pdf. Acesso em: 10 ago. 2016. 2013b.

AHMED, I. *et al.* Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1117-1125, 2007.

AHMED, I. *et al.* Description of *Lysinibacillus pakistanensis*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 16, n. 2, 2014.

ALEXANDER, B.; PRIEST, F. G. *Bacillus glucanolyticus*, a new species that degrades a variety of β -glucans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 112-115, 1989.

ALI, H. R. K.; HEMEDA, N. F.; ABDELALIEH, Y. F. Symbiotic cellulolytic bacteria from the gut of the subterranean termite *Pseudotermes hypostoma* Desneux and their role in cellulose digestion. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 111, 2019.

ALMASOUD, N. *et al.* Classification of *Bacillus* and *Brevibacillus* species using rapid analysis of lipids by mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 27, p. 7865-7878, 2016.

ALMUZARA, M. *et al.* Matrix-assisted Laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) as a reliable tool to identify species of catalase-negative gram-positive cocci not belonging to the streptococcus genus. **The open microbiology journal**, v. 10, p. 202-208, 2016.

ALRUMMAN, S. A.; HESHAM, A. E-L.; ALAMRI, S. A. Isolation, fingerprinting and genetic identification of indigenous PAHs degrading bacteria from oil-polluted soils. **Journal of environmental biology**, v. 37, n. 1, p. 75, 2016.

AN, S.Y. *et al.* *Terribacillus saccharophilus* gen. nov., sp. nov. and *Terribacillus halophilus* sp. nov., spore-forming bacteria isolated from field soil in Japan. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 1, p. 51-55, 2007.

ANDRADE, L. O. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of bacteria isolated from pharmaceutical clean rooms. **Interventional Medicine and Applied Science**, v. 10, n. 1, p. 45–53, 2018.

ASH, C. *et al.* Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 202-206, 1991.

ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 64, n. 3-4, p. 253-260, 1993.

AUTA, H. S.; EMENIKE, C. U.; FAUZIAH, S. H. Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 1552-1559, 2017.

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4-15, 2015.

BAI, W. *et al.* Cloning, expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 11, p. 2093-2099, 2012.

BALLESTÉ, R. N. Proteomics. *In*: COBO, Fernando. **The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology**. Academic Press, 2018. p. 1-17.

BEREKA, M.; SALAMA, K.; ALKHARSAH, K. Antibiotics sensitivity and heavy metals resistance in PHB-producing bacilli isolated from eastern province, Saudi Arabia. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 18, n. 6, p. 1232-1236, 2016.

BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **Journal of invertebrate pathology**, v. 109, n. 1, p. 1-10, 2012.

BIAN, H. *et al.* Biodegradation of polyvinyl alcohol using cross-linked enzyme aggregates of degrading enzymes from *Bacillus niacini*. **International journal of biological macromolecules**, v. 124, p. 10-16, 2019.

BIER, D. *et al.* Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1373-1379, 2017.

BIO-MANGUINHOS. **Portfólio**: produtos e serviços tecnológicos de Bio-Manguinhos/Fiocruz. 2019. Disponível em <https://www.bio.fiocruz.br/images/portfolio-bio-fiocruz-2019.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2020.

BIO-MANGUINHOS. **Quem somos**. 2020a. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/home/quem-somos>. Acesso em: 02 abr. 2020.

BIO-MANGUINHOS. **Boletim Semanal Coronavírus**. Assessoria de Comunicação Edição: 1 - 9/4/2020. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/images/boletim-9-4-2020.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2020. 2020b.

BIOMÉRIEUX. **Informação de produtos dos sistemas VITEK® 2 Systems**. 2010.

BIOMERIEUX. **VITEK MS Plus – Saramis™ Premium User Manual, versão A**. 2012.

BIOMERIEUX. **VITEK MS Plus – Saramis™ Knowledge Base versão 4.12**. 2013.

BOTTALE, A. J.; RIERA, L. M.; RABINOVITCH, L. Evaluación de la carga microbiológica ambiental en áreas destinadas a producción y control de vacunas. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 49, n. 1, p. 47-60, 2015.

BRANQUINHO, R. *et al.* Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly heterogeneous population of different closely related species and clones. **FEMS microbiology ecology**, v. 90, n. 3, p. 689-698, 2014.

BRASIL. Constituição (1998). **Constituição da República Federal do Brasil**. Brasília, DF: Senado; 1988. 292 p.

BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 20 set. 1990. Seção 1, p. 18055. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm. Acesso em: 10 ago. 2016.

BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Seção 1, p. 1. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9782.htm. Acesso em: 02 abr. 2020.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-42. 2011a.

BRASIL. Resolução RDC nº 55 de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 dez. 2010. Seção 1, p. 110-113, 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº 50 de 20 de setembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 set. 2011. Seção 1, p. 694-697, 2011b.

BRASIL. Instrução Normativa IN nº 35 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação Complementares a Medicamentos Estéreis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 ago. 2019. Seção 1, p.74, 2019a.

BRASIL. Resolução RDC nº 301 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 ago. 2019. Seção 1, p.64-111, 2019b.

CAAMAÑO-ANTELO, S. *et al.* Genetic discrimination of food borne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. Based on three housekeeping genes. **Food Microbiology**, v. 46, p. 288-298, 2015.

CARTER, L. *et al.* Analysis of enterotoxigenic *Bacillus cereus* strains from dried foods using whole genome sequencing, multi-locus sequence analysis and toxin gene prevalence and distribution using endpoint PCR analysis. **International journal of food microbiology**, v. 284, p. 31-39, 2018.

CAULIER, S. *et al.* Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 302, 2019.

CELANDRONI, F. *et al.* Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. **PloS One**, v. 11, n. 3, p. e0152831, 2016.

CELANDRONI, F. *et al.* Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. **PloS One**, v. 14, n. 5, p. e0217021, 2019.

CHANDNA, P.; MAYILRAJ, S.; KUHAD, R. C. *Bacillus paraflexus* sp. nov., isolated from compost. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4735-4743, 2013.

CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL. **The impact of a customized MALDI-TOF library for environmental microbial identifications.**

2013. Disponível em:

http://www.criver.com/files/pdfs/emd/accugenix/qc_ag_d_maldi-tof_library_tech_sheet.aspx. Acesso em: 10 maio 2016.

CHECINSKA, A.; PASZCZYNSKI, A.; BURBANK, M. *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, p. 351-369, 2015.

CHUDEJOVA, K. *et al.* Validation of a novel automatic deposition of bacteria and yeasts on MALDI target for MALDI-TOF MS-based identification using MALDI Colony robot. **PloS One**, v. 12, n. 12, p. e0190038, 2017.

COOREVITS, A. *et al.* *Lysinibacillus macroides* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1121-1127, 2012.

COSTA, L. V. **Avaliação da diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada dedicado à produção de penicilínicos em Farmanguinhos – Fiocruz.** 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

COSTA, L. V. *et al.* A. Avaliação da diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada de uma indústria farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 98, n. 1, p. 1919-1937, 2017.

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

CUNDELL, A. M. Microbial Identification Strategies in the Pharmaceutical Industry. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 111-123, 2006.

CUNHA, C. D. *et al.* Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 949-959, 2006.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

DE CAROLIS, E. *et al.* Development and validation of in-house database for MALDI-TOF MS-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1453-1458, 2014.

DOBRZANSKI, T. *et al.* *Bacillus megaterium* strains derived from water and soil exhibit differential responses to the herbicide mesotrione. **PloS One**, v. 13, n. 4, p. e0196166, 2018.

DONIO, M. B. S. *et al.* Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 11, p. 876-883, 2013.

DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; ZEIGLER, D. R. Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 1, p. 1-12, 2020.

EHLING-SCHULZ, M.; LERECLUS, D.; KOEHLER, T. M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. **Gram-Positive Pathogens**, v. 7, n. 3, p. 875-902, 2019.

EL-ESAWI, M. A. *et al.* *Bacillus firmus* (SW5) augments salt tolerance in soybean (*Glycine max* L.) by modulating root system architecture, antioxidant defense systems and stress-responsive genes expression. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, p. 375-384, 2018.

ELSHAGHABEE, F. M. F. *et al.* *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017.

ESMAEILI, A. *et al.* Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in soil. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e71720, 2013.

ESPARIZ, M. *et al.* Taxonomic identity resolution of highly phylogenetically related strains and selection of phylogenetic markers by using genome-scale methods: the *Bacillus pumilus* group case. **PloS One**, v. 11, n. 9, p. e0163098, 2016.

ESSGHAIER, B. *et al.* Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 833-846, 2009.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. 2 v. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 13 abr. 2020.

FERRAND, J. *et al.* Cardiac device-related endocarditis caused by *Paenibacillus gluconolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3439-3442, 2013.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **História**. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/historia>. Acesso em: 03 abr. 2020.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, n. 5, p. 732, 2009.

GADELHA, C.; AZEVEDO, N. Inovação em vacinas no Brasil: experiência recente e constrangimentos estruturais. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, p. 697-724, 2003.

GALDOS-RIVEROS, A. C. et al. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clínica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-24, 2010.

GALLAGHER, M. T.; REISINGER, A. J. Effects of ciprofloxacin on metabolic activity and algal biomass of urban stream biofilms. **Science of The Total Environment**, v. 706, n. 135728, p. 1-10, 2020.

GALMÉS-TRUYOLS, A. et al. An outbreak of cutaneous infection due to *Mycobacterium abscessus* associated to mesotherapy. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 29, n. 7, p. 510-514, 2011.

GENG, C. et al. Draft genome sequence of *Bacillus firmus* DS1. **Journal of Biotechnology**, v. 177, p. 20-21, 2014.

GIRI, S. S. et al. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, p. 66-72, 2019.

GONZÁLEZ, I. et al. Current status on *Arcobacter* research: an update on DNA-based identification and typing methodologies. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 956-968, 2012.

GRADY, E. N. et al. Current knowledge and perspective of *Paenibacillus*: a review. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 203, 2016.

GUNASEELAN, R.; VISWANATHAN, T. Identification and Molecular Characterization of Microbial Isolates from Purified Water Used in Pharmaceutical Industry. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 1815-1821, 2019.

GUO, L. et al. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. **Journal of Thorac Disease**, v. 6, n. 5, p. 534-538, 2014.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95-98, 2000.

HA, M. et al. Reliable Identification of *Bacillus cereus* Group Species Using Low Mass Biomarkers by MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 887-896, 2019.

HARWOOD, C. R. et al. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 6, p. 721-738, 2018.

HELGASON, E. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.

HEYNDRICKX, M. *et al.* A polyphasic reassessment of the genus *Paenibacillus*, reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco *et al.* 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and emended descriptions of *P. lautus* and of *P. peoriae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 988-1003, 1996.

HEYRMAN, J. *et al.* *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 47-57, 2004.

HIRAI, C. K. Microbiologia em Foco: Controle microbiológico da nutrição parenteral. **Revista Analytica**, n. 69, p. 8-9, 2014. Disponível em: http://www.revistaanalytica.com.br/revista_digital/69/microbiologia-em-foco.pdf. Acesso em: 10 ago. 2016.

HUANG, C-H. *et al.* Establishment and application of an analytical in-house database (IHDB) for rapid discrimination of *Bacillus subtilis* group (BSG) using whole-cell MALDI-TOF MS technology. **Molecular and Cellular Probes**, v. 30, n. 5, p. 312-319, 2016.

IDELEVICH, E. A.; POGODA, C. A.; BALLHAUSEN, B. Pacemaker lead infection and related bacteraemia caused by normal and small colony variant phenotypes of *Bacillus licheniformis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 940-944, 2013.

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

JUNG, J; JEONG, H.; KIM, H. J.; LEE, D.-W.; LEE, S. J. Complete genome sequence of *Bacillus oceanisediminis* 2691, a reservoir of heavy-metal resistance genes. **Marine Genomics**, v. 30, p. 73-76, 2016.

JUNG, M. Y. *et al.* Description of *Lysinibacillus sinduriensis* sp. nov., and transfer of *Bacillus massiliensis* and *Bacillus odysseyi* to the genus *Lysinibacillus* as *Lysinibacillus massiliensis* comb. nov. and *Lysinibacillus odysseyi* comb. nov. with emended description of the genus *Lysinibacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 2347-2355, 2012.

KÄMPFER, P. *et al.* *Sporosarcina contaminans* sp. nov. and *Sporosarcina thermotolerans* sp. nov., two endospore-forming species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1353-1357, 2010.

KANG, C.-H. *et al.* Biosequestration of copper by bacteria isolated from an abandoned mine by using microbially induced calcite precipitation. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 206-212, 2016.

KI, J-S.; ZHANG, W.; QIAN, P-Y. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, n. 1, p. 48-57, 2009.

KIM, I.; LEE, M.; WANG, S. Heavy metal removal in groundwater originating from acid mine drainage using dead *Bacillus drentensis* sp. immobilized in polysulfone polymer. **Journal of Environmental Management**, v. 146, p. 568-574, 2014.

KIM, S.-J. *et al.* *Lysinibacillus chungkukjangi* sp. nov., isolated from Chungkukjang, Korean fermented soybean food. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 400-404, 2013.

KIM, Y.-G. *et al.* *Pelagibacillus goriensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from coastal water off the east coast of Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1554-1560, 2007.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KO, K. S. *et al.* *Bacillus infantis* sp. nov. and *Bacillus idriensis* sp. nov., isolated from a patient with neonatal sepsis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 2541-2544, 2006.

KOHLMANN, R. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 4, p. 469-479, 2015.

KONRAD, R. *et al.* Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 9, p. 2000173, 2020.

KONSTANTINO, G. N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *In*: LIN, J.; ALCOCER, M. (ed.). **Food Allergens: methods and protocols**, methods in molecular biology. Nova York: Ed. Humana Press, 2017. v. 1592. p. 79-94.

KORENBLUM, G. *et al.* Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 97-103, 2008.

KRISHNAMURTHI, S.; CHAKRABARTI, T. Proposal for transfer of *Pelagibacillus goriensis* Kim *et al.* 2007 to the genus *Terribacillus* as *Terribacillus goriensis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 2287-2291, 2008.

KURATA, A. *et al.* Hyaluronate lyase of a deep-sea *Bacillus niacini*. **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 277-284, 2015.

- KWON, S.-W. *et al.* *Sporosarcina koreensis* sp. nov. and *Sporosarcina soli* sp. nov., isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1694-1698, 2007a.
- KWON, S.-W. *et al.* *Bacillus niabensis* sp. nov., isolated from cotton-waste composts for mushroom cultivation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1909-1913, 2007b.
- LA DUC, M. T. *et al.* *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis*–*cereus*–*thuringiensis* group. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 383-394, 2004.
- LARREA-MURRELL, J. A. *et al.* Diversity and enzymatic potentialities of *Bacillus* sp. strains isolated from a polluted freshwater ecosystem in Cuba. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 28, 2018.
- LAY JR, J. O. MALDI-TOF Mass Spectrometry of Bacteria. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, p. 172-94, 2001.
- LEAL, M. L. F. **Desenvolvimento tecnológico de vacinas em Bio-Manguinhos/Fiocruz: uma proposta de gestão**. 2004. 148 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.
- LEE, C. S. *et al.* *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from forest humus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 281-286, 2010.
- LIU, B. *et al.* *Paenibacillus solani* sp. nov., isolated from potato rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4486-4491, 2016.
- LIU, Y. *et al.* Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015a.
- LIU, Y. *et al.* *Paenibacillus zae* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) seeds. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4533-4538, 2015b.
- LIU, X. *et al.* *Bacillus fungorum* sp. nov., a bacterium isolated from spent mushroom substrate. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1457-1462, 2020.
- LOGAN, N. A. *et al.* Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2114-2121, 2009.
- LU, J.; NOGI, Y.; TAKAMI, H. *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 2, p. 291-297, 2001.

LV, X. C. *et al.* Characterization of the dominant bacterial communities of traditional fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine by means of MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting, 16S rRNA gene sequencing and species-specific PCRs. **Food Control**, v. 67, p. 292-302, 2016.

MANASI; TIBREWAL, A; RAJESH, N.; RAJESH, V. Identification and Characterization of the microbial communities found in electronic industrial effluent and their potential for bioremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 379-387, 2018.

MANDAL, K. *et al.* Bioremediation of fipronil by a *Bacillus firmus* isolate from soil. **Chemosphere**, v. 101, p. 55-60, 2014.

MANGWANI, N. *et al.* Phenotypic switching in biofilm-forming marine bacterium *Paenibacillus lautus* NE3B01. **Current Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 648-656, 2014.

MARTINS, K. B. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF VITEK®MS and VITEK® 2 system for the identification of *Staphylococcus saprophyticus*. **Future Microbiology**, v. 13, n. 14, p. 1603-1609, 2018.

MARWA, N. *et al.* Characterizing the hypertolerance potential of two indigenous bacterial strains (*Bacillus flexus* and *Acinetobacter junii*) and their efficacy in arsenic bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 1117-1127, 2019.

MASSILAMANY, C. *et al.* Whole genomic sequence analysis of *Bacillus infantis*: defining the genetic blueprint of strain NRRL B-14911, an emerging cardiopathogenic microbe. **BMC genomics**, v. 17, n. 7, p. 511, 2016.

MATHEWS, S. L.; PAWLAK, J. J.; GRUNDEN, A. M. Isolation of *Paenibacillus glucanolyticus* from pulp mill sources with potential to deconstruct pulping waste. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 100-105, 2014.

MATHEWS, S. L.; PAWLAK, J.; GRUNDEN, A. M. Draft genome sequences of two strains of *Paenibacillus glucanolyticus* with the ability to degrade lignocellulose. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, p. e00423-16, 2016.

MEDEIROS L. M. **Criação da Bacterioteca de Bio-Manguinhos, Caracterização de Linhagens Bacterianas e Desenvolvimento de um Sistema Integrado de Identificação de Micro-Organismos e de Rastreamento de Fontes de Contaminação**. 2015. 261 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

MEENA, S. S. *et al.* Isolation and identification of *Bacillus megaterium* YB3 from an effluent contaminated site efficiently degrades pyrene. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 369-378, 2016.

MENDIS, H. C. *et al.* Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. **PloS One**, v. 13, n. 2, 2018.

MEHRSHAD, M. *et al.* *Bacillus halosaccharovorans* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 2776-2781, 2013.

MILANOVIĆ, V. *et al.* Insight into the bacterial diversity of fermentation woad dye vats as revealed by PCR-DGGE and pyrosequencing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 997-1004, 2017.

MOHKAM, M. *et al.* Identification of *Bacillus* probiotics isolated from soil rhizosphere using 16S rRNA, *recA*, *rpoB* gene sequencing and RAPD-PCR. **Probiotics Antimicrobial Proteins**, v. 8, n. 1, p. 8-18, 2016.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). **Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2010. v. 4. 496 p. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/ConceitosMetodos_volume4.pdf. Acesso em: 19 set. 2017.

MUNOZ, R. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF whole cell profiles to assess the culturable diversity of aerobic and moderately halophilic prokaryotes thriving in solar saltern sediments. **Systematic Applied Microbiology**, v. 34, p. 69-74, 2011.

MURSALIN, M. H. *et al.* S-layer Impacts the Virulence of *Bacillus* in Endophthalmitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 60, n. 12, p. 3727-3739, 2019.

NAGEL, M.; ANDREESEN, J. R. *Bacillus niacini* sp. nov., a nicotinate-metabolizing mesophile isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 134-139, 1991.

NAKAMURA, L. K. *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 224-226, 1984.

NAKAMURA, L. K.; ROBERTS, M. S.; COHAN, F. M. Note: Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: A proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1211-1215, 1999.

NAM, J.-H.; BAE, W.; LEE, D.-H. *Oceanobacillus caeni* sp. nov., isolated from a *Bacillus*-dominated wastewater treatment system in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1109-1113, 2008.

NGUYEN, N.-P.; WARNOW, P.; POP, M.; WHITE, B. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2016.

NICHOLSON, W. *et al.* Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Constituição da Organização Mundial da Saúde. **Documentos básicos**. 45. ed. 2006. Disponível em: https://www.who.int/governance/eb/who_constitution_sp.pdf. Acesso em: 03 abr.2020.

PACHECO, F. L. C.; PINTO, T. J. A. The Bacterial Diversity of Pharmaceutical Clean Rooms Analyzed by the Fatty Acid Methyl Ester Technique. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 64, p. 156-166, 2010.

PARTE, A. C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 1825-1829; 2018.

PARK, K. S. *et al.* Evaluation of the GenBank, EzTaxon, and BIBI services for molecular identification of clinical blood culture isolates that were unidentifiable or misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1792-1795, 2012.

PATEL, S.; GUPTA, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 406-438, 2020.

PATIL, U.; CHAUDHARI, A. Production of alkaline protease by solvent-tolerant alkaliphilic *Bacillus circulans* MTCC 7942 isolated from hydrocarbon contaminated habitat: process parameters optimization. **ISRN Biochemistry**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

PAVLOVIC, M. *et al.* Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 135-141, 2013.

PAZ, A. *et al.* Biotransformation of phenolic compounds by *Bacillus aryabhatai*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 10, p. 1671-1679, 2019.

PENKHRUE, W. *et al.* Response surface method for polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic accumulation in *Bacillus drentensis* BP17 using pineapple peel. **PloS One**, v. 15, n. 3, p. e0230443, 2020.

PETTERSSON, B. *et al.* *Bacillus siralis* sp. nov., a novel species from silage with a higher order structural attribute in the 16S rRNA genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2181-2187, 2000.

PETTI, C. A.; POLAGE, C. R.; SCHRECKENBERGER, P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6123-6125, 2005.

PINHO-GOMES, A. C. *et al.* Intraoperative diagnosis of mitral valve endocarditis secondary to *Paenibacillus provencensis*. **The Annals of The Royal College of Surgeons of England**, v. 99, n. 2, p. e54-e55, 2017.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 4. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2015.

PISOL, B. *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from different stages of traditional Malaysian tempeh production. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 358-364, 2015.

PONTE, C. Bio-Manquinhos 30 anos: a trajetória de uma instituição pública de ciência e tecnologia. **Cadernos de História da Ciência**, v. 3, n. 1, p. 35-138, 2007.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160 p.

RABINOVITCH, L.; PALMEIRA, M. L.; SILVA, S. M. A spontaneous Spo mutante of *Bacillus licheniformis* with increased respiratory metabolismo. **Revista de Microbiologia**, v. 6, n. 2, p. 47-49, 1975.

RAHI, P.; PRAKASH, O.; SHOUCHE, Y. S. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: challenges and scopes for microbial ecologists. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1359, 2016.

RAO, M. P. N. *et al.* Reclassification of *Bacillus aryabhatai* Shivaji et al. 2009 as a later heterotypic synonym of *Bacillus megaterium* de Bary 1884 (Approved Lists 1980). **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, p. 1-3, 2019.

RASKO, D. A. *et al.* Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005.

REWAK-SOROCZYŃSKA, J. *et al.* Biological activity of glycine and alanine derivatives of quaternary ammonium salts (QASs) against micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology** v. 69, n. 3, p. 212-220, 2019.

RODRIGUES, N. M. B. *et al.* The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Braz Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 132-138, 2017.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. *et al.* Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 4, p. 1-12, 2019.

RONZHEIMER, S. *et al.* The GbsR family of transcriptional regulators: functional characterization of the OpuAR repressor. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2536, 2018.

ROONEY, A. *et al.* Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 2429-2436, 2009.

ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Reclassification of *Paenibacillus durum* (formerly *Clostridium durum* Smith and Cato 1974) Collins *et al.* 1994 as a member of the species *P. azotofixans* (formerly *Bacillus azotofixans* Seldin *et al.* 1984) Ash *et al.* 1984. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 569-572, 1997.

ROUX, V.; FENNER, L.; RAOULT, D. *Paenibacillus provencensis* sp. nov., isolated from human cerebrospinal fluid, and *Paenibacillus urinalis* sp. nov., isolated from human urine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 682-687, 2008.

RUIZ-SÁNCHEZ, E. *et al.* Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. **Agrociencia**, v. 50, n. 2, p. 133-148, 2016.

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

SAGGU, S. K.; MISHRA, P. C. Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. **PloS One**, v. 12, n. 11, p. 1-18, 2017.

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

SAKHNO, N. G.; GUNAR, O. V. Microbial identification methods in pharmaceutical analysis: Comparison and evaluation. **Mathews Journal of Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2016.

SALOMON, M. V. *et al.* Rhizosphere associated bacteria trigger accumulation of terpenes in leaves of *Vitis vinifera* L. cv. Malbec that protect cells against reactive oxygen species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 295-304, 2016.

SAMPEDRO, A.; MENDIOLA, J. C.; MARTÍNEZ, L. A. MALDI-TOF Commercial Platforms for Bacterial Identification. *In*: COBO, F. (ed.). **The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology**. Cambridge, Ed. Academic Press, 2018. p. 47-57.

SANDLE, T. A review of cleanroom microflora: types, trends, and patterns. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 65, n. 4, p. 392-403, 2011.

SANDLE, T. Characterizing the microbiota of a pharmaceutical water system-a metadata study. **SOJ Microbiology and Infectious Disease**, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2015.

SCHELDEMAN, P. *et al.* *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 885-891, 2004.

SEILER, H. *et al.* *Bacillus gottheilii* sp. nov., isolated from a pharmaceutical manufacturing site. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 867-872, 2013.

SELDIN, L.; DUBNAU, D. Deoxyribonucleic acid homology among *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus azotofixans*, and other nitrogen-fixing *Bacillus* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, n. 2, p. 151-154, 1985.

SELVARAJ, S.; VYTILA, R. M. Solid state fermentation of *Bacillus gottheilii* M2S2 in laboratory-scale packed bed reactor for tannase production. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 9, p. 799-807, 2018.

SENA, C. M. S. **Estudo do perfil microbiológico da seção de envasamento e acondicionamento de soros e vacinas desenvolvidos no Instituto Butantan**. 2014. 68 f. Monografia (Programa de Aperfeiçoamento Profissional) – Secretaria de Estado de Saúde, São Paulo, 2014.

SERRAINO, A. *et al.* Isolation of glucosidase and phospholipase positive *Bacillus circulans* on ALOA medium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 244-246, 2011.

SEUYLEMEZIAN, A. *et al.* Development of a custom MALDI-TOF MS database for species-level identification of bacterial isolates collected from spacecraft and associated surfaces. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 780, 2018.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. **Biotechnology Reports**, v. 11, p. 27-35, 2016.

SHIDA, O. *et al.* Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus gluconolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 289-298, 1997.

SILVA, F. R. M. *et al.* System of Sensors and Actuators for the Production of Water Used in the Manufacture of Medicines. **Sensors**, v. 19, n. 20, p. 4488, 2019.

SINGH, P. *et al.* Extracellular synthesis of silver and gold nanoparticles by *Sporosarcina koreensis* DC4 and their biological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 86, p. 75-83, 2016.

SOARES, M. B. *et al.* Behavior of different *Bacillus* strains with claimed probiotic properties throughout processed cheese (“requeijão cremoso”) manufacturing and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 307, p. 108288, 2019.

SOUZA, M.O. **Caracterização fenotípica e molecular de *Bacillus* sp. e gêneros relacionados provenientes de análises de produtos farmacêuticos**. 2011. 161 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

STAROSTIN, K. V. *et al.* Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. **Scientific Reports**, v. 5, p. 16989, 2015.

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

STING, R.; EISENBERG, T.; HRUBENJA, M. Rapid and reasonable molecular identification of bacteria and fungi in microbiological diagnostics using rapid real-time PCR and Sanger sequencing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 159, p. 148-156, 2019.

SULAIMAN, I. M. *et al.* Identification of *Lysinibacillus fusiformis* Isolated from Cosmetic Samples Using MALDI-TOF MS and 16S rRNA Sequencing Methods. **Journal of AOAC International**, v. 101, n. 6, p. 1757-1762, 2018.

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

SUWANTARAT, N. *et al.* Practical utility and accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Corynebacterium* species and other medically relevant coryneform-like bacteria. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 145, n. 1, p. 22-28, 2016.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

THE UNITED States Pharmacopeia 43. National Formulary 38. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2020. Disponível em: <http://www.uspnf.com/uspnf/login>. Acesso em: 13 abr. 2020.

TIRUMALAI, M. R. *et al.* *Bacillus safensis* FO-36b and *Bacillus pumilus* SAFR-032: a whole genome comparison of two spacecraft assembly facility isolates. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1-16, 2018.

ULRICH, S. *et al.* Manfred Gareis Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. **Food Microbiology**, v. 82, p. 75-81, 2019.

URWYLER, S. K.; GLAUBITZ, J. Advantage of MALDI-TOF-MS over biochemical-based phenotyping for microbial identification illustrated on industrial applications. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 130-137, 2016.

VANITHA, M. U. *et al.* Microbial fuel cell characterisation and evaluation of *Lysinibacillus macroides* MFC02 electrigenic capability. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 91, 2017.

VETTER, V. *et al.* Understanding modern-day vaccines: what you need to know. **Annals of Medicine**, v. 50, n. 2, p. 110-120, 2018.

VIDHYALAKSHMI, R. *et al.* *Bacillus circulans* exopolysaccharide: Production, characterization and bioactivities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 405-414, 2016.

VILLALOBOS, S. S. *et al.* *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) in the Yaqui Valley, Mexico. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 3939-3945, 2019.

VOS, M. *et al.* A comparison of rpoB and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. **PloS One**, v. 7, n. 2, 2012.

WANG, L.-T. *et al.* Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1846-1850, 2007.

WARNKEN, M. B. *et al.* Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 21-31, 2012.

WEI, S. *et al.* Molecular discrimination of *Bacillus cereus* group species in foods (lettuce, spinach, and kimbap) using quantitative real-time PCR targeting *groEL* and *gyrB*. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 312-320, 2018.

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

WOO, P. C. Y. *et al.* Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 10, p. 908-934, 2008.

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

WU, X. *et al.* Genome Sequencing and Comparative Genomic Analyses of *Lysinibacillus pakistanensis* LZH-9, a Halotolerant Strain with Excellent COD Removal Capability. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 716, 2020.

YADAV, S.; DUBEY, S. K. Cellulose degradation potential of *Paenibacillus lautus* strain BHU3 and its whole genome sequence. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 124-131, 2018.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal iniciadores and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 1104-1109, 1995.

YIFANG, C. *et al.* Toxins and mobile antimicrobial resistance genes in *Bacillus* probiotics constitute a potential risk for One Health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, p. 121266, 2020.

YOON, J.-H. *et al.* *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of th. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1079-1086, 2001.

YOON, S. H. *et al.* Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613-1617, 2017

YOUSEF, N.; MAWAD, A.; ABEED, A. Enhancement the cellulase activity induced by endophytic bacteria using calcium nanoparticles. **Current Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 346-354, 2019.

YUAN, L. *et al.* Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, V. 1, p. 1-17, 2019.

ZHANG, J. *et al.* *Bacillus oceanisediminis* sp. nov., isolated from marine sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 2924-2929, 2010.

ZHANG, J. *et al.* Two selenium tolerant *Lysinibacillus* sp. strains are capable of reducing selenite to elemental Se efficiently under aerobic conditions. **Journal of Environmental Sciences**, v. 77, p. 238-249, 2019.

ZHOU, S. *et al.* *Ureibacillus defluvii* sp. nov., isolated from a thermophilic microbial fuel cell. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1617-21, 2014.

ANEXO A – POP PARA DIFERENCIAÇÃO DE BACTÉRIAS ESPORULADAS



Ministério da Saúde

Fiocruz

Fundação Coordenação de Defesa de Saúde



Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

Bio-Manguinhos

INSTRUÇÃO DE TRABALHO

TÍTULO: VISUALIZAÇÃO DE ESPOROS BACTERIANOS

UNIDADE LABORADORA:
SEPIN

NÚMERO: 10933

1- ALTERAÇÕES

Revisão	Alterações
00	Emissão inicial.

2- OBJETIVOS

Descrever a metodologia para estimular a produção de esporos em bastonetes Gram-positivos esporulados, de modo a diferenciar bastonetes Gram-positivos esporulados daqueles não produtores de esporos.

3- CAMPO DE APLICAÇÃO

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

4- SIGLAS

SEPIN - Seção de Esterilidade, Processos e Insumos

5- REFERÊNCIAS

- DI 4990 - Coloração de Gram
 DI 0182 - Identificação de Contaminantes
 MOLINARO EM, CAPUTO LFG, AMENDONEIRA MRR (Org.). Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Vol. 4. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2010. 486 p. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/loc/media/Conceitos%20e%20Métodos_volumes4.pdf>. Acesso em: 18 set.2017
- RABINOVITCH L, PALMEIRA ML, SILVA MM. A spontaneous Spo mutante of *Bacillus licheniformis* with increased respiratory metabolism. Rev. Microbiol. Ser. B, n. 2, p. 47-52, 1975

6- DEFINIÇÕES

Não aplicável

7- PRÉ-REQUISITOS

7.1- Documentos Internos

- DI 4990 - Coloração de Gram
- DI 0182 - Identificação de Contaminantes

7.2- Materiais e Equipamentos

- Alça bacteriológica
- Balança analítica
- Biorreator
- Caixa de segurança biológica
- Incubadora biológica (32,5 ± 2,5°C)
- Lâminas de vidro
- Luvas descartáveis
- Luvas estéreis
- Microscópio óptico com aumento de 1000X
- Óleo de imersão



INSTRUÇÃO DE TRABALHO

- Placas de Petri descartáveis
- Tubos de vidro com rosca

7.3- Meios de cultura e soluções

- Ágar nutriente metais (0,8% de caldo nutriente; 0,5% de NaCl; 0,001% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,001% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$; 1,5% de agar)
- Solução de verde malaquita a 5%
- Solução de safranina

8- PROCEDIMENTOS

8.1- Preparo da solução de verde malaquita a 5%

Pesar 2,5 g do corante verde malaquita em balança semi-analítica, transferir para frasco limpo.

Adicionar 50 mL de água destilada.

Misturar e deixar em repouso uma noite para dissolver.

8.2- Semeadura em ágar nutriente metais

Após realização de coloração de Gram e observação de bastonete Gram-positivo ao microscópio óptico (DI 4990), retirar uma alçada da colônia e semear em placa contendo ágar nutriente metais, para que haja a produção de esporos.

Incubar em estufa bacteriológica a $32,5 \pm 2,5^\circ C$ por 24 horas.

8.3- Coloração para esporos com verde malaquita

Após o período de incubação, transferir uma pequena porção da colônia para lâmina de vidro contendo uma gota de solução salina ou água destilada.

Homogeneizar por alguns segundos e deixar secar.

Fixar a lâmina com o calor, passando de quatro a seis vezes pela chama do bico de Bunsen.

Cobrir o esfregaço com a solução de verde malaquita a 5%.

Cobrir a lâmina com verde malaquita e aproximar de um chama, até que o corante desprenda calor, mas sem permitir que o corante evapore.

Atestar do fogo, após 1 a 2 minutos, repetir a operação por 3 a 4 vezes.

Alternativa: aquecer a água em um bôquer, até a emissão de vapores.

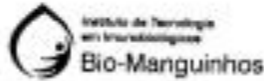
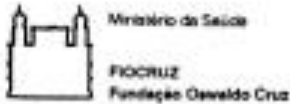
Colocar a lâmina sobre este bôquer, mantendo o corante aquecido por 5 min.

Lavar cuidadosamente a lâmina em água

Adicionar solução de safranina por 30 segundos.

Lavar e secar.

Observar ao microscópio com objetiva de imersão.



INSTRUÇÃO DE TRABALHO

8.4- Interpretação dos resultados

Os esporos bacterianos apresentarão coloração verde e as células vegetativas coloração

9- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS

SEPIN.

9.1- UD incluídas nesta revisão

Não aplicável.

9.2- UD excluídas nesta revisão

Não aplicável.

10- TREINAMENTO

Teórico e prático.

10.1- Multiplicadores



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

11- ANEXOS

Não aplicável.

CÓPIA NÃO CONTROLADA

ANEXO B – POP PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR ANÁLISE DO GENE 16S rRNA

 Ministério da Saúde PROCUR Fundação Desempenho	 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos	MÉTODO ANALÍTICO
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)		
UO RESP.: DEQUA LACOM/SEPIN	Número: MTA0088_000MAN	Visualização PDF

1- OBJETIVO

Definir a metodologia de identificação de micro-organismos utilizando kits comerciais que amplificam e sequenciam regiões específicas do DNA microbiano. Este procedimento se aplica à utilização de 3 kits: MicroSEQ™ 500 16S rDNA Identification (para a identificação de bactérias a partir do sequenciamento dos 500 primeiros pares de base do gene rDNA 16S); MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA Identification (para a identificação de bactérias a partir do sequenciamento do gene 16S rDNA completo); e Kit MicroSEQ™ D2 rDNA Fungal Identification (para a identificação de fungos filamentosos e leveduras a partir do sequenciamento do gene D2).

2- ABRANGÊNCIA

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

3- SIGLAS

°C	- grau Celsius
∞	- infinito
µL	- microlitro
%	- Porcentagem
ATCC	- American Type Culture Collection
BDA	- Agar Batata-Dextrose
CSB II	- Gabinete de Segurança Biológica classe II
DI	- Documento Interno
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
ML	- mililitro
Mm	- milímetro
pB	- par de Base
PCR	- Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PRO	- Protocolo
RPM	- Rotações por Minuto
TSA	- Agar Tripticaseína Soja
TSB	- Caldo Caseína Soja

4- DEFINIÇÕES

Não aplicável

5- CUIDADOS E EPI



O método analítico deverá ser desenvolvido em cabina de segurança biológica.
O técnico deverá utilizar luvas descartáveis estéreis.

8- MÉTODO / TESTES / PROCEDIMENTO

8.1 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES ESPECÍFICAS DO DNA MICROBIANO

8.1.1 Materiais e Equipamentos



- Alça descartável estéril 10µL
- Becker para descarte
- Caixa com divisórias para conservação dos criotubos
- Criotubos de capacidade 2mL
- Estante para tubos
- Luvas estéreis
- Luvas de procedimento (não estéreis) sem talco

 <p>Ministério da Saúde PROCEL Fundação Coordesta/2004</p>	 <p>Instituto de Tecnologia em Microbiologia e Bio-Manguinhos</p>	MÉTODO ANALÍTICO
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)		
UO RESP.: DEQUA.LACOM/SEPIN	Número: MTA0088_000MAN	Visualização PDF

- Micropipeta graduável de 10µL a 200µL
- Micropipeta graduável de 200µL a 1000µL
- Ponteiros descartáveis e estéreis para 10µL
- Ponteiros descartáveis e estéreis para 200µL
- Ponteiros descartáveis e estéreis para 1000µL
- Microtubos de 1,5mL (tipo Eppendorf)
- Microtubos de 0,2mL (tipo MicroAmp)
- Placas de 96 poços
- Kit de extração de DNA PrepMan Ultra Applied Biosystems (código: 431893)
- Micro SEQ™ ID Sequencing Clean-up Cartridges (colunas de purificação) ou Micro SEQ™ ID Purification Combo Kit with clean-up cartridges (colunas de purificação + ExoSAP-IT)
- Micro SEQ™ ID Sequencing Clean-up Plates (placas de purificação) ou Micro SEQ™ ID Purification Combo Kit with clean-up plates (placas de purificação + ExoSAP-IT)
- Saco descartável autoclavável para descarte de resíduo de material com símbolo de risco biológico
- Abraçadeira
- Coletor de perfuro cortante
- Agitador de tubos (Vortex)
- Analisador genético 3500
- Estufa bacteriológica com temperaturas de 20°C a 25°C
- Estufa bacteriológica com temperaturas de 30°C a 35°C
- Cabine de segurança biológica classe II
- Cabine de preparo de reagentes para amplificação
- Cabine de amplificação
- Freezer a -20°C (-17,5°C ± 2,5°C ou -15°C a -20°C)
- Geladeira 2°C a 8°C
- Mini centrífuga
- Recipiente para gelo em cooler
- Banho-seco a 100°C
- Termociclador

8.1.2 Meios de Cultura, Células, Reagentes, Soluções, Materiais de Referência e/ou Controles Internos

- Cepas oriundas do Monitoramento ambiental de áreas controladas
- Cepas oriundas do Monitoramento de água
- Cepas oriundas da Análise de biocarga
- Cepas oriundas do Teste de esterilidade
- Cepas oriundas da Análise de produtos e insumos
- Micro-organismos oriundos da atividade de Identificação de Contaminantes que não tenham sido identificados satisfatoriamente pelas metodologias utilizadas na rotina da SEPIN
- Alcool 70%
- Agar Tripticaseína Soja
- Agar Batata-Dextrose
- Água livre de nucleases
- Caldo Caseína Soja
- Gel Agarose 2%
- Gelo
- Enzima ExoSAP-IT
- Formamida HI-DI™
- Kit MicroSEQ™ 500 16S rDNA PCR Kit (Applied Biosystems - código: 4348228)
- Kit MicroSEQ™ 500 16S rDNA Sequencing Kit (Applied Biosystems - código: 4346480)
- Kit MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA PCR Kit (Applied Biosystems - código: 4349155)
- Kit MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA Sequencing Kit (Applied Biosystems - código: 4347484)
- Kit MicroSEQ™ D2 rDNA Fungal PCR Kit (Applied Biosystems - código: 4349153)
- Kit MicroSEQ™ D2 rDNA Fungal Sequencing Kit (Applied Biosystems - código: 4347481)

 <p>Ministério da Saúde PROCEL Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior</p>	 <p>Instituto de Tecnologia em Microbiologia e Bio-Manguinhos</p>	MÉTODO ANALÍTICO
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)		
UO RESP.: DEQUA LACOM/SEPIM	Número: MTA0088_000MAN	Visualização PDF

Os meios de cultura devem ser solicitados à SEMEC juntamente com o protocolo Solicitação de Meios de Cultura e/ou Soluções.

8.1.3 Descrição do Método/Teste/Procedimento

De acordo com o tipo de micro-organismo e com a dificuldade de identificação, escolher um dos três kits: MicroSEQ™ 500 16S rDNA Identification, MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA Identification e MicroSEQ™ D2 rDNA Fungal Identification. Os kits são compostos por duas caixas distintas: uma delas, referente aos reagentes da PCR e outra, referente aos reagentes do sequenciamento.

- Preparo das amostras

Preparar a Cabine de Segurança Biológica classe II.
Registrar em ficha de Log-Book Simplificado.

As amostras devem ter sido isoladas em placas de TSA (bactérias e leveduras) ou BDA (fungos), ou devem estar em caldo (TSB). Não deve ser utilizado Agar Sangue, nem outro meio com cromógenos. Deve-se ter cuidado com pigmentos de colônias fúngicas, por isso, utilizar colônias recentes.

- Extração do DNA

Identificar os microtubos de 1,5mL. Em uma cabine exclusiva para preparo de reagente de amplificação, distribuir alíquotas de 100µL do reagente PrepMan Ultra.

Se a cultura estiver em placa, com o auxílio de uma alça bacteriológica, pegar uma porção da cultura (2 a 3 mm) e transferir para o respectivo tubo com o reagente.



Se a cultura estiver em caldo (TSB), transferir 1mL para microtubo e centrifugar por 2 minutos na velocidade máxima (14.000 rpm). Desprezar o sobrenadante e adicionar 100µL do reagente PrepMan Ultra.

Agitar os tubos em agitador de tubos (vortex) por 10 a 30 segundos e deixar por 10min a 100°C em banho seco.

Centrifugar por três minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente, em mini centrifuga.

Identificar outra fileira de microtubos. Em uma cabine exclusiva para preparo de reagente de amplificação, distribuir alíquotas de 495µL de água estéril (nuclease-free water) nos tubos. Transferir 5µL de cada amostra (sobrenadante) para os tubos com 495µL para realizar uma diluição 1:100. Para amostras com menos biomassa, pode-se diluir menos (ex.: 1:20). A diluição mínima recomendada pelo fabricante é de 1:10.

O DNA extraído pode ser armazenado de -15°C a -25°C por até um mês.

 Ministério da Saúde PROCRUZ Fundação Crescimento Criança		 Instituto de Tecnologia em Microbiologia e Bio-Manguinhos		MÉTODO ANALÍTICO	
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)					
UO RESP.: DEQUA LACOM/SEPIN		Número: MTA0088_000MAN		Visualização PDF	

A Figura 1 apresenta um esquema referente às etapas de extração do DNA.

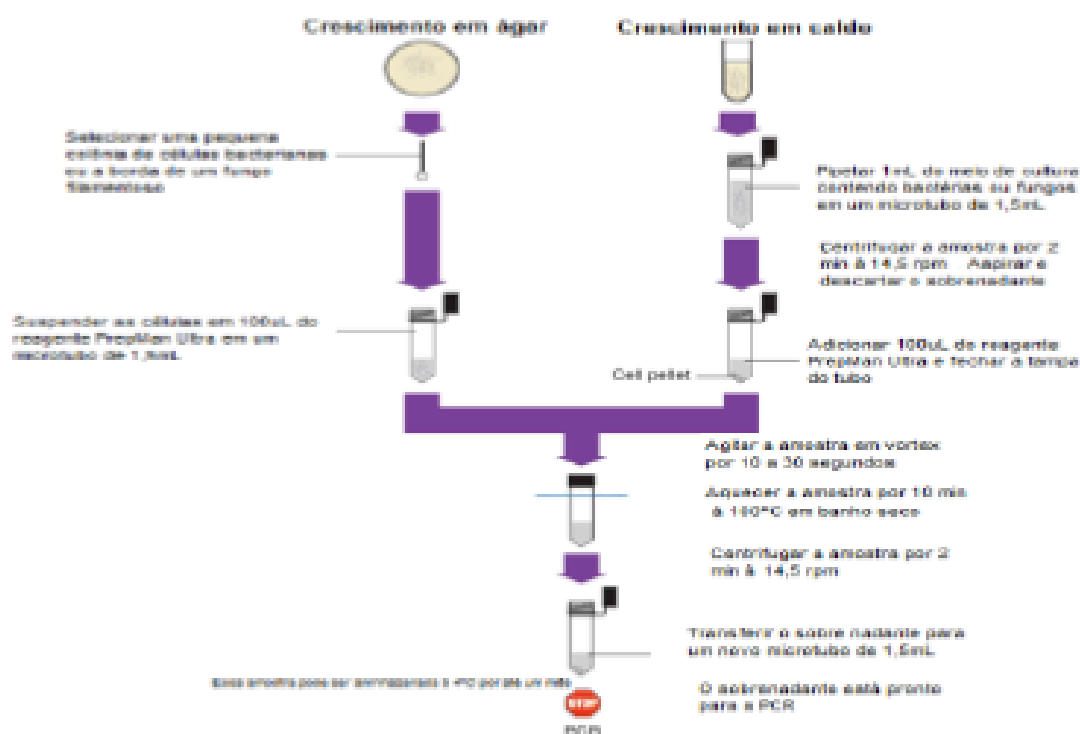




Figura 1

- Amplificação

Em uma cabine exclusiva para preparo de reagente de amplificação, distribuir 15µL do reagente PCR Master Mix (kit PCR) nos tubos tipo MicroAmp (0,2mL). Transferir a estante com estes tubos para outra sala e distribuir 15µL de cada amostra na seguinte ordem: **CONTROLE NEGATIVO** (presente no kit), **AMOSTRAS** (na ordem numérica) e **CONTROLE POSITIVO** (presente no kit). Homogeneizar a amostra com o auxílio da micropipeta, antes de inserir o volume no tubo. Volume final igual a 30µL. Fazer um spin manual nos tubos, para garantir a mistura de todo o conteúdo.

OBS: Caso o kit utilizado seja o MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA PCR kit, haverá 3 tubos de reagentes: PCR Master Mix 1, 2 e 3. Serão realizadas 3 reações de PCR para cada amostra, pois cada reagente amplificará uma porção do gene 16S rDNA.

 Ministério da Saúde PROCEL Fundação Coordenação de Ação		 Instituto de Tecnologia em Alimentos Bio-Manguinhos	MÉTODO ANALÍTICO
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)			
UO RESP.: DEQUA LACOM/SEPIN	Número: MTA0088_000MAN	Visualização PDF	

Inserir os tubos em termociclador. Selecionar o programa específico no visor do aparelho, conforme o gene que se deseja amplificar.

Para a amplificação do gene 16S rDNA (bactérias):

HOLD	95°C/10 minutos	
30 CICLOS	DESNATURAÇÃO	95°C/30 segundos
	ANELAMENTO	60°C/30 segundos
	EXTENSÃO	72°C/45 segundos
HOLD	72°C/10 minutos	
ETAPA FINAL	4°C/∞	

Para a amplificação do gene D2 (fungos e leveduras):

HOLD	95°C/10 minutos	
35 CICLOS	DESNATURAÇÃO	95°C/30 segundos
	ANELAMENTO	53°C/30 segundos
	EXTENSÃO	72°C/1 minuto
HOLD	72°C/10 minutos	
ETAPA FINAL	4°C/∞	

OBS 1: Caso seja necessário, pode-se aumentar o número de ciclos de amplificação, para que se obtenha maior quantidade de DNA amplificado.

O DNA amplificado (amplicon) pode ser armazenado de -15°C a -25°C por até 6 meses.

OBS 2: A amplificação do DNA pode ser confirmada em gel de Agarose 2%, aplicando-se 5µL da amostra. As seguintes bandas deverão ser observadas, conforme o kit utilizado:

- MicroSEQ™ 500 16S rDNA PCR kit – uma banda contendo 460 a 560 pb.
- MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA PCR kit – uma banda contendo de 460 a 560 pb e duas bandas contendo de 700 a 800 pb.
- MicroSEQ™ D2 rDNA Fungal PCR kit – uma banda contendo de 300 a 500 pb.

- Purificação do amplicon

Pegar nova fileira de tubos MicroAmp e, para cada amostra, separar dois tubos: identificar um deles como FORWARD (F) e o outro, como REVERSE (R).



OBS: Caso o kit utilizado seja o MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA, deverão ser separados 3 tubos: um, como F e outro, como R para cada amplicon (1, 2 e 3).

Distribuir 2µL da enzima EXO-SAP (exonuclease 1 com fosfatase alcalina) em cada um. Manter a enzima, durante todo o procedimento, em recipiente com gelo em cooler. Após a utilização da enzima, armazená-la rapidamente em freezer.

Distribuir 5µL de cada amostra em cada tubo (F e R). Volume final igual a 7µL. Fazer um spin manual nos tubos, para garantir a mistura de todo o conteúdo.

Inserir os tubos F e R em termociclador. Selecionar o programa específico no visor do aparelho, conforme a tabela abaixo:

PURIFICAÇÃO	37°C/15 minutos
INATIVAÇÃO DA ENZIMA	80°C/15 minutos
ETAPA FINAL	4°C/∞

 Ministério da Saúde PROCELUT Fundação Desempenho	 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos	MÉTODO ANALÍTICO
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)		
UO RESP.: DEQUA LACOM/SEPIN	Número: MTA0068_000MAN	Visualização PDF

- Sequenciamento

Inserir 13µL do reagente de sequenciamento F no tubo com amplicon F e 13µL do reagente de sequenciamento R no tubo com amplicon R. Volume final igual a 20µL por tubo (F e R). Fazer um spin manual nos tubos, para garantir a mistura de todo o conteúdo.

OBS: Caso o kit utilizado seja o MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA Sequencing Kit, haverá 6 reagentes diferentes: 1F e 1R, 2F e 2R, 3F e 3R. Para cada amostra, serão utilizados 6 tubos.

Inserir os tubos em termociclador e selecionar programa específico (descrito abaixo):

25 CICLOS	DENATURAÇÃO	95°C/10 segundos
	ANELAMENTO	50°C/5 segundos
	EXTENSÃO	60°C/4 minutos
ETAPA FINAL	4°C/∞	

- Purificação do produto de sequenciamento

Podem ser utilizadas colunas para purificação (Micro SEQ™ ID Sequencing Clean-up Cartridges) ou placas para purificação (Micro SEQ™ ID Sequencing Clean-up Plates). Centrifugar por cerca de 3 minutos a 3000 rpm para desidratar as colunas.

OBS: A placa deve ser utilizada, quando forem manipuladas muitas amostras, pois a mesma possui 96 colunas de purificação, evitando assim, o desperdício.

Transferir as colunas desidratadas para outro microtubo seco. Caso sejam utilizadas placas de purificação, substituir o suporte contendo a água retirada após centrifugação por suporte seco.

Transferir 20µL do produto de sequenciamento para a coluna ou um dos poços da placa de purificação. Inserir o volume bem no meio da coluna, sem encostar no gel (O GEL NÃO PODE SER ROMPIDO).

Centrifugar por 5 minutos a 3000 rpm. Em seguida, descartar a coluna ou a placa utilizada.

O produto do sequenciamento purificado pode ser armazenado de -15°C a -25°C por até uma semana.

- Leitura do produto de sequenciamento

Preencher o protocolo Mapa para placas de 96 poços de acordo com a ordem das amostras a serem inseridas na placa. Organizar as amostras, conforme a seguinte ordem: 1ª coluna, 2ª coluna, etc.; controle negativo F, controle negativo R, amostra F, amostra R, controle positivo F e controle positivo R.

Transferir 15µL de formamida HI-DI™ para cada um dos poços da placa que serão utilizados. Em seguida, transferir 15µL do volume centrifugado de cada amostra para a placa de 96 poços, conforme o protocolo Mapa para placas de 96 poços preenchido na etapa anterior. Preencher os poços vazios das colunas utilizadas com 15µL de água estéril. Encalçar a septa sobre a placa (estrutura de borracha utilizada para fechar a placa). Alinhar os furos da septa com os poços da placa e então pressioná-la firmemente sobre a placa. Centrifugar a placa rapidamente. Quando a velocidade atingir 800 rpm, a centrífuga pode ser desligada.

Encalçar a placa no adaptador (fixador e base) do analisador, conforme a Figura 2:

		MÉTODO ANALÍTICO
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)		
UO RESP.: DEQUA LACOM/SEPIN	Número: MTA0088_000MAN	Visualização PDF

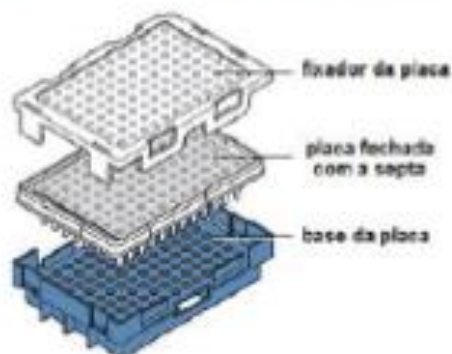


Figura 2

- Inserção da(s) placa(s) no analisador genético

Ligar o computador, sem fazer o login.

Ligar o sequenciador e aguardar alguns minutos até a acender a luz verde do equipamento.

Fazer o login no Windows e aguardar alguns minutos até que o programa Data Collection seja completamente carregado (observar as mensagens no canto inferior direito da tela).

Fazer o login no programa Data Collection do Analisador Genético 3500.

Na tela "Dashboard", clicar na opção "Pre-Heat the Oven" para realizar o pré-aquecimento do forno configurando a temperatura a 50°C. Clicar em "Start Pre-Heat".

Em seguida, na tela "Dashboard", selecionar "Create Plate from Template" (Figura 3).



Figura 3

Na opção "New Plate", clicar em "Create new plate", para configurar uma nova placa ou em "Create new plate from template", caso se queira aproveitar o modelo existente (Figura 4).



Figura 4

 Ministério da Saúde PROCEL Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior		 Instituto de Tecnologia em Microbiologia e Bio-Manguinhos		MÉTODO ANALÍTICO	
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)					
UO RESP.: DEQUA LACOM/3EPIN		Número: MTA0088_000MAN		Visualização PDF	

Na tela "Open Plate Template From Library", escolher a opção desejada (Figura 5).

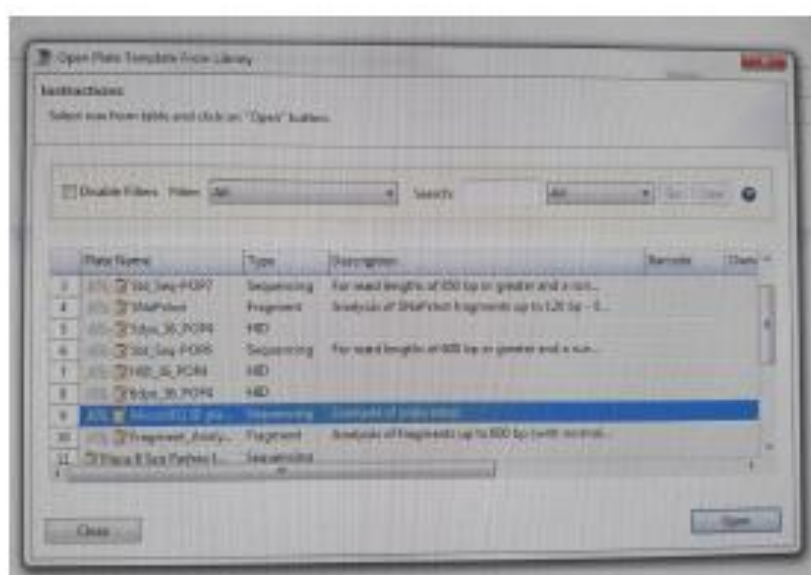


Figura 5

Será aberta a tela a seguir (Figura 6).





 Ministério da Saúde PROCELUT Fundação Coarabio-Grax		 Instituto de Tecnologia em Alimentos Bio-Manguinhos	MÉTODO ANALÍTICO
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)			
UO RESP.: DIEGUA LACOM/SEPIN	Número: MTA0088_000MAN	Visualização PDF	

Figura 6

Preencher a nome da placa (como padrão, deve ser inserida a data do teste) e verificar as opções selecionadas para o tipo de placa, comprimento do capilar e polímero. O preenchimento deverá ser de acordo com a Figura 6.

Clicar em "Assign Plate Contents" no final da tela (Figura 7).

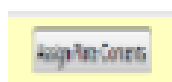


Figura 7

Será aberta a tela para adição de amostras (posições da placa de teste) conforme a Figura 8. Clicar na opção "Table View".

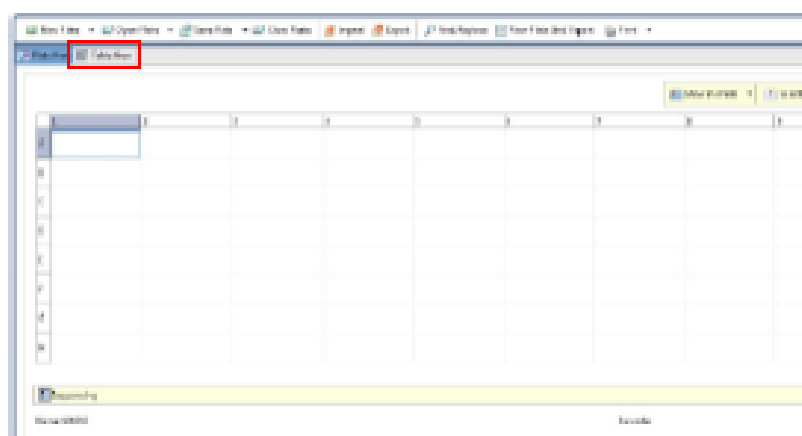




Figura 8

Digitar as informações das amostras e dos controles, conforme previamente preenchido no protocolo Mapa para placas de 96 poços. Cadastrar as amostras na mesma ordem em que foram adicionadas na placa de teste, considerando as reações *Forward* e *Reverse* para cada amostra e controles, quando aplicável.

Habilitar as opções pré-definidas neste template para "Assay", "Name Conventions" e "Results Groups", conforme a Figura 9.

 Ministério da Saúde PROCEL Fundação Especial de Ceat		 Instituto de Tecnologia em Alimentos Bio-Manguinhos		MÉTODO ANALÍTICO	
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)					
UO RESP.: DEQUA LACOM/SEPIN		Número: MTA0088_000MAN		Visualização PDF	

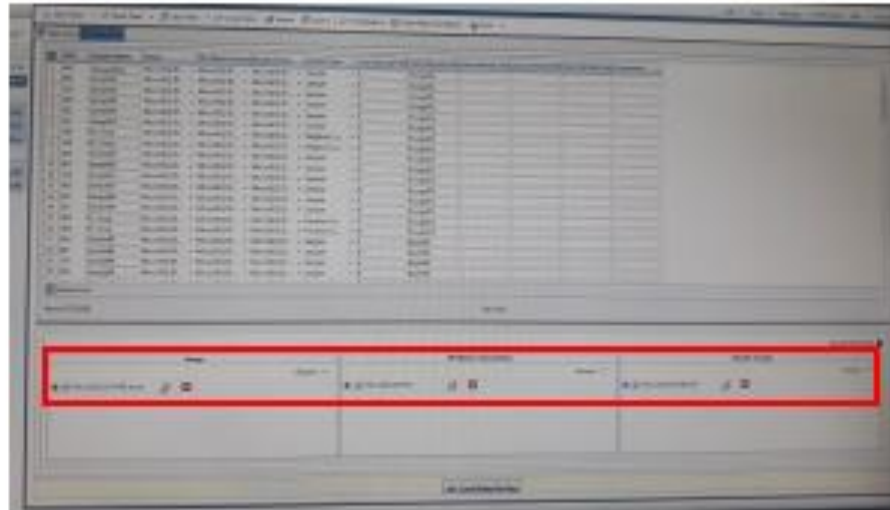


Figura 9

Clicar em "Save Plate" e depois em "Save" (Figura 10)

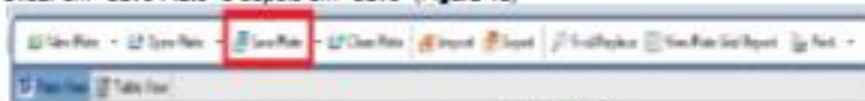


Figura 10

Clicar no botão "Tray" do Analisador Genético 3500. Quando o carreador de amostras (autosampler) se deslocar para a frente, abrir a porta do equipamento e posicionar a placa com os rótulos virados para frente (porta do equipamento), conforme a Figura 11.



Figura 11

Fechar a porta do equipamento. Após o carreador de amostras retornar à posição inicial, clicar em "Link Plate for Run" no final da tela, conforme a Figura 12.

 Ministério da Saúde PNDOLIZ Fundação Oswaldo Cruz	 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos	MÉTODO ANALÍTICO
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)		
UO RESP.: DEQUA LACOM/SEPIN	Número: MTA0088_000MAN	Visualização PDF

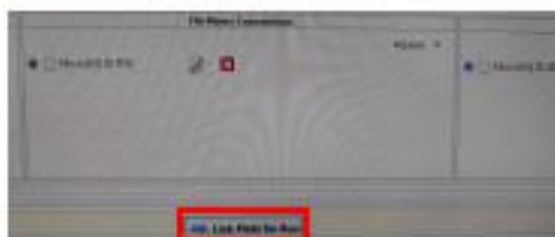




Figura 12

Para iniciar a corrida é necessário que a placa já esteja no equipamento. Clicar em "Start Run" na tela referente à corrida, conforme a Figura 13.

 Ministério da Saúde PROCEL Fundação Coagula/Geia	 Instituto de Tecnologia em Microbiologia Bio-Manguinhos	MÉTODO ANALÍTICO
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE FUNGOS ISOLADOS NA ROTINA A PARTIR DO KIT MICROSEQ (LIFE TECHNOLOGIES)		
UO RESP.: DEQUA.LACOM/SEPIN	Número: MTA0088_000MAN	Visualização PDF

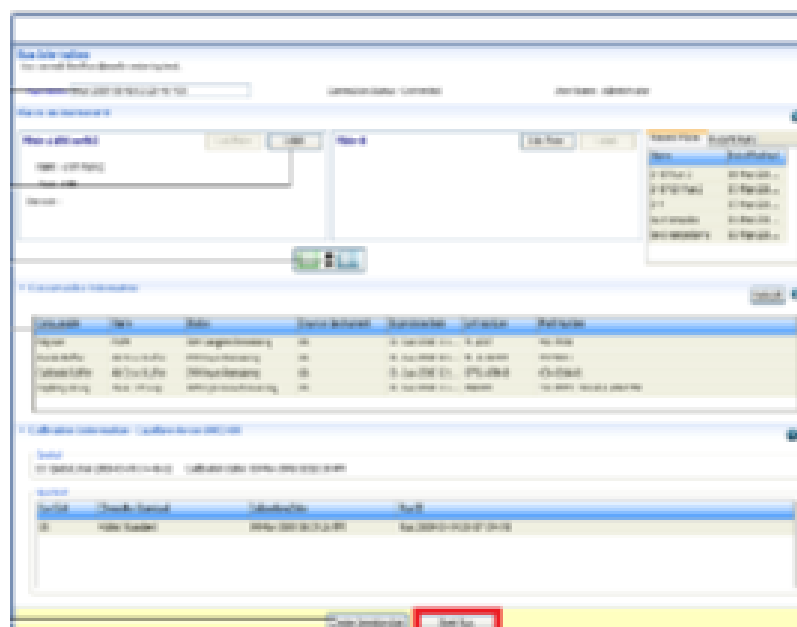


Figura 13

OBS: O equipamento permite que duas placas sejam inseridas por corrida. Caso seja necessária a inserção da segunda placa, cadastrar nova placa, conforme demonstrado a partir da Figura 3.

O material a ser descartado será encaminhado para a SEPRM, juntamente com a Ficha de Descarte de Resíduos de Serviço de Saúde (RSS) e descontaminação de material retornável em saco para descarte de resíduo de material biológico fechado com abraçadeira e solicitado pelo sistema SEPRM – Solicitação de Tratamento de Material por SOS (Portal de Bio-Manguinhos > Página Inicial > Serviços > Solicitações de Serviços > SEPRM – Solicitação de Tratamento de Material).

O material perfuro cortante deverá ser descartado em coletor destinado para esse fim e encaminhado em saco para descarte de resíduo de material biológico fechado com abraçadeira e solicitado pelo sistema SEPRM – Solicitação de Tratamento de Material por SOS (Portal de Bio-Manguinhos > Página Inicial > Serviços > Solicitações de Serviços > SEPRM – Solicitação de Tratamento de Material).

8.1.4 Análise dos Resultados

Não aplicável

8.1.6 Critério de Validade do Teste

Não aplicável

8.1.8 Referência (s) do Método/Teste

Manuais dos kits MicroSeq (Life Technologies)

APÊNDICE A – LINHAGENS ISOLADAS EM BIO-MANGUINHOS

Quadro 7 - Linhagens isoladas em Bio-manguinhos identificadas por MALDI-TOF MS antes e depois da ampliação da base de dados do programa Saramis.

Linhagens Isoladas em Bio-Manguinhos	Resultados de Identificação por MALDI-TOF MS	
	Antes da Ampliação da BD	Após a Ampliação da BD
B019/16	<i>Bacillus pumilus</i> (79,2%)	<i>Bacillus pumilus</i> group (99,9%)
B083/16	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (94,5%)	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (99,9%)
B104/16	<i>Paenibacillus</i> spp. (86,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (92,8%)
B135/16	<i>Bacillus megaterium/coagulans/amyloliquefaciens</i> (84,0%)	<i>Bacillus megaterium</i> (99,9%)
B140/16	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B145/16	Não identificado	<i>Paenibacillus urinalis</i> (99,9%)
B147/16	<i>Bacillus circulans</i> (99,2%)	<i>Bacillus</i> spp. (99,9%)
B148/16	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B199/16	Não identificado	<i>Lysinibacillus</i> spp. (99,9%)
B235/16	<i>Bacillus firmus</i> (87,0%)	<i>Cytobacillus oceanisediminis/firmus</i> (99,9%)
B238/16	<i>Bacillus megaterium/coagulans/amyloliquefaciens</i> (80,0%)	<i>Bacillus megaterium</i> (92,4%)
B289/16	<i>Bacillus simplex</i> (95,0%)	Não identificado
B311/16	<i>Bacillus megaterium/coagulans/amyloliquefaciens</i> (80,0%)	<i>Bacillus megaterium</i> (98,7%)
B335/16	<i>Bacillus cereus</i> (91,2%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B350/16	Não identificado	<i>Sporosarcina soli</i> (99,9%)
B388/16	<i>Bacillus megaterium/coagulans/amyloliquefaciens</i> (84,0%)	<i>Bacillus megaterium</i> (96,6%)
B533/16	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (89,4%)	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (99,9%)
B534/16	<i>Bacillus cereus</i> group (94,5%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B535/16	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (91,0%)	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (99,9%)
B537/16	<i>Bacillus cereus</i> group (81,6%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B538/16	<i>Bacillus cereus</i> group (99,0%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)

Linhagens Isoladas em Bio-Manguinhos	Resultados de Identificação por MALDI-TOF MS	
	Antes da Ampliação da BD	Após a Ampliação da BD
B540/16	<i>Bacillus cereus</i> group (86,7%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B543/16	<i>Bacillus cereus</i> group (91,8%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B545/16	<i>Bacillus cereus</i> group (90,0%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B552/16	<i>Bacillus megaterium/coagulans/amyloliquefaciens</i> (76,0%)	<i>Bacillus megaterium</i> (84,0%)
B578/16	<i>Bacillus megaterium/coagulans/amyloliquefaciens</i> (88,0%)	<i>Bacillus megaterium</i> (99,9%)
B583/16	Não identificado	<i>Neobacillus niacini</i> (99,9%)
B617/16	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B035/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (96,7%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B042/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B043/17	<i>Bacillus cereus</i> group (96,9%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B046/17	<i>Bacillus licheniformis</i> (99,9%)	<i>Bacillus licheniformis</i> (99,9%)
B116/17	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B174/17	<i>Paenibacillus lautus</i> (91,8%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (93,5%)
B176/17	<i>Bacillus megaterium/coagulans/amyloliquefaciens</i> (92,0%)	<i>Bacillus megaterium</i> (99,9%)
B190/17	Não identificado	Não identificado
B194/17	<i>Bacillus pumilus</i> (99,9%)	<i>Bacillus pumilus</i> group (99,9%)
B211/17	Não identificado	<i>Metabacillus halosaccharovorans/niabensis</i> (99,9%)
B243/17	Não identificado	<i>Bacillus</i> spp. (99,9%)
B245/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (96,7%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,2%)
B252/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,4%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (93,3%)
B254/17	<i>Paenibacillus lactis</i> (99,9%)	<i>Paenibacillus lactis</i> (99,9%)
B263/17	Não identificado	<i>Bacillus</i> spp. (99,9%)
B264/17	<i>Bacillus subtilis</i> (99,9%)	<i>Bacillus subtilis</i> (99,9%)
B282/17	Não identificado	Não identificado
B289/17	<i>Oceanobacillus caeni</i> (93,0%)	<i>Oceanobacillus caeni</i> (99,9%)
B319/17	Não identificado	<i>Bacillus</i> spp. (99,0%)

Linhagens Isoladas em Bio-Manguinhos	Resultados de Identificação por MALDI-TOF MS	
	Antes da Ampliação da BD	Após a Ampliação da BD
B336/17	<i>Bacillus coagulans/megaterium</i> (76,7%)	<i>Bacillus megaterium</i> (99,9%)
B343/17	<i>Bacillus pumilus</i> (99,9%)	<i>Bacillus pumilus</i> group (99,9%)
B344/17	<i>Bacillus pumilus</i> (82,5%)	<i>Bacillus pumilus</i> group (99,9%)
B372/17	<i>Bacillus pumilus</i> (98,9%)	<i>Bacillus pumilus</i> group (99,9%)
B387/17	<i>Bacillus pumilus</i> (99,9%)	<i>Bacillus pumilus</i> group (99,9%)
B394/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (92,8%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (92,8%)
B399/17	Não identificado	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B408/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B433/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (90,7%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B449/17	Não identificado	<i>Terribacillus goriensis</i> (99,9%)
B482/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (76,8%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B486/17	Não identificado	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B531/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B567/17	Não identificado	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B585/17	<i>Bacillus pumilus</i> (75,9%)	<i>Bacillus pumilus</i> group (99,9%)
B599/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B600/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B601/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B602/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B605/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B624/17	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B626/17	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B627/17	Não identificado	<i>Bacillus</i> spp. (99,9%)
B651/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B664/17	<i>Bacillus pumilus</i> (95,7%)	<i>Bacillus pumilus</i> group (96,2%)
B674/17	Não identificado	<i>Cytobacillus gottheilii</i> (99,9%)
B675/17	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)	<i>Bacillus cereus</i> group (99,9%)
B679/17	Não identificado	<i>Bacillus</i> spp. (99,9%)
B682/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (83,8%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,2%)

Linhagens Isoladas em Bio-Manguinhos	Resultados de Identificação por MALDI-TOF MS	
	Antes da Ampliação da BD	Após a Ampliação da BD
B705/17	Não identificado	<i>Bacillus flexus</i> (99,9%)
B752/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (87,0%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B763/17	Não identificado	<i>Bacillus infantis</i> (99,9%)
B774/17	Não identificado	<i>Bacillus infantis</i> (99,9%)
B815/17	<i>Bacillus licheniformis</i> (83,8%)	<i>Bacillus</i> spp. (95,7%)
B816/17	Não identificado	<i>Bacillus licheniformis</i> (99,9%)
B826/17	<i>Bacillus megaterium/coagulans/amyloliquefaciens</i> (92,0%)	<i>Bacillus megaterium</i> (99,9%)
B862/17	<i>Bacillus firmus</i> (95,7%)	<i>Cytobacillus oceanisediminis/firmus</i> (99,9%)
B863/17	<i>Bacillus circulans</i> (99,2%)	<i>Bacillus circulans</i> (99,9%)
B864/17	Não identificado	<i>Bacillus infantis</i> (99,9%)
B865/17	<i>Bacillus circulans</i> (99,9%)	<i>Bacillus circulans</i> (99,9%)
B915/17	<i>Bacillus circulans</i> (83,2%)	<i>Bacillus circulans</i> (99,9%)
B977/17	<i>Bacillus firmus</i> (89,9%)	<i>Cytobacillus firmus</i> (99,9%)
B991/17	<i>Paenibacillus lautus</i> (82,5%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B1010/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (96,0%)
B1013/17	<i>Bacillus firmus</i> (89,7%)	<i>Cytobacillus oceanisediminis/firmus</i> (99,9%)
B1016/17	<i>Bacillus firmus</i> (89,9%)	<i>Cytobacillus oceanisediminis/firmus</i> (99,9%)
B1036/17	<i>Paenibacillus</i> spp. (93,3%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
B1072/17	<i>Bacillus subtilis</i> (99,9%)	<i>Bacillus subtilis</i> (99,9%)
B1075/17	<i>Bacillus subtilis</i> (93,6%)	<i>Bacillus subtilis</i> (99,9%)
B1119/17	<i>Paenibacillus lautus</i> (75,9%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)

Fonte: (A autora, 2020).
BD: base de dados.

APÊNDICE B – LINHAGENS CEDIDAS PELA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DO AMBIENTE E SAÚDE

Quadro 8 - Linhagens cedidas pela Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) identificadas por MALDI-TOF MS antes e depois da ampliação da base de dados do programa Saramis.

Linhagens Cedidas pela CBAS	Resultados de Identificação por MALDI-TOF MS	
	Antes da Ampliação da BD	Após a Ampliação da BD
3311	Não identificado	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
3373A	Não identificado	<i>Paenibacillus fonticola</i> (95,0%)
3399	<i>Bacillus circulans</i> (80,5%)	<i>Bacillus circulans</i> (99,9%)
3404	<i>Terribacillus goriensis</i> (99,9%)	<i>Terribacillus goriensis</i> (99,9%)
3405	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (99,9%)	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i> (99,9%)
3424B	Não identificado	<i>Paenibacillus fonticola</i> (99,9%)
3428	Não identificado	<i>Bacillus</i> spp. (99,9%)
3439B	Não identificado	<i>Paenibacillus</i> spp. (93,6%)
3441	Não identificado	<i>Bacillus koreensis</i> (99,9%)
3456	Não identificado	<i>Bacillus onubensis</i> (99,9%)
3476	Não identificado	<i>Bacillus onubensis</i> (99,9%)
3482	Não identificado	<i>Cohnella</i> spp. (99,9%)
3492	Não identificado	<i>Paenibacillus favisporus/cineris/rhizosphaerae</i> (99,9%)
3504	Não identificado	<i>Paenibacillus dendritiformis/thiaminolyticus/popilliae</i> (99,9%)
3535	<i>Oceanobacillus sojiae</i> (99,9%)	<i>Oceanobacillus sojiae</i> (93,6%)
3537	Não identificado	<i>Bacillus</i> spp. (99,9%)
3540	<i>Paenibacillus</i> spp. (79,2%)	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)
3552	Não identificado	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum/indica</i> (99,9%)
3564	Não identificado	<i>Paenibacillus humicus</i> (99,9%)
3568	Não identificado	<i>Paenibacillus humicus</i> (99,9%)
3584	Não identificado	<i>Paenibacillus</i> spp. (99,9%)

Fonte: (A autora, 2020).

BD: base de dados.