

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

Marcus Vinicius Serejo Borges Vale da Silva

**AVALIAÇÃO DA PUREZA, VIABILIDADE E AUTENTICAÇÃO DE CEPAS
BACTERIANAS, RECOMENDADAS EM ENSAIOS DE CONTROLE DA
QUALIDADE DE PRODUTOS E INSUMOS DE SAÚDE, DA COLEÇÃO DE
BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA- CBRVS - INCQS/
FIOCRUZ**

Rio de Janeiro

2020

Marcus Vinicius Serejo Borges Vale da Silva

AVALIAÇÃO DA PUREZA, VIABILIDADE E AUTENTICAÇÃO DE CEPAS
BACTERIANAS, RECOMENDADAS EM ENSAIOS DE CONTROLE DA
QUALIDADE DE PRODUTOS E INSUMOS DE SAÚDE, DA COLEÇÃO DE
BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA- CBRVS - INCQS/
FIOCRUZ

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

Tutor: Eduardo Ruback dos Santos

Preceptor: Rafael Lawson Ferreira

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Silva, Marcus Vinicius

Avaliação da Pureza, Viabilidade e Autenticação de cepas bacterianas, recomendadas em ensaios de controle da qualidade de produtos e insumos de saúde, da Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária- CBRVS - INCQS/ Fiocruz. / Marcus Vinicius Silva. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

99 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Tutor: Eduardo Ruback dos Santos.

Preceptor: Rafael Lawson Ferreira.

1. Controle de Qualidade. 2. Microrganismos de Referência. 3. Coleções Biológicas. 4. Cepas Bacterianas. I. Título.

Evaluation of Purity, Viability and Authentication of bacterial strains, recommended in quality control tests on health products and supplies, from the Reference Bacteria Collection in Health Surveillance - CBRVS - INCQS / Fiocruz.

Marcus Vinicius Serejo Borges Vale da Silva

AVALIAÇÃO DA PUREZA, VIABILIDADE E AUTENTICAÇÃO DE CEPAS
BACTERIANAS, RECOMENDADAS EM ENSAIOS DE CONTROLE DA
QUALIDADE DE PRODUTOS E INSUMOS DE SAÚDE, DA COLEÇÃO DE
BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA- CBRVS - INCQS/
FIOCRUZ

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

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ivano de Filippis (Presidente)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fiocruz

Ma. Talita Coelho de Souza

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fiocruz

Ma. Claudia Ribeiro Souto

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fiocruz

Me. Rafael Lawson Ferreira (Suplente)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fiocruz

Dedico este trabalho à minha família por todo o apoio e compreensão nessa trajetória da residência. Vocês são a minha base!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me sustentado em todos os momentos da minha vida e ter me dado sabedoria e discernimento para realizar essa residência e desenvolver esse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Antônio e Célia, por serem minha base na vida. Em minhas atitudes vocês são o início, meio ou fim. Agradeço por tudo que me proporcionaram e proporcionam até hoje, todo o cuidado, amor e zelo. A me motivarem a ser sempre melhor e buscar meus objetivos, me consolarem nos momentos tristes e serem meu porto seguro. O que sou, devo em grande parte à vocês. Agradeço também ao meu irmão por sempre me ajudar, motivar e estar presente, dentro do possível. Vocês são as pessoas mais importantes na minha vida. Palavras são pouco para descrever o que sinto por vocês, e possivelmente eu falhe nessa tentativa, meu sentimento é imensurável e inenarrável, porém na tentativa de defini-lo, amo vocês, em seu sentido mais puro e completo.

Agradeço também aos meus demais familiares e pessoas as quais considero membros da minha família por todo apoio e estímulo ao longo da minha vida.

Agradeço aos meus tutor e preceptor, Eduardo Ruback e Rafael Lawson, respectivamente, por todo ensinamento, compreensão e ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho e no desempenho da rotina diária no laboratório. Agradeço aos demais funcionários do Laboratório de Microrganismos de Referência, dos Setores de Bactérias e Arqueas e Fungos, pelo acolhimento, ensinamento e leveza na convivência. Vocês proporcionaram um ambiente de trabalho amigável, leve e divertido, o que fez total diferença durante a residência.

Agradeço em especial às minhas amigas Aline Moraes (Line) e Gabriela Rezende (Gabizinha) por serem minhas companheiras desde a faculdade até residência. A presença de vocês foi essencial para tornar esse período mais leve e alegre. Também para superar os momentos tristes, cansativos e desmotivantes. Obrigado por toda a paciência, escuta e conselhos. O fortalecimento da nossa amizade foi o melhor presente que pude adquirir nessa residência. Amo vocês!

Agradeço a todos os amigos que estiveram comigo ao longo da minha vida. A Ana Maria que esteve ao meu lado desde a época do pré-vestibular, sempre me aconselhando e como uma boa ouvinte, escutando minhas reclamações e alegrias. Aos amigos que a Biomedicina UFRJ me deu (Gabrielle Rodrigues, Gabrielle Tantos,

Igor, Júlia, Luciana, entre outros), com os quais formamos um grande grupo de amizade. Os levarei para o resto da minha vida.

Agradeço a todos os demais amigos de turma da residência, esses dois anos se tornaram mais divertidos devido à presença de vocês.

“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria.”

Santo Agostinho

RESUMO

As coleções de culturas biológicas são centros de conservação responsáveis pela aquisição, preservação, identificação, catalogação e distribuição de organismos que podem ser utilizados como suporte para fins experimentais, acadêmicos, tecnológicos e de controle de qualidade de produtos. Por isso, a preservação e manutenção dos microrganismos devem ser realizadas de modo a assegurar a sobrevivência, estabilidade e pureza durante longos períodos, garantindo a preservação de características genéticas e morfológicas, sem variabilidade da patogenicidade e virulência. Dentre as 33 coleções reconhecidas institucionalmente na Fiocruz, destaca-se a Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) que é responsável pela manutenção, guarda e distribuição de cepas bacterianas para os laboratórios oficiais, utilizadas como controle dos ensaios microbiológicos. O presente trabalho avaliou a conformidade (pureza, viabilidade e autenticidade) das cepas bacterianas, recomendadas em ensaios de controle de qualidade de produtos e insumos de saúde, pertencentes à CBRVS-INCQS/Fiocruz, visto que a conformidade dessas cepas tem impacto direto nos resultados laboratoriais que darão sustentação às ações da vigilância sanitária. Foram selecionadas 46 cepas bacterianas da CBRVS, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), recomendadas na 6ª edição da Farmacopeia Brasileira e POPs INCQS em métodos de controle de qualidade de produtos. Dessas, foram realizados testes de pureza, viabilidade e autenticação em 45 cepas bacterianas. O teste de pureza foi realizado através da semeadura por esgotamento em meio sólido e a viabilidade avaliada por diluições seriadas em meios de cultura sólidos e contagem de unidades formadoras de colônias. A autenticação foi realizada pelo método de coloração de Gram, seguida de caracterização bioquímica em sistema automatizado VITEK® 2. Das 45 cepas analisadas, 41 foram consideradas satisfatórias, 3 foram consideradas insatisfatórias e 1 foi considerada inconclusiva, segundo os critérios estabelecidos nos POPs do INCQS. Entretanto, as cepas consideradas satisfatórias apresentaram alta variabilidade de resultados nos testes de conformidade.

Palavras-chave: Controle de Qualidade. Microrganismos de Referência. Coleções Biológicas. Cepas Bacterianas.

ABSTRACT

The collections of biological cultures are conservation centers responsible for the acquisition, preservation, identification, cataloging and distribution of organisms that can be used as support for experimental, academic, technological and product quality control purposes. Therefore, the preservation and maintenance of microorganisms must be carried out in order to ensure survival, stability and purity for long periods, guaranteeing the preservation of genetic and morphological characteristics, without variability in pathogenicity and virulence. Among the 33 collections institutionally recognized at Fiocruz, the Reference Bacteria Collection in Sanitary Surveillance (CBRVS) stands out, which is responsible for the maintenance, storage and distribution of bacterial strains for official laboratories, used as control of microbiological tests. The present study evaluated the conformity (purity, viability and authenticity) of bacterial strains, recommended in tests of quality control of health products and supplies, belonging to CBRVS-INCQS / Fiocruz, since the conformity of these strains has a direct impact on laboratory results that will support health surveillance actions. 46 bacterial strains from the CBRVS were selected, from the American Type Culture Collection (ATCC), recommended in the 6th edition of Brazilian Pharmacopoeia and POPs INCQS in product quality control methods. From these, purity, viability and authentication tests were carried out on 45 bacterial strains. The purity test was carried out by seeding by exhaustion in a solid medium and the viability was evaluated through serial dilutions in solid culture media and counting of colony forming units. Authentication was performed using the Gram staining method, followed by biochemical characterization in a VITEK® 2 automated system. Of the 45 strains analyzed, 41 were considered satisfactory, 3 were considered unsatisfactory and 1 was considered inconclusive, according to the criteria established in the INCQS POPs. However, the strains considered satisfactory showed high variability of results in the compliance tests.

Keywords: Quality Control. Reference Microorganisms. Collections of cultures. Bacterial Strains

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - esquematização da metodologia do Teste de Pureza.	31
Figura 2 - Esquematização da metodologia do Teste de Viabilidade.....	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cartões específicos VITEK® 2 relacionado às características morfológicas e metabólicas dos microrganismos.....	34
Quadro 2 - Faixa de turbidez da suspensão bacteriana usada para inoculação do cartão específico VITEK® 2.	35
Quadro 3 - Nível de estratificação de confiança de identificação do sistema do VITEK® 2 considerado pela fabricante	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado do teste de viabilidade das cepas bacterianas consideradas satisfatórias.	57
Tabela 2 - Resultado da autenticação das cepas bacterianas consideradas satisfatórias.	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de cepas recomendadas por referência.....	28
Gráfico 2 - Distribuição das cepas bacterianas por gênero bacteriano.	38
Gráfico 3 - Resultados dos testes de conformidade das cepas bacterianas utilizadas.	40
Gráfico 4 - Insatisfatoriedade apresentada pelas cepas, consideradas reprovadas quanto a sua conformidade (item 3.4.5), em cada abertura de ampola.	42
Gráfico 5 - Satisfatoriedade das cepas bacterianas de acordo com o número de abertura de ampolas.....	44
Gráfico 6 - Insatisfatoriedade apresentada na primeira abertura de uma ampola das cepas consideradas satisfatórias na segunda abertura.....	50
Gráfico 7 - Insatisfatoriedade apresentada na primeira e segunda aberturas de uma ampola do mesmo lote das cepas consideradas satisfatórias na terceira abertura de ampola.....	55
Gráfico 8 - Valor de contagem de colônias obtido nos testes de viabilidade das cepas consideradas satisfatórias.	57
Gráfico 9 - Número de cepas satisfatórias que apresentaram resultado conforme nível de estratificação de confiança de identificação do sistema do VITEK® 2	59

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AES	Software Advanced Expert System TM
ANC	Anaero-card
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção de Cultura Americana (<i>American Type Culture Collection</i>)
BHI	Infusão Cérebro Coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
BGP	Bacilo Gram Positivo
BGN	Bacilo Gram Negativo
CGP	Cocos Gram Positivo
CARVS	Coleção de Arqueas de Referência em Vigilância Sanitária
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CRFVS	Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária
CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
DSMZ	Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>)
Ed.	Edição
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
ID	Identificação
IEC	Comissão Eletrotécnica Internacional (<i>International Electrotechnical Commission</i>)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia

ISO	Organização Internacional para Padronização (<i>International Organization for Standardization</i>)
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LCCDM	Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos
LCCDMA	Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos
LMR	Laboratório de Microrganismos de Referência
NBR	Normas Brasileiras
NSMP	Meio Esporulação Nutriente incluindo Fosfato (<i>Nutrient Sporulation Medium including Phosphate</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
POP	Procedimento Operacional Padrão
PU	Procedimento de Uso
RCM	Meio Clostridial Reforçado Modificado (<i>Reinforced Clostridium Medium</i>)
SBA	Setor de Bactérias e Arqueas
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
TSA	Ágar Caseína Soja (<i>Tryptic Soy Agar</i>)
TSB	Caldo Caseína Soja (<i>Tryptic Soy Broth</i>)
TVP	Teste de Viabilidade e Pureza
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
WDCM	Centro de Dados Mundial para Microorganismos (<i>World Data Center for Microorganisms</i>)
WFCC	Federação Mundial de Coleções Culturais (<i>World Federation for Culture Collections</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O Histórico da Vigilância Sanitária no Brasil	17
1.2 Sistema Nacional de Vigilância Sanitária	20
1.3 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	21
1.4 Coleções Biológicas e seu histórico no Brasil	22
1.5 Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária	25
1.6 Justificativa	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 Cepas bacterianas	28
3.2 Levantamento de dados	29
3.2.1 Meios de Cultivo e condições de crescimento	29
3.3 Reconstituição do líofilo	29
3.4 Testes de Pureza, Viabilidade e Autenticação	30
3.4.1 Teste de Pureza	30
3.4.2 Teste de Viabilidade	31
3.4.3 Autenticação	32
3.4.3.1 <i>Análise Microscópica</i>	33
3.4.3.2 <i>Identificação Bioquímica</i>	34
3.4.4 Teste de esporulação	36
3.4.5 Critérios de aceitabilidade dos resultados	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Levantamento de dados	38
4.2 Testes de Pureza, Viabilidade e Autenticação	39
4.2.1 Cepas consideradas insatisfatórias quanto à conformidade.	40
4.2.2 Cepa considerada inconclusiva quanto à conformidade.	43
4.2.3 Cepas consideradas satisfatórias quanto à conformidade.	44
4.2.3.1 <i>Cepas consideradas satisfatórias na primeira abertura de uma ampola</i>	44
4.2.3.2 <i>Cepas consideradas satisfatórias na segunda abertura de ampola</i>	47
4.2.3.3 <i>Cepas consideradas satisfatórias na terceira abertura de ampola</i>	50

6 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE A – REFERÊNCIAS E ENSAIOS ONDE SÃO RECOMENDADAS A UTILIZAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS.....	78
APÊNDICE B – CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MEIOS DE CULTURA RECOMENDADOS PARA AS CEPAS BACTERIANAS.....	82
ANEXO A – FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA RECOMENDADOS PELO ATCC, QUE CONSTAM NOS INFORMES TÉCNICOS DAS CEPAS BACTERIANAS.....	85
ANEXO B – MICRORGANISMOS CORRETAMENTE IDENTIFICADOS POR CARTÃO DO SISTEMA VITEK® 2.	93
ANEXO C – PROVAS BIOQUÍMICAS CONTIDAS POR CARTÃO DO SISTEMA VITEK® 2.....	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Histórico da Vigilância Sanitária no Brasil

Os primeiros conceitos de higiene e noções sanitárias no Brasil remontam do início do século XIX, com a vinda da família real portuguesa, em meados de 1808. Nesse momento, a cidade do Rio de Janeiro passou por mudanças estruturais e de hábitos da população, visando adequá-la à condição de sede da corte portuguesa, garantindo a higiene e salubridade urbana. Nesse contexto, no século XIX a saúde pública foi estabelecida com intuito de controlar e conter doenças epidêmicas, especialmente nas cidades portuárias pela intensa circulação de pessoas e mercadorias, além de adequar o comércio portuário brasileiro as demandas crescentes sanitárias internacionais (PIMENTA TS, 2004; COSTA, 1999).

No decreto de 28 de julho de 1809, foi estabelecido o cargo de Provedor-mor de Saúde da Corte e Estado do Brasil, tendo como atribuição as funções concernentes às questões sanitárias relacionadas ao combate às epidemias e à inspeção dos portos (ABREU, 1900).

Em 1828, a chamada Lei de 1º de Outubro, atribuiu a função de inspeção sobre a saúde, a vacinação, a higiene e a fiscalização dos comestíveis destinados ao consumo público às Câmaras Municipais, órgãos já existentes no Brasil desde 1532 (BRASIL, 1828).

A Inspetoria-Geral de Saúde Pública do Porto do Rio de Janeiro foi instituída pelo decreto de 17 de janeiro de 1829 e tinha por função verificar o estado sanitário das embarcações e decidir se estavam desimpedidas ou deveriam guardar quarentena (BRASIL, 1829).

Em 17 de agosto de 1846, foi criado o Instituto Vacínico do Império, através do Decreto nº 464. Sua atribuição era o estudo, a prática, o melhoramento e propagação da vacina (BRASIL, 1847).

Em 14 de setembro de 1850, foi criada a Junta de Higiene Pública pelo Decreto nº 598. Esse órgão tinha como uma das suas atribuições propor medidas para a salubridade nas cidades, exercer a polícia médica nas visitas a todos os estabelecimentos e locais que pudessem provocar danos à saúde pública (Brasil, 1851).

Em 1º de março de 1884, através do Decreto nº 9.159, foram ampliadas as atribuições da Inspeção de Saúde do Porto do Rio de Janeiro conferindo-lhe também a atribuição de polícia sanitária do litoral e das docas de mercado, bem como o exame dos gêneros fornecidos às embarcações pelos quitandeiros marítimos (BRASIL, 1884).

Em 3 de fevereiro de 1886, foi publicado o Decreto nº 9.554, criando Inspetoria-Geral de Higiene e o Conselho Superior de Saúde Pública, desse modo, reestruturou os serviços sanitários do Império, que passaram a ser dirigidos pela Inspetoria-Geral de Higiene e pela Inspetoria-Geral de Saúde dos Portos (BRASIL, 1886).

Em 12 de janeiro de 1894, foi criado o Instituto Sanitário Federal, a partir da fusão do Laboratório de Bacteriologia e da Diretoria Sanitária pelo Decreto nº 1.647 (BRASIL, 1895).

Em 1º de fevereiro 1897, foi criada a Diretoria Geral da Saúde Pública, através do Decreto nº 2.449, que unificou a direção e execução dos serviços de higiene da União, antes realizados pelo Instituto Sanitário Federal e Inspetoria Geral de Saúde dos Portos (BRASIL, 1897).

Em 1904, a implantação do Regulamento dos Serviços Sanitários da União (Decreto nº 5156/1904), previu a elaboração do Código Sanitário e do Juízo dos Feitos de Saúde Pública, responsável pelo julgamento de crimes contra a higiene e salubridade públicas (BRASIL, 1904).

Em 21 de Janeiro de 1920 foi publicado o Decreto-Lei nº 3.987, que reorganiza os serviços de saúde pública, o qual cria o Departamento Nacional de Saúde Pública (BRASIL, 1920).

Em 1923, foi criado Regulamento Sanitário Federal, através do Decreto nº 16.300. Nele constava pela primeira vez o termo Vigilância Sanitária, estabelecido como o controle sanitário de pessoas doentes ou suspeitas de portar doenças transmissíveis, assim como, o licenciamento e fiscalização de estabelecimentos comerciais e industriais, controle de logradouros públicos, defesa sanitária marítima e fluvial e controle do exercício profissional da área da saúde. Ficou conhecido como Reforma Carlos Chagas (MINAYO-GOMEZ, 1997; CAMPOS, 2007; FRANCO-SANTOS, 2008).

Em 14 de novembro de 1930 foi criado o Ministério da Educação e Saúde Pública, como ato do Governo provisório de Getúlio Vargas (HOCHMAN, 2005).

Em 1942 foi criado o Serviço Especial de Saúde Pública (SESP), através do Decreto nº 4.275, a partir de um acordo bidirecional entre os governos brasileiro e norte-americano, tendo como propósito o saneamento de uma parte da região amazônica e do Vale do Rio Doce (CAMPOS, 2008).

Em 25 de julho de 1953 foi criado o Ministério da Saúde, através da Lei nº 1.920. Em 1954, o presidente Getúlio Vargas aprovou a criação do Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM). Esse laboratório tinha como objetivo analisar produtos de interesse à saúde pública, aprovar pedidos de licenciamento de novos produtos e favorecer o desenvolvimento da indústria farmacêutica no país (Brasil, 1954). Em 1961 foi incorporada ao escopo de análises do LCCDM a análise de alimentos de interesse a saúde pública modificando seu nome para Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA) (BRASIL, 1961a).

Em 21 de Janeiro de 1961 foi regulamentado o Código Nacional de Saúde, através do Decreto nº 49.974, o qual dissociou entre vigilância sanitária e vigilância epidemiológica (BRASIL, 1961b).

Em 23 de setembro de 1976, foi publicada a Lei nº 6.630, a Lei da Vigilância Sanitária, que dispõe sobre a vigilância sanitária de medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos, cosméticos, saneantes, entre outros produtos (BRASIL, 1976).

Em 20 de agosto de 1977 foi publicada a Lei nº 6.437 que dispõe sobre infrações à legislação sanitária federal e estabelece sanções respectivas, sendo uma das principais leis da Vigilância Sanitária (BRASIL, 1977).

Em 1978, após a publicação do Decreto nº 82.201 ficou determinada a transferência da administração do LCCDMA para a Fiocruz (BRASIL, 1978).

Em 1981 com o ato nº 044 da Presidência da Fiocruz, o LCCDMA foi renomeado, sendo assim criado o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), o qual com o passar dos anos foi recebendo novas atribuições de atuação (PIOVESAN, 2002).

Em 19 de setembro de 1990, foi criado o Sistema Único de Saúde (SUS) através da Lei Federal nº 8.080 que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes. Essa lei afirma em seu artigo 6º que está incluída no campo de atuação do SUS a vigilância sanitária (BRASIL, 1990).

Em 1999 foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), e o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) mediante a publicação da Lei nº 9782, como forma de coordenar esse sistema (LUCCHESI, 2001).

1.2 Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

O modelo de vigilância sanitária brasileiro é descrito na Lei Orgânica da Saúde (LOS – Lei nº 8.080/1990), em seu artigo 6º, como:

“[...] 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, circulação de bens e serviços de interesse da saúde pública.”

Desse modo, é dever do Estado a proteção da população por meio de políticas públicas. Diante disso, as práticas de vigilância sanitária têm adquirido uma crescente relevância na sua área de atuação (BRASIL, 1990; SILVEIRA, 2006).

Concomitante a criação da Anvisa, pela Lei nº 9.782/1999, foi instituído o SNVS. O SNVS compõe o Sistema Único de Saúde (SUS), sendo constituído pelos serviços ou órgãos de vigilância sanitária nas três esferas governamentais: federal, estadual e municipal, havendo pactuação e compartilhamento de competências e responsabilidades entre as diferentes instâncias. Destarte, não há uma relação de subordinação entre as esferas, respeitando assim os diferentes graus de autonomia, capacidade de execução e das responsabilidades nos níveis de governo, permitindo sua atuação de acordo com as suas especificidades e divergências (BRASIL, 2011).

Aos integrantes do SNVS compete a elaboração e fiscalização de normas que regulamentem o funcionamento dos estabelecimentos que desenvolvem processos produtivos e oferecem serviços à população. O SNVS é integrado por diferentes órgãos, dentre eles: a Anvisa, que coordena o Sistema, e o INCQS, da Fiocruz, no plano federal; Secretarias de Estado de Saúde e os Laboratórios Centrais (LACEN) no plano estadual; e pelos serviços de vigilância sanitária dos municípios, mesmo que muitos ainda não possuam um sistema de vigilância sanitária bem estruturado. Esses órgãos empregam diferentes práticas de prevenção e instrumentos de intervenção com a finalidade de prevenir, minimizar ou eliminar os riscos nocivos de produtos e serviços à saúde humana (BRASIL, 2011).

Além disso, o SNVS também dispõe do suporte técnico da Rede Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade, uma rede de sustentação à vigilância sanitária composta por laboratórios distribuídos nos diversos estados do território nacional, nas três esferas governamentais. Esses laboratórios são parte integrante e imprescindível na estrutura da vigilância sanitária, pois são responsáveis por ações de avaliação analítica de controle de qualidade dos produtos relacionados à saúde, atuando em análises fiscais - verificando o cumprimento das leis-, auxiliando assim nas ações da vigilância sanitária. Ademais também contribuem para a produção científico-tecnológica (LUCCHESI, 2001; BRASIL, 2011).

1.3 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

O INCQS é, de acordo com o Decreto nº 3.029/1999, uma unidade técnico-científica, que compõe a Rede Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade, em sua esfera federal, ligado ao SNVS, vinculada administrativamente à Fiocruz e tecnicamente ao SNVS, considerado referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle de qualidade de produtos, insumos, ambientes e serviços vinculados à saúde. Tem o papel de assessorar os demais laboratórios da rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária sobre metodologias analíticas, questões tecnológicas e normativas, promover e participar de ensaios de proficiência e estabelecer, manter e distribuir substâncias químicas e microrganismos de referência, atuando na sustentação às ações de vigilância sanitária (BRASIL, 2011).

O INCQS possui alguns de seus ensaios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e adota a Norma ABNT NBR ISO 17025:2017 em gestão de controle de qualidade, que compreende a competência de laboratórios de ensaios e calibração.

O INCQS é dividido organizacionalmente em quatro departamentos técnicos distintos, segundo a sua área de conhecimento: Departamento de Química (DQ), Departamento de Microbiologia (DM), Departamento de Imunologia (DI) e Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT). De acordo com o organograma institucional, os departamentos são compostos por laboratórios que, por sua vez, são ainda subdivididos em setores. Cada setor é responsável por uma determinada

atividade que normalmente está relacionada a análise, em suas diversas modalidades, de produto ou produção tecnológica e científica. Além disso, o instituto também abriga uma Central de Recebimento de Amostras, comum a todo o Campus Manguinhos da Fiocruz, para recebimento e armazenamento de amostras e departamentos e setores administrativos, gerenciais e educacionais (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2020a).

O Instituto possui estrutura matricial, contendo 10 Núcleos Técnicos, a saber: Alimentos; Artigos de Diálise; Artigos de Saúde; Conjuntos, Reagentes e Insumos Diagnósticos; Cosméticos; Medicamentos; Produtos Biológicos; Saneantes; Sangue e Hemoderivados; Saúde Ambiental - que possuem a incumbência de distribuir as amostras aos laboratórios dos departamentos técnico-científicos, de acordo com as análises necessárias a serem realizadas para cada produto (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2020b).

Dentro do DM, situa-se o Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR), o qual é dividido em dois setores, o Setor de Bactérias e Arqueas de Referência e o Setor de Fungos de Referência. Os mesmos respondem e dão o suporte necessário à três Coleções Microbiológicas distintas: Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS); Coleção de Arqueas de Referência em Vigilância Sanitária (CARVS), sob responsabilidade do Setor de Bactérias e Arqueas, e Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CRFVS), sob responsabilidade do Setor de Fungos.

1.4 Coleções Biológicas e seu histórico no Brasil

As coleções de culturas biológicas são centros de conservação responsáveis pela aquisição, preservação, identificação, catalogação e distribuição de organismos, os quais servem de apoio à comunidade técnico-científica, podendo ser disponibilizados para a utilização como suporte para fins experimentais, acadêmicos, tecnológicos e de controle de qualidade de produtos, sendo assim consideradas a base da pesquisa científica (ROMEIRO, 1996; ABREU; TUTUNJI, 2004; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2019).

A preservação e manutenção dos organismos devem ser realizadas de modo a assegurar a sobrevivência, estabilidade e pureza durante longos períodos, garantindo a preservação de características genéticas e morfológicas, sem

variabilidade da patogenicidade e virulência, informando a procedência e identificação taxonômica de cada uma das linhagens. SETTE, em 2005, descreve o material biológico como um insumo que requer a implementação de um sistema de qualidade que permita assegurar suas características identificadas ou a ele atribuídas (ABREU; TUTUNJI, 2004; ARANDA, 2014).

Mundialmente, existem diversos tipos de coleções biológicas, as quais diferem entre si de acordo com a etiologia do material preservado. A preservação pode ser compreendida como o processo de desaceleração ao máximo da decomposição natural da matéria orgânica, onde para cada espécie de material serão necessários procedimentos técnicos, conservantes e métodos de preservação específicos. Diante disso, cada coleção possui metodologia própria de preservação, que é relativa a etiologia do espécime biológico (ARANDA, 2014).

Não há uma fórmula singular e universal que determine a eficiência da estocagem e preservação por longos períodos de tempo. Desse modo, a escolha do método de manutenção mais adequado deve ser baseada nas características do agente etiológico, bem como as vantagens e desvantagens de cada técnica disponível (COSTA et al., 2009).

Os métodos empregados para conservação dos microrganismos podem diferir de acordo com as características das cepas, o manuseio e a disponibilidade de equipamentos do laboratório. Esses métodos podem ser classificados de acordo com o seu tempo máximo de preservação, em: curto prazo - realizado através de repiques contínuos da cepa (onde as culturas podem ser mantidas em temperaturas relativamente baixas 4-10°C); médio prazo – realizado através de preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada e congelamento a -20°C; e Longo prazo – é considerada a opção mais viável, onde as cepas são armazenadas em temperaturas ultrabaixas como a criopreservação em freezers a -80°C, em nitrogênio líquido a -196°C ou pelo processo de liofilização (4-8°C). A escolha adequada de um ou a combinação de mais de um método de preservação, permite uma análise fenotípica e genotípica mais satisfatória na conservação de microrganismos a longo prazo (COSTA; FERREIRA, 1991; CEFAR, 2006; COSTA et al., 2009; GIRÃO et al., 2004).

Uma metodologia amplamente utilizada na conservação de microrganismos a longo prazo é a liofilização, visto que oferece alta estabilidade do material, baixa taxa de mutação e contaminação, não necessita de manutenção frequente e ocupa pouco

espaço no armazenamento. A cepa liofilizada pode ser transportada, por um período de tempo, por longas distâncias em temperatura ambiente, sem refrigeração (MORGAN et al., 2006; ZAMORA et al., 2006; MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2008).

A liofilização pode ser definida como um processo de congelamento e remoção de água intracelular, por sublimação, das células bacterianas em atmosfera de vácuo. As etapas que compõem o processo de liofilização podem ocasionar injúria celular as cepas bacterianas, como aumento da permeabilidade celular. Com o intuito de diminuir esses danos celulares são adicionadas às cepas substâncias protetoras antes do processo de liofilização, como o leite desnatado ou glicerol (CANHOS et al., 2004; PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

Há coleções biológicas tradicionais, mundialmente estabelecidas, e com um vasto escopo de atividades, principalmente nos países desenvolvidos, a exemplo da coleção norte-americana *American Type Culture Collection* (ATCC) e a alemã *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ), sendo duas instituições privadas, sem fins lucrativos. Historicamente no Brasil, as coleções biológicas surgiram preponderantemente na região Sudeste, no Estado de São Paulo, como uma iniciativa dos pesquisadores nacionais para suprir as demandas científicas locais e minimizar a dependência das coleções internacionais, devido à dificuldade em obtenção das cepas ocasionada pelos altos custos e à morosidade nos trâmites de importação (ABREU; TUTUNJI, 2004; CAVALCANTI, 2010).

A *World Federation for Culture Collections* (WFCC) é uma comissão multidisciplinar que tem por objetivo promover e apoiar o estabelecimento de coleções de cultura, interconectar e estabelecer uma rede de informações entre as coleções e seus usuários, trabalhando para garantir a perpetuação a longo prazo de coleções importantes e favorecendo o progresso da conservação genética *ex situ*. A WFCC conta com aproximadamente 470 coleções registradas no *World Data Center for Microorganisms* (WDCM), dessas coleções estima-se a manutenção de mais de um milhão de cepas, onde 43% são bactérias (ABREU; TUTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009; WFCC, 2020).

Na realização de um levantamento nacional foram identificados 43 núcleos de pesquisa registrados no WDCM, abrigando 80 coleções com acervos de microrganismos associados a enfermidades em humanos, animais e plantas (ABREU; TUTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009).

Atualmente há 33 coleções reconhecidas institucionalmente na Fiocruz, sendo divididas em cinco categorias: coleções microbiológicas, coleções zoológicas, coleção histopatológica, coleções arqueopaleontológicas e coleção de botânica, cada qual com uma metodologia própria de preservação. Dentre essas, destaca-se a CBRVS (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2019).

1.5 Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária

A CBRVS é uma coleção de serviço, localizada no INCQS, que produz e fornece cepas bacterianas, mantendo em seu acervo cerca de 750 linhagens bacterianas de classe de risco 1 e 2, as quais, algumas de suas linhagens, são amplamente utilizadas como padrões em ensaios microbiológicos de controle de qualidade de produtos e insumos de saúde, sendo também utilizadas na pesquisa científica (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2020a).

Desse modo, a CBRVS configura como centro para pesquisa e treinamento em caracterização taxonômica e preservação de bactérias, a qual submete todos os lotes produzidos a ensaios de pureza, viabilidade e autenticação, antes e após os procedimentos de preservação, para garantia da qualidade do material fornecido. A coleção está registrada no WFCC, sob o número WDCM 1153, e possui como um de seus principais objetivos a acreditação de ensaios de acordo com a Norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025 (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2020a; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2020b).

A CBRVS pertencia anteriormente à Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS), a qual foi dividida em 2017 em 3 coleções distintas: CBRVS, CFRVS e CARVS (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2020b).

Além da sua função primordial, a coleção também é responsável por caracterização e distribuição de cepas, treinamentos, consultoria, além do serviço de depósito por meio do qual incrementa seu acervo.

1.6 Justificativa

A relevância do presente trabalho deve-se ao fato das cepas bacterianas, pertencentes à CBRVS - INCQS/Fiocruz, distribuídas para os laboratórios públicos

oficiais, serem utilizadas como padrões para os ensaios microbiológicos de controle de qualidade de produtos e insumos de saúde nesses laboratórios. Por isso, é necessário assegurar o fornecimento de linhagens puras, viáveis e autenticadas. Desse modo, a conformidade dessas cepas impacta diretamente na qualidade e veracidade dos resultados laboratoriais. Nesse sentido, além dos testes realizados imediatamente após a produção dos lotes (pureza, viabilidade e autenticação), os mesmos ensaios para confirmação da manutenção da conformidade foram repetidos nesse trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a pureza, viabilidade e autenticidade das cepas bacterianas da CBRVS-INCQS/Fiocruz, empregadas em ensaios de controle de qualidade de produtos e insumos de saúde.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Cultivar as cepas bacterianas nas condições de crescimento recomendadas;
- 2) Avaliar a Pureza das cepas bacterianas;
- 3) Verificar a viabilidade do lote pela diluição e contagem de unidades formadoras de colônia em meios de cultura sólidos;
- 4) Realizar a autenticação de forma fenotípica, por meio de análise microscópica e provas bioquímicas automatizadas.

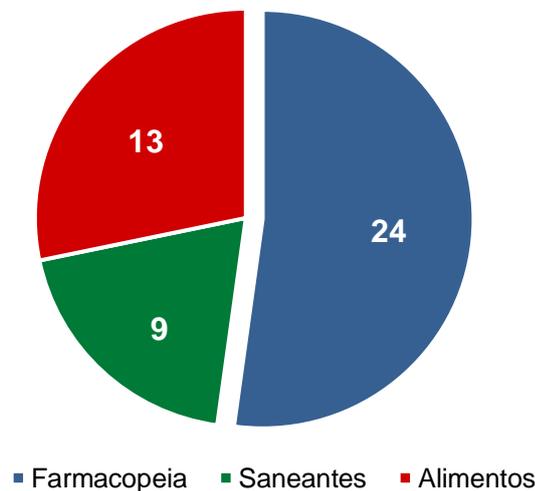
3 METODOLOGIA

3.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas 46 cepas bacterianas pertencentes à CBRVS-Fiocruz, oriundas de cepas ATCC e recomendadas em métodos compendiais e Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) relativas a ensaios de controle de qualidade de produtos e insumos de saúde. Essas cepas são recomendadas em ensaios contidos na 6ª edição da Farmacopeia Brasileira e nos POPs do INCQS, conforme descrito no APÊNDICE A.

Das 46 cepas bacterianas utilizadas no estudo, 24 cepas (52%) são recomendadas na 6ª edição da Farmacopeia Brasileira e 22 cepas (48%) nos POPs do INCQS. Das cepas contidas nos POPs INCQS, 9 cepas (20%) são recomendadas em ensaios presentes nos POPs do Setor de Saneantes e 13 cepas (28%) são recomendadas em ensaios presentes nos POPs do setor de alimentos, conforme mostrado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Número de cepas recomendadas por referência



Fonte: (Do autor, 2019).

Foi utilizado como critério de escolha para a seleção dos lotes das cepas bacterianas estudadas, o lote que possuísse o maior número de ampolas estocadas na CBRVS- Fiocruz.

3.2 Levantamento de dados

Inicialmente foi efetuado um levantamento de dados documentais arquivados no Laboratório de Microrganismos de Referência relativos às cepas bacterianas pertencentes ao estudo através dos seus números de registro INCQS e número correlacionado ATCC. Foram avaliados o registro de produção de lote e os testes de controle de qualidade realizados pós liofilização, como: Pureza, Viabilidade e Autenticação.

3.2.1 Meios de Cultivo e condições de crescimento

A partir do número do lote de cada cepa bacteriana foram obtidos os seus informes técnicos, disponíveis no banco de dados INFOGER_BAC. Estas informações permitiram definir as condições de crescimento de cada microrganismo (atmosfera, temperatura, tempo de incubação e meios de cultura). Tais informações foram resumidas no APÊNDICE B (FIALHO, 2010).

Os meios utilizados – Ágar e Caldo Nutriente; TSA/TSB; Ágar e Caldo Caseína Soja com 5% de sangue desfibrinado; Ágar e Caldo Neomicina; Ágar e Caldo BHI; Ágar e Caldo RCM; Ágar e Caldo NSMP– que constam nos informes técnicos das cepas bacterianas foram produzidos segundo recomendado pela coleção estadunidense ATCC. Suas formulações estão descritas no ANEXO A.

Os microrganismos anaeróbios analisados nesse estudo foram incubados nas condições de crescimento recomendadas de acordo com o APÊNDICE B. A atmosfera de anaerobiose foi obtida pela utilização do gerador de anaerobiose Anaerobac® (Probac, Brasil) e confirmada pela fita indicadora de desempenho Anaerotest® (Merck, Alemanha) em jarras de anaerobiose, conforme instruções do fabricante.

3.3 Reconstituição do liófilo

A abertura da ampola, contendo o microrganismo liofilizado, foi realizada em condições assépticas, conforme POP INCQS 65.3230.006 revisão 05, anexo F (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018f).

A preparação da suspensão bacteriana foi realizada através da reconstituição do liófilo em 0,5 mL do meio líquido recomendado de acordo com o APÊNDICE B. Em

seguida, foi homogeneizada suavemente a suspensão bacteriana com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

O controle da esterilidade do meio de cultura utilizado para a reconstituição do líofilo foi realizado pela inoculação de 0,1 mL do meio recomendado em 5 mL de TSB seguida de incubação em estufa bacteriológica a $36,5\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$ por 48 horas e consequente inspeção visual de turbidez. Essa análise foi realizada previamente a realização dos ensaios. A turvação do meio líquido (TSB) é indicativa de contaminação e esse meio não seria utilizado.

3.4 Testes de Pureza, Viabilidade e Autenticação

Após a produção de cada lote das cepas bacterianas estudadas, testes de conformidade foram empregados. Esses mesmos testes foram repetidos para essas cepas, já produzidas, no presente estudo. A conformidade dessas cepas bacterianas foi avaliada por Testes de Pureza, Viabilidade e Autenticação estabelecidos nos POPs do INCQS n.º 65.3230.045 rev. 2 e n.º 65.3230.047 rev. 1 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018b).

O teste de pureza consiste na avaliação do crescimento de colônias apresentando morfologia com características específicas da cepa bacteriana em meio sólido. A viabilidade é expressa pela quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) e a autenticação bioquímica confirma a identidade da cepa bacteriana.

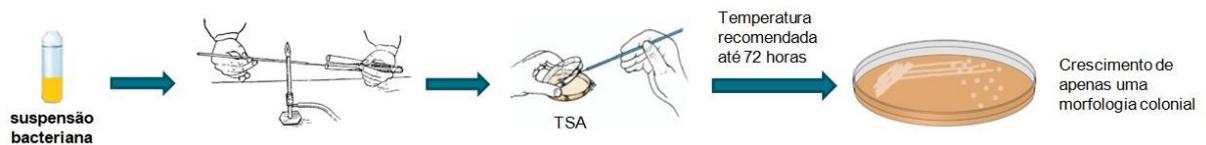
3.4.1 Teste de Pureza

A pureza da cepa bacteriana foi determinada através da homogeneização e inoculação de uma gota da suspensão bacteriana em uma placa de Petri contendo Ágar Caseína Soja pela técnica de semeadura por esgotamento, fazendo estrias com a alça bacteriológica sob a superfície do meio. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $36,5\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$, em aerobiose, por até 72 horas, conforme descrito no POP do INCQS POP 65.3230.045 rev. 2. Após o período de incubação, foi avaliado o padrão de crescimento colonial (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a).

Os microrganismos anaeróbios foram incubados, concomitantemente, em duas condições atmosféricas de crescimento. Em aerobiose, segundo o critério do POP, para avaliar a presença de contaminantes aeróbios. Como também em atmosfera de anaerobiose na temperatura recomendada no informe técnico para cada cepa bacteriana (37°C), para avaliar a presença de contaminantes anaeróbios.

A metodologia do Teste de Pureza está esquematizada na figura 1.

Figura 1 - esquematização da metodologia do Teste de Pureza.



Fonte: (Do autor, 2019).

3.4.2 Teste de Viabilidade

Para a realização do teste de viabilidade foi transferido 0,1 mL da suspensão bacteriana, produzida conforme o item 3.3, para um tubo de ensaio contendo 9,9 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% (diluição 10^{-2}). A partir da primeira diluição (10^{-2}), foram realizadas novas diluições decimais seriadas até 10^{-6} , transferindo sucessivamente 0,5 mL para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85%.

Em seguida, após homogeneização foram inoculados 100µL das três maiores diluições (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}), em duplicata, em placas de Petri contendo os meios de cultura sólidos recomendados pela instituição fornecedora, pela técnica de espalhamento com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica nas condições de crescimento recomendadas (APÊNDICE B).

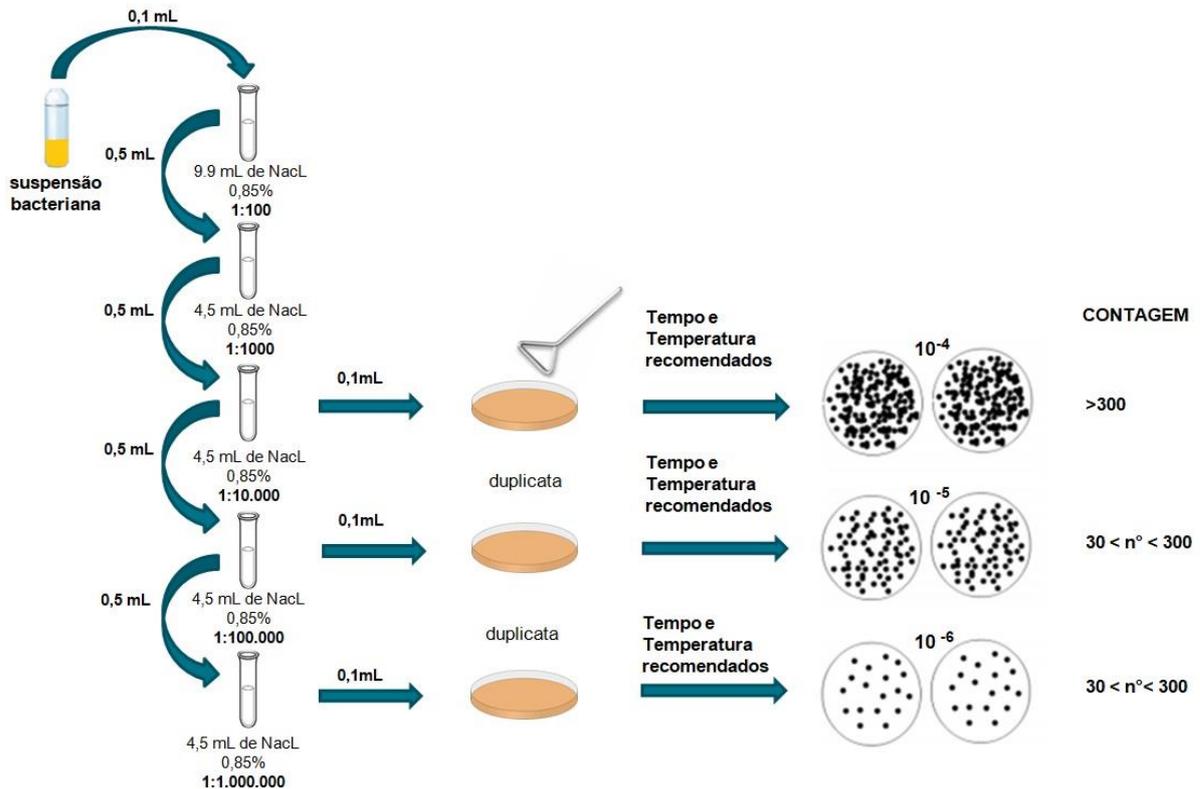
Após o período de incubação, foi realizada a contagem de colônias na diluição em que o número de colônias por placa estivesse entre 30 e 300. O valor final da contagem, em UFC/mL, foi obtido através da média aritmética das réplicas multiplicado pelo fator de diluição, sendo expresso em notação científica.

O controle da esterilidade das soluções de cloreto de sódio a 0,85% e 0,45% (item 3.4.3.2) foi realizado através da inoculação de 0,1 mL da solução salina em 5 mL de TSB seguida de incubação em estufa bacteriológica a $36,5\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$ por 48

horas e consequente observação de turbidez. Essa análise foi realizada previamente a realização dos ensaios. A turvação do meio líquido (TSB) é indicativa de contaminação e essa solução salina não seria utilizada.

A metodologia do Teste Viabilidade está esquematizada na figura 2.

Figura 2 - Esquematização da metodologia do Teste de Viabilidade.



Fonte: (Do autor, 2019).

3.4.3 Autenticação

A autenticação das cepas bacterianas foi realizada por identificação bioquímica.

Após homogeneização, foi inoculada uma gota da suspensão bacteriana, reconstituída a partir do líofilo, conforme o item 3.3, em uma placa de Petri contendo o meio de cultura sólido recomendado nos informes técnicos (APÊNDICE B), pela técnica de semeadura por esgotamento, fazendo estrias com a alça bacteriológica sob a superfície do meio. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica nas condições de crescimento recomendadas de acordo com o APÊNDICE B.

Após o período de incubação, foi realizada uma triagem inicial através das características microscópicas (morfotintoriais) das cepas.

3.4.3.1 Análise Microscópica

A análise microscópica, bacterioscopia, foi realizada pelo do Método de Coloração de Gram, com posterior visualização das estruturas bacterianas ao microscópio óptico.

Essa metodologia possui como princípio para a coloração a diferença morfológica da parede celular entre as bactérias e, assim, diferente grau de permeabilidade, dividindo as bactérias em dois grandes grupos: gram positivas e gram negativas, de acordo com sua característica morfotintorial. As bactérias gram positivas possuem em sua parede celular uma espessa camada de peptidoglicano, ácidos teicóicos e ácidos lipoteicóicos, característica que propicia reter o cristal violeta. Já as bactérias gram negativas possuem como composição de sua parede celular uma fina camada de peptidoglicano, fosfolipídeos, lipopolissacarídeos (LPS) e lipoproteínas, e, por possuírem uma parede celular mais permeável, são descoradas pelo álcool-acetona e posteriormente coradas pela Safranina. (BEVERIDGE, 2001)

A coloração pelo método de Gram foi realizada conforme o Procedimento de Uso do INCQS PU 3210.102 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018g), descrita detalhadamente a seguir:

Foi preparado, sobre uma lâmina, um esfregaço a partir do crescimento bacteriano (item 3.4.3) com uma gota de solução de cloreto de sódio a 0,85% e esta foi deixada secar a temperatura ambiente. O material foi fixado na lâmina por aquecimento em bico de Bunsen.

A lâmina contendo o esfregaço bacteriano foi coberta com solução Cristal Violeta e incubada em temperatura ambiente por 1 minuto. Após lavagem em água destilada, a amostra foi coberta com solução Lugol por 1 minuto. Em seguida foi lavado com água e coberto com solução álcool-acetona (60%-40%), a qual foi retirada imediatamente com água. Por fim, foi aplicada solução Safranina por 30 segundos e lavada com água. Após a bateria de coloração, o esfregaço foi examinado no microscópio óptico no aumento de 1000x com óleo de imersão.

3.4.3.2 Identificação Bioquímica

A identificação bioquímica foi realizada através do sistema automatizado VITEK® 2 (bioMérieux, Lyon, França), o qual consiste na utilização de cartões específicos contendo provas bioquímicas e enzimáticas miniaturizadas. Cumpre destacar que o sistema VITEK® 2 é validado para testes microbiológicos clínicos e industriais (TSUKIMOTO, 2018).

O teste foi realizado segundo o PU INCQS 3230.031 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018h), descrito resumidamente a seguir:

A partir das características morfotintoriais e metabólicas foram selecionados os cartões apropriados para a identificação automatizada de cada cepa bacteriana, de acordo com a quadro 1. Os cartões utilizados para cada microrganismo, tal como suas características morfotintoriais estão descritos na tabela 2. Cada cartão possui poços com até 64 reagentes colorimétricos liofilizados específicos para um determinado grupo de microrganismos e um código de barras com um identificador exclusivo à amostra. As provas bioquímicas contidas em cada cartão VITEK® 2, tal como os microrganismos corretamente identificados pelos mesmos, estão descritas nos ANEXOS C e B, respectivamente.

Quadro 1 - Cartões específicos VITEK® 2 relacionado às características morfotintoriais e metabólicas dos microrganismos.

Cartões VITEK® 2	Microrganismos
GP ID	Cocos Gram Positivos e Bacilos não produtores de esporos
GN ID	Fermentadores Gram Negativos e Bacilos não fermentadores.
BCL ID	Bacilos Gram Positivos formadores de esporos
ANC ID	Anaeróbias e corineformes

Fonte: (Adaptado de PINCUS, 2006).

A partir do crescimento por esgotamento em meio sólido recomendado, nas condições de crescimento específicas, (item 3.4.3) foram preparados inóculos em 3 mL de solução salina a 0,45% em uma faixa específica de turbidez na Escala de MacFarland de acordo com o cartão utilizado, conforme o quadro 2, com o auxílio do equipamento *densichek* (bioMérieux).

Quadro 2 - Faixa de turbidez da suspensão bacteriana usada para inoculação do cartão específico VITEK® 2.

Cartões VITEK® 2	Faixa de turbidez na escala de MacFarland
GP ID	0.50 – 0.63
GN ID	0.50 – 0.63
BCL ID	1.80 – 2.20
ANC ID	2.70 – 3.30

Fonte: (Adaptado de INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018h)

As suspensões bacterianas, juntamente com os cartões específicos, foram colocadas em um cassete e inseridas manualmente no equipamento VITEK® 2compact, onde as suspensões, através de vácuo, foram distribuídas para os poços dos cartões.

O equipamento mede a atividade metabólica do microrganismo através de um sistema óptico de transmitância que permite a interpretação das reações bioquímicas usando diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Os resultados das provas bioquímicas contidas nos cartões são contrapostos ao banco de dados do equipamento (software Advanced Expert System™) para a emissão de um relatório com o resultado final da identificação e das provas bioquímicas em até 18 horas.

Para os microrganismos de referência anaeróbios foi necessário fornecer manualmente informações complementares, como características morfotintoriais (visualizadas pela coloração de Gram) e metabólicas (grau de aero tolerância), para que o sistema correlacione com o seu banco de dados e conclua seus resultados.

Para os Bacilos Gram positivos utilizados no estudo que produzem esporos: *Bacillus atrophaeus* (ID INCQS 349), *Bacillus cereus* (ID INCQS 3), *Bacillus cereus* (ID INCQS 435), *Bacillus mycoides* (ID INCQS 419), *Bacillus subtilis* (ID INCQS 1),

Bacillus subtilis (ID INCQS 2), *Bacillus thurigiensis* (ID INCQS 213), *Geobacillus stearothermophilus* (ID INCQS 144), foi utilizado para a identificação bioquímica o cartão VITEK® 2BCL, conforme tabela 2 (GUIZELINI, 2010; RABINOVITCH, 2015).

3.4.4 Teste de esporulação

A confirmação da esporulação foi realizada de modo complementar ao trabalho através de um repique a partir do crescimento bacteriano em um tubo inclinado com o meio de cultivo sólido Ágar Nutriente adicionado de metais, o qual simula situações adversas ao microrganismo e induzem a formação de endósporos, e incubado a 37°C por 7 dias. Após o tempo de incubação, foi confeccionada uma lâmina e corada através do método de coloração de endósporos de Wirtz-Conklin. Esse consiste em um método de coloração a quente que utiliza Verde Malaquita como corante primário e Fucsina como corante de contraste. Ao exame no microscópio óptico, no aumento de 1000x, com óleo de imersão as células vegetativas apareceram coradas em vermelho e os endósporos em verde (TRENTO, 2018).

Cumprе ressaltar que o teste da esporulação não foi realizado para a cepa *Geobacillus stearothermophilus* (ID INCQS 144), pois a metodologia empregada não se aplica para o mesmo, visto sua temperatura de incubação.

3.4.5 Critérios de aceitabilidade dos resultados

Segundo os POPs do INCQS 65.3230.045 e 65.3230.047 para serem consideradas satisfatórias, as cepas bacterianas devem possuir resultados conformes nos três testes realizados: Pureza, Viabilidade e Autenticação ou deverá ser aberta uma nova ampola do mesmo lote para repetir os testes. Esse procedimento deverá ser repetido até que uma ampola apresente resultado satisfatório nos três ensaios. Caso essa conformidade não seja alcançada, deverão ser abertas de 3 a 5 ampolas e todas apresentarem resultado insatisfatório para considerar o lote insatisfatório (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a, 2018b).

Para o Teste de Pureza foi considerado como critério de aceitação que as colônias apresentem morfologia de crescimento colonial com características específicas da cepa bacteriana, previamente identificada, isenta de contaminação.

Para o Teste de Viabilidade foi considerado como critério de aceitação que a cepa bacteriana possuísse crescimento em diluição superior ou igual a 10^{-4} .

Para a autenticação foi considerado como critério de aceitação que a cepa bacteriana apresentasse características microscópicas esperadas e para a identificação bioquímica um resultado igual ou superior a 85% de probabilidade de discriminação com o banco de dados do sistema do VITEK® 2 (gerenciado pelo software Advanced Expert System™) de ser o microrganismo esperado.

O banco de dados permite a classificação dos resultados em 4 grupos: Identificação correta (excelente, muito bom, bom e aceitável), baixa discriminação, erro de identificação e não identificado. A estratificação do nível de confiança do resultado fornecido pelo sistema VITEK® 2 é descrito no quadro 3 (RENNIE et al., 2008).

Quadro 3 - Nível de estratificação de confiança de identificação do sistema do VITEK® 2 considerado pela fabricante

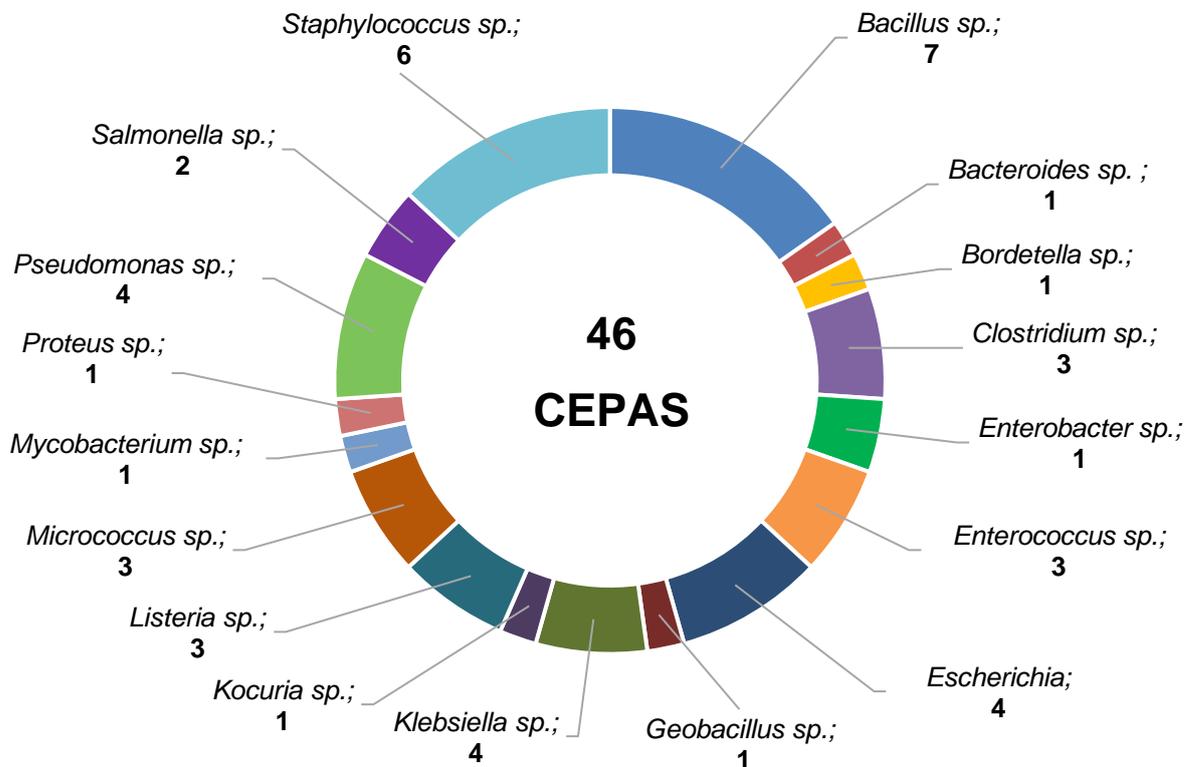
Nível de confiança de identificação	Possibilidades	% de Probabilidade	Comentários
Excelente	1	96 - 99	-
Muito Bom	1	93 - 95	-
Bom	1	89 - 92	-
Aceitável	1	85 - 88	-
Baixa discriminação	2 - 3	Soma das opções = 100 Após a resolução para uma opção, a porcentagem de probabilidade reflete o número associado às opções selecionadas.	2 - 3 táxons exibem o mesmo biopadrão. Separar por testes complementares
Organismo não identificado	>3 ou 0	-	>3 táxons exibem o mesmo biopadrão Ou Biopadrão muito atípico. Não corresponde a nenhum táxon no banco de dados.

Fonte: (Adaptado de PINCUS, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as cepas bacterianas utilizadas, pode-se agrupar taxonomicamente as cepas de acordo com o seu gênero, conforme gráfico 2. Sendo *Bacillus sp.* e *Staphylococcus sp.* os gêneros que possuem maior número de cepas bacterianas analisadas com 7 e 6 cepas, respectivamente.

Gráfico 2 - Distribuição das cepas bacterianas por gênero bacteriano.



Fonte: (Do autor, 2019).

4.1 Levantamento de dados

As informações relativas às cepas bacterianas utilizadas neste trabalho foram pesquisadas nos arquivos documentais da CBRVS - Fiocruz, a fim de determinar o registro da produção das cepas a serem testadas. O levantamento mostrou a origem de 29 cepas corretamente, 1 cepa apresentou incoerência nos dados, 7 cepas apresentaram duplicidade de registros quanto a origem e não foram encontrados os documentos relativos a 9 cepas. A incoerência apresentada deve-se ao fato da cepa *Micrococcus yunnanensis* (ID INCQS 0009) apresentar espécie diferente para o

mesmo número de origem ATCC. Esse fato pode ser explicado devido a cepa *Micrococcus yunnanensis* ser um sinônimo taxonômico homotípico de *Micrococcus luteus*, por serem próximos fenotípica e geneticamente.

Segundo estudo feito por HUANG et al (2019) foi visto, através de análises de sequência multilocus (MLST), que *Micrococcus aloeverae*, *Micrococcus luteus* e *Micrococcus yunnanensis* podem ser classificados dentro de uma mesma espécie. A comparação dos genomas, através da análise da sequência 16s rRNA e três genes constitutivos, das três cepas indicou que essas podem ser combinadas dentro de uma única espécie. Foram realizadas, também, análises de composição de ácidos graxos e caracterização fenotípica, sendo a última realizada de forma Bioquímica usando o cartão GP ID do sistema VITEK® 2. Nos dois testes as três cepas apresentaram o mesmo perfil nos resultados. Isso explica a incoerência de informações achada, para o mesmo número ATCC ter no registro uma espécie diferente. Desse modo, seria interessante acrescentar essa informação na CBRVS-Fiocruz, colocando os nomes como sinônimo homotípico.

Algumas cepas INCQS apresentaram duplicidade quanto ao seu depósito, ou seja, possuem registros diferentes na coleção, porém são provenientes da mesma origem. Este fato é facilmente explicado, pois o INCQS adquire microrganismos de coleções certificadas e, às vezes, o faz mais de uma vez para um mesmo microrganismo. Assim, lotes diferentes de um mesmo microrganismo adquirido, geram na coleção uma nova produção e cepas com um novo número de registro INCQS.

Os resultados dos testes de conformidade, realizados após a produção, estão descritos nos certificados de análise das cepas estudadas. Nesses certificados os resultados apresentaram que as cepas estavam de acordo com os critérios de aceitação para os três parâmetros: pureza, viabilidade e autenticidade.

4.2 Testes de Pureza, Viabilidade e Autenticação

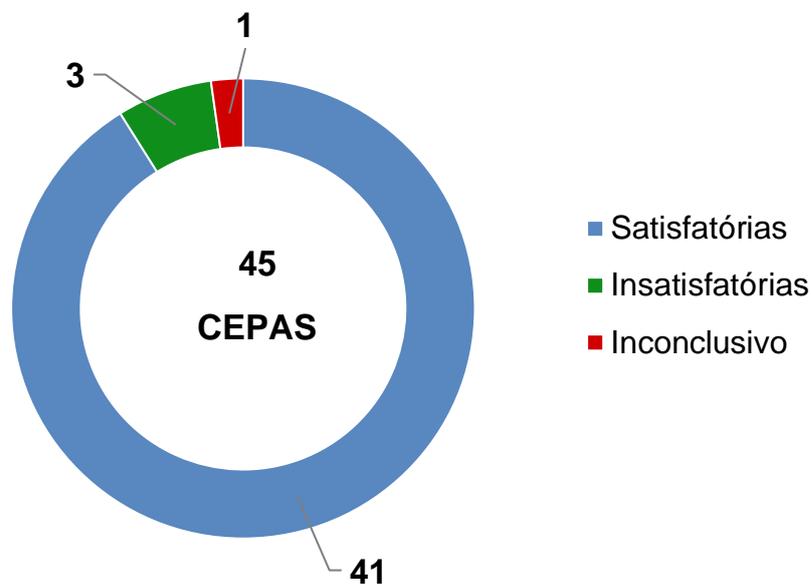
Não foi possível realizar os ensaios de controle de qualidade da amostra *Micrococcus luteus* (ID INCQS 12) por ausência de insumo necessário para os testes. Dessa forma, foram consideradas para os ensaios de pureza, viabilidade e autenticação 45 lotes de cepas bacterianas.

Os resultados dos testes de controle de esterilidade dos meios líquidos utilizados para a reconstituição dos líofilos (item 3.3) e da solução de cloreto de sódio

a 0,85% para a diluição seriada no Teste de Viabilidade (item 3.4.2) foram considerados satisfatórios, não apresentando turvação no meio líquido.

De acordo com o critério de aceitação utilizado para a conformidade das cepas bacterianas (item 3.4.5), 3 cepas (7%) foram consideradas insatisfatórias, 41 cepas (91%) satisfatórias e 1 (2%) cepa obteve resultado considerado inconclusivo quanto a sua conformidade, segundo os testes realizados, conforme mostrado no gráfico 3.

Gráfico 3 - Resultados dos testes de conformidade das cepas bacterianas utilizadas.



Fonte: (Do autor, 2019).

4.2.1 Cepas consideradas insatisfatórias quanto à conformidade.

As cepas consideradas insatisfatórias quanto a sua conformidade foram: *Bacteroides vulgatus* (ID INCQS 59), *Clostridium sporogenes* (ID INCQS 352) e *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae* (ID INCQS 30).

A cepa *Bacteroides vulgatus* (ID INCQS 59) não apresentou crescimento bacteriano nos Testes de Pureza e Viabilidade na primeira abertura de ampola, com isso, não foi possível realizar o teste de autenticação. Desse modo, foi considerada insatisfatória para os três testes. Nas segunda e terceira aberturas de ampolas do mesmo lote, apresentou o mesmo padrão de resultado da primeira abertura. Sendo assim, considerada insatisfatória, conforme item 3.4.5. Para essa cepa foram realizados testes de conformidade utilizando os dois meios de cultura recomendados

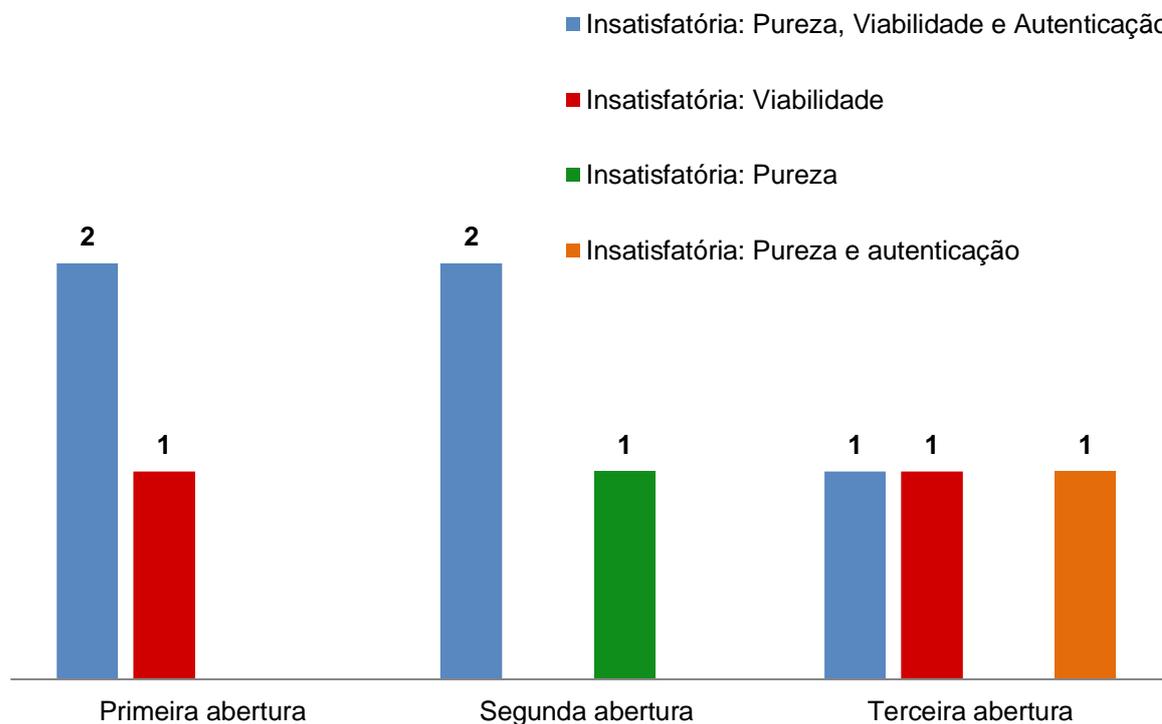
no informe técnico (APÊNDICE B) e a mesma não apresentou crescimento bacteriano em nenhum dos meios utilizados. Diante disso, depreende-se que a cepa não está viável.

A cepa *Clostridium sporogenes* (ID INCQS 352) apresentou na primeira abertura de ampola (contendo o microrganismo liofilizado) crescimento sem contaminação no Teste de Pureza, sendo considerada satisfatória, porém não apresentou crescimento bacteriano no Teste de Viabilidade, sendo assim considerada insatisfatória para esse teste. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa não apresentou crescimento bacteriano nos Testes de Pureza e Viabilidade, com isso, não foi possível realizar o Teste de Autenticação, sendo considerada insatisfatória para os três testes empregados. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou o mesmo padrão de resultado obtido na primeira abertura. Foi realizada a identificação bioquímica da cepa bacteriana, através do sistema automatizado VITEK® 2, o qual identificou com 95% probabilidade como Grupo *Clostridium*. A cepa não foi considerada viável segundo critério de aceitação utilizado (crescimento igual ou superior a 10^4 UFC/mL). Sendo assim, considerada insatisfatória, conforme item 3.4.5.

A cepa *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (ID INCQS 30) não apresentou crescimento bacteriano na primeira abertura de ampola nos Testes de Pureza e Viabilidade, não sendo possível realizar o Teste de Autenticação, sendo considerada insatisfatória para os três testes. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou mais de uma morfologia colonial de crescimento, indicativo de contaminação, nos Testes de Pureza e Viabilidade, sendo considerada insatisfatória quanto ao Teste de Pureza. Nas terceira e quarta abertura de ampolas do mesmo lote, apresentou o mesmo padrão de contaminação avaliado na segunda abertura. Foi realizada a identificação do contaminante de forma bioquímica através do sistema automatizado VITEK® 2, o qual identificou como grupo *Moraxella*. Também foi realizada a identificação bioquímica da cepa bacteriana, através do mesmo sistema, o qual identificou com 95% probabilidade como *Klebsiella pneumoniae subsp. Ozaenae*, resultado que pode ter sido afetado pela presença da contaminação. Sendo assim, essa cepa foi considerada insatisfatória, conforme item 3.4.5, pois não apresentou satisfatoriedade nos três testes de conformidade empregados.

As 3 cepas que foram consideradas insatisfatórias nos testes de conformidade em, pelo menos, 3 aberturas de ampolas do mesmo lote, se comportaram da seguinte forma: Na primeira abertura de uma ampola, 2 cepas foram consideradas insatisfatórias nos três Testes (Pureza, Viabilidade e Autenticação) e 1 cepa foi considerada insatisfatória no Teste de Viabilidade. Na segunda abertura de uma ampola, 2 cepas foram consideradas insatisfatórias nos três Testes (Pureza, Viabilidade e Autenticação) e 1 cepa foi considerada insatisfatória no Teste de Pureza. Na terceira abertura de uma ampola, 1 cepa foi considerada insatisfatória nos três testes empregados, 1 cepa foi considerada insatisfatória no Teste de Viabilidade e 1 cepa foi considerada insatisfatória nos Testes de Pureza e Autenticação, conforme mostrado no gráfico 4.

Gráfico 4 - Insatisfatoriedade apresentada pelas cepas, consideradas reprovadas quanto a sua conformidade (item 3.4.5), em cada abertura de ampola.



Fonte: (Do autor, 2019).

4.2.2 Cepa considerada inconclusiva quanto à conformidade.

A cepa *Mycobacterium smegmatis* (ID INCQS 21) obteve resultado considerado inconclusivo quanto a sua conformidade. Essa cepa apresentou mais uma morfologia colonial de crescimento, indicativo de contaminação, na primeira abertura de uma ampola, sendo considerada reprovada quanto ao teste de pureza. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa não apresentou crescimento bacteriano nos Testes de Pureza e Viabilidade, não sendo possível realizar o Teste de Autenticação, sendo considerada insatisfatória para os três testes. Nas terceira e quarta aberturas de ampolas do mesmo lote a cepa apresentou crescimento bacteriano nos Testes de Pureza e Viabilidade, com apenas uma morfologia de crescimento colonial, sem indicativo de contaminação, e contagem de $1,4 \times 10^8$ UFC/mL, porém não apresentou resultado no Teste de Autenticação, visto que a metodologia de identificação bioquímica empregada nesse estudo não se aplica para essa cepa, apesar de ter apresentado características microscópicas (Bacilo gram positivo) conforme o esperado.

Conforme PINCUS, 2006 (ANEXO B, item 2), essa cepa não está no escopo de microrganismos corretamente identificados no Cartão VITEK® 2 GP ID. O *Mycobacterium smegmatis* pertence a um grupo denominado Micobactérias Não Tuberculosas (MNT), é uma cepa cromogênica de crescimento rápido. Possui como principais características bioquímicas o crescimento em concentração de 5% de cloreto de sódio, teste da arilsulfatase (enzima que degrada ésteres-sulfatos) negativo (3 dias), redução de nitrato positivo e crescimento até 45°C (RODRIGUES, 2012).

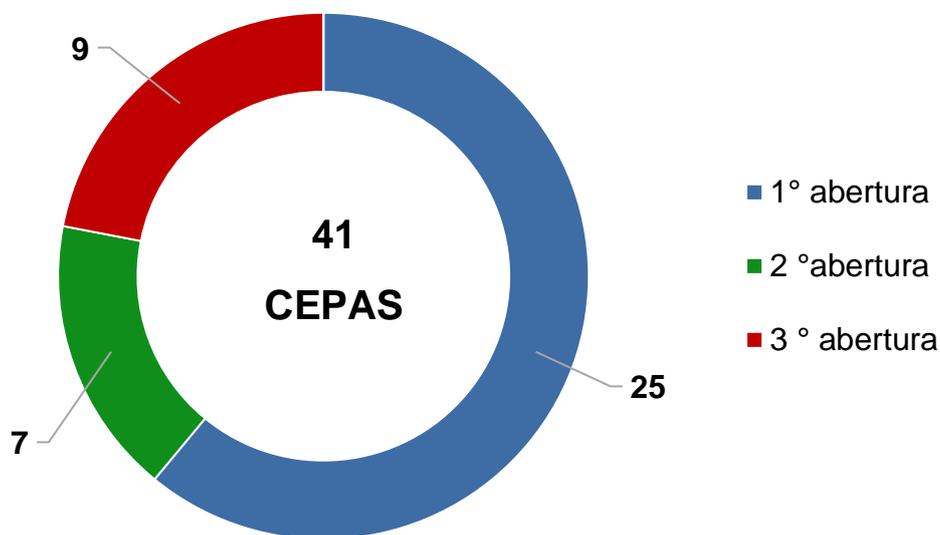
Entretanto, apenas as provas bioquímicas não são suficientes para identificar essas espécies das demais do mesmo gênero, sendo necessário a utilização de métodos de biologia molecular, como Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) ou sequenciamento específico do gene 16S rRNA, sequência altamente conservada em cada espécie e essencial para a sobrevivência das bactérias (Kolk, 1994).

Dessa forma, para ser considerada satisfatória, conforme item 3.4.5, será necessária a utilização de metodologia de biologia molecular capaz de identificar essa cepa. A identificação de bactérias por sequenciamento de genes funcionais é descrita no POP 65.3230.046 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017).

4.2.3 Cepas consideradas satisfatórias quanto à conformidade.

Das cepas bacterianas consideradas satisfatórias (41 cepas), 25 cepas (61%) foram consideradas satisfatórias na abertura de uma ampola, 7 cepas (17%) na abertura de uma segunda ampola do mesmo lote e 9 cepas (22%) na abertura de uma terceira ampola do mesmo lote, como mostrado no gráfico 5.

Gráfico 5 - Satisfatoriedade das cepas bacterianas de acordo com o número de abertura de ampolas.



Fonte: (Do autor, 2019).

4.2.3.1 Cepas consideradas satisfatórias na primeira abertura de uma ampola

As cepas bacterianas *Bacillus atrophaeus* (ID INCQS 349), *Bacillus cereus* (ID INCQS 435), *Bacillus mycoides* (ID INCQS 419), *Bacillus subtilis* (ID INCQS 2), *Enterobacter cloacae* (ID INCQS 74), *Escherichia coli*(ID INCQS 219), *Escherichia coli* (ID INCQS 31), *Escherichia coli* (ID INCQS 32), *Escherichia coli* (ID INCQS 33), *Enterobacter aerogenes* (ID INCQS 145), *Kocuria rhizophila* (ID INCQS 10), *Listeria ivanovii* (ID INCQS 355), *Listeria monocytogenes* (ID INCQS 266), *Micrococcus yunnanensis* (ID INCQS 9), *Proteus hauseri* (ID INCQS 106), *Pseudomonas aeruginosa* (ID INCQS 25), *Salmonella enterica subsp. Enterica*(ID INCQS 28), *Salmonella enterica subsp. Enterica* (ID INCQS 150), *Staphylococcus aureus* (ID

INCQS 358), *Staphylococcus aureus* (ID INCQS 402), *Staphylococcus aureus* (ID INCQS 13), *Staphylococcus aureus* (ID INCQS 15) e *Staphylococcus epidermidis* (ID INCQS 16) apresentaram na primeira abertura de ampola crescimento no Teste de Pureza e Viabilidade, com uma única morfologia colonial, sem indicativo de contaminação, apresentaram contagem de colônias superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e resultado satisfatório no Teste de Autenticação, nas características microscópicas e identificação bioquímica, sendo consideradas satisfatórias nos três testes de conformidade empregados. Sendo assim, foram consideradas satisfatórias quanto a sua conformidade, segundo o item 3.4.5. Os seus respectivos resultados nos Testes de Viabilidade e Autenticação estão contidos nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

A cepa *Pseudomonas aeruginosa* (ID INCQS 99) apresentou nos Testes de Pureza e Viabilidade, na primeira abertura de ampola, aparentemente, crescimento de mais de uma morfologia colonial, o que seria indicativo de contaminação. Entretanto, ao realizar a identificação bioquímica e microscópica através do sistema VITEK® 2 da cepa e da suposta contaminação, foi constatado que as duas colônias eram *Pseudomonas aeruginosa*. Sendo assim, considerada satisfatória segundo o item 3.4.5.

A cepa *Micrococcus luteus* (ID INCQS 11) apresentou crescimento bacteriano, sem indicativo de contaminação, nos Testes de Pureza e Viabilidade em período de tempo superior ao descrito nos informes técnicos (APÊNDICE B). Apresentou contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação. O crescimento bacteriano em tempo superior ao descrito pode ser explicado pelo fato do tempo de crescimento informado ser uma estimativa baseada em uma média dos tempos de geração, normalmente na fase Log (fase de crescimento exponencial) de diferentes microrganismos da mesma espécie. Outros fatores também podem influenciar no tempo de geração do microrganismo, tal como: temperatura e formulação do meio de cultura (por exemplo, pH), a qual pode apresentar pequenas variações mesmo sendo preparados a partir de protocolos de forma padronizada. O tempo de crescimento também dependerá da fase do ciclo de vida bacteriano que o microrganismo se encontrava quando foi submetida ao processo de preservação, nesse caso liofilização. É recomendado que o microrganismo esteja na fase de crescimento exponencial ao ser liofilizado, porém não é possível precisar ao certo. Diante disso, pode haver

variações entre microrganismos da mesma espécie quanto ao tempo de crescimento. Assim, mesmo apresentando crescimento bacteriano superior ao tempo descrito no informe técnico a cepa foi considerada satisfatória quanto a sua conformidade.

Há na literatura um processo de modificação da nomenclatura da cepa *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048 – ID INCQS 145), a qual seria transferida para o gênero *Klebsiella*, com base no mesmo tipo nomenclatural, sendo criada uma nova combinação, *Klebsiella aerogenes*. Essa modificação já foi validamente publicada. Atualmente, *Klebsiella aerogenes* é aceito como um sinônimo heterotípico de *Enterobacter aerogenes*, o qual funciona como um basônimo para a mesma. Diante disso, cabe ressaltar que seria interessante a atualização dessa nomenclatura (*Klebsiella aerogenes*) no catálogo da CBRVS-Fiocruz (OREN, A e GARRITY G.M, 2017; TINDALL, 2017).

A cepa *Micrococcus yunnanensis* (ID INCQS 9) conforme mencionado anteriormente (item 4.1) é um sinônimo homotípico de *Micrococcus luteus*. Esse fato explica o resultado da identificação bioquímica dessa cepa bacteriana pelo sistema VITEK® 2 como *Micrococcus luteus* (tabela 2), visto que as duas cepas possuem o mesmo perfil bioquímico.

As cepas *Salmonella enterica subsp. enterica* (ID INCQS 28) e *Salmonella enterica subsp. enterica* (ID INCQS 150), antes denominadas *Salmonella choleraesuis* e *S. typhimurium*, respectivamente, pertencem à família Enterobacteriaceae. Sua taxonomia passou por um processo de revisão e é complexa. De acordo com a nomenclatura atual adotada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o gênero compreende duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica*, as quais possuem 2.463 sorogrupos definidos com base nos antígenos somáticos O (lipopolissacarídeo) e H flagelar. A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies diferenciadas bioquimicamente e por relação genômica denominadas com um numeral romano e um nome: I, *S. enterica subsp. enterica*; II, *S. enterica subsp. salamae*; IIIa, *S. enterica subsp. arizonae*; IIIb, *S. enterica subsp. diarizonae*; IV, *S. enterica subsp. houtenae*; e VI, *S. enterica subsp. indica*. As espécies conhecidas anteriormente como *S. typhimurium* e *S. choleraesuis*, com a reclassificação taxonômica, são atualmente consideradas sorogrupos da espécie I *Salmonella enterica subespécie entérica* (BRENNER, 2000; TINDALL et al, 2005).

Diante disso, o sistema VITEK® 2 identificou as cepas bacterianas do gênero *Salmonella* como *S. enterica subsp. enterica*. (tabela2), a nível de subespécie. A

identificação dos sorogrupos é realizada por sorologia, o que foge ao escopo da metodologia da identificação Bioquímica empregada nesse trabalho. O próprio sistema VITEK® 2 em seu relatório sugere que é necessária a realização de ensaios sorológicos complementares para a confirmação e identificação nesse nível de precisão (sorogrupo). Os testes sorológicos não são implementados na rotina do laboratório e, por isso, não foi possível a sua realização.

4.2.3.2 Cepas consideradas satisfatórias na segunda abertura de ampola

As cepas bacterianas *Bacillus thuringiensis* (ID INCQS 213), *Clostridium sporogenes* (ID INCQS 60), *Enterococcus faecium* (ID INCQS 71), *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (ID INCQS 147), *Raoultella planticola* (ID INCQS 90), *Pseudomonas aeruginosa* (ID INCQS 230) e *Staphylococcus aureus* (ID INCQS 39), foram consideradas satisfatórias, conforme item 3.4.5, apenas nos testes realizados na segunda abertura de ampola, do mesmo lote, contendo a cepa liofilizada. Os resultados dos Testes de Viabilidade e Autenticação (características microscópicas e identificação bioquímica) de cada cepa bacteriana estão contidos nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

A cepa *Bacillus thuringiensis* (ID INCQS 213) apresentou na primeira abertura de ampola apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, no Teste de Pureza, sendo considerada satisfatória quanto à pureza, porém não apresentou crescimento bacteriano no Teste de Viabilidade, sendo assim considerada insatisfatória para esse teste. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou resultado satisfatório para os três testes empregados, apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo considerada satisfatória conforme o item 3.4.5.

A cepa *Clostridium sporogenes* (ID INCQS 60) apresentou mais de uma morfologia colonial de crescimento, indicativo de contaminação, nos Testes de Pureza e Viabilidade, sendo considerada insatisfatória no Teste de Pureza. Também não apresentou resultado na identificação bioquímica, no Teste de Autenticação, onde o equipamento VITEK® 2 compact recusou o cartão durante a análise, não chegando a concluir a mesma. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou

resultado satisfatório para os três testes empregados, apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no teste de autenticação, sendo assim, considerada satisfatória segundo o item 3.4.5.

A cepa *Enterococcus faecium* (ID INCQS 71) apresentou contaminação fúngica na primeira abertura de uma ampola, sendo considerada insatisfatória quanto ao Teste de Pureza. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou resultado satisfatório para os três testes de conformidade empregados, apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo considerada satisfatória conforme o item 3.4.5.

A cepa *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (ID INCQS 147) apresentou mais de uma morfologia colonial de crescimento, indicativo de contaminação, na primeira abertura de ampola, sendo considerada insatisfatória quanto ao Teste de Pureza. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, no Teste de Pureza, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo considerada satisfatória, conforme item 3.4.5.

A cepa *Raoultella planticola* (ID INCQS 90) apresentou na primeira abertura de uma ampola mais de uma morfologia colonial de crescimento, indicativo de contaminação, foi realizada identificação bioquímica da contaminação (Cocos gram positivo) através do Sistema VITEK® 2, o qual identificou como *Staphylococcus gallinarum*, sendo considerada insatisfatória no Teste de Pureza. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou resultado satisfatório para os três testes empregados, apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim, considerada satisfatória segundo o item 3.4.5.

Cumprе ressaltar que essa cepa passou por um processo de reclassificação taxonômica. Membros do atual gênero *Raoultella* eram anteriormente considerados espécies pertencentes ao cluster II do gênero *Klebsiella*. Após extenso avanço nos métodos filogenéticos (sequenciamento do rRNA 16S e rDNA, análise da sequência

da subunidade β polimerase bacteriana), o gênero *Klebsiella* foi revisado e o gênero independente *Raoultella* foi criado em 2001, nome em homenagem ao bacteriologista francês Didier Raoult. Existem semelhanças entre espécies de *R. planticola* e *Klebsiella* em relação a características como proteínas da superfície celular, antígenos capsulares e resistência sérica. Por isso, foi inicialmente denominada *Klebsiella planticola*, entretanto, diferenças nos genes constitutivos 16S rRNA, *rpoB* e *rpoA* levaram a sua reclassificação e criação do gênero. O nome *Raoultella* foi proposto para designar o gênero das espécies que estavam no cluster II do gênero *Klebsiella*, o qual continha *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena* e *K. trevisanii*. Esse fato explica o resultado da identificação bioquímica dessa cepa bacteriana (anteriormente com nomenclatura de *Klebsiella planticola* na CBRVS-Fiocruz) pelo sistema VITEK® 2 como *Raoultella planticola* (tabela 2). Isso deve-se ao fato de uma atualização do banco de dados (software Advanced Expert System™) do sistema para a nova nomenclatura dessa cepa. Essa cepa atualmente já possui nomenclatura atualizada na CBRVS-Fiocruz (Drancourt, 2001).

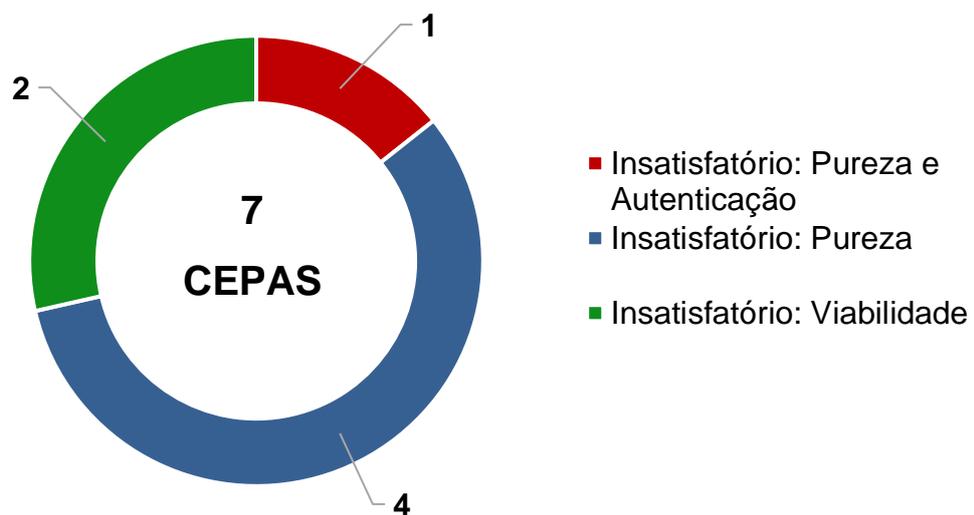
A cepa *Pseudomonas aeruginosa* (ID INCQS 230) apresentou apenas uma morfologia de crescimento colonial, sem indicativo de contaminação, porém as colônias espalharam dentro do tempo de cultivo indicado (24 horas), impossibilitando a contagem de colônias no Teste de Viabilidade. Cabe ressaltar que colônias espalhadas são viáveis, assim essa cepa não pode ser considerada insatisfatória quanto a sua viabilidade. Para mensurar corretamente o número de colônias viáveis e cumprir com o critério de aceitabilidade quantitativo disposto no POP INCQS 65.3230.045 (crescimento bacteriano igual ou superior a 10^4 UFC/mL) foi aberta uma segunda ampola dessa cepa do mesmo lote. Na abertura da segunda ampola, a cepa apresentou apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada satisfatória conforme o item 3.4.5 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a).

A cepa *Staphylococcus aureus* (ID INCQS 39) apresentou na primeira abertura de ampola mais de uma morfologia colonial de crescimento, indicativo de contaminação, foi realizada identificação bioquímica da contaminação (Cocos gram positivo) através do Sistema VITEK® 2, o qual identificou como *Staphylococcus chromogenes*, sendo considerada insatisfatória no Teste de Pureza. Na segunda

abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou resultado satisfatório para os três testes de conformidade empregados, sendo assim, considerada satisfatória segundo o item 3.4.5.

Das 7 cepas consideradas satisfatórias na segunda abertura de ampola do mesmo lote, 2 cepas (29%) apresentaram insatisfatoriedade no Teste de Viabilidade na primeira abertura de uma ampola, 4 cepas (57%) apresentaram insatisfatoriedade no Teste de Pureza na primeira abertura e 1 cepa (14%) apresentou insatisfatoriedade nos Testes de Pureza e Autenticação na primeira abertura de uma ampola, conforme mostrado no gráfico 6.

Gráfico 6 - Insatisfatoriedade apresentada na primeira abertura de uma ampola das cepas consideradas satisfatórias na segunda abertura.



Fonte: (Do autor, 2019).

4.2.3.3 Cepas consideradas satisfatórias na terceira abertura de ampola.

As cepas bacterianas *Bacillus cereus* (ID INCQS 3), *Bacillus subtilis* (ID INCQS 1), *Bordetella bronchiseptica* (ID INCQS 23), *Clostridium sporogenes* (ID INCQS 4), *Enterococcus faecalis* (ID INCQS 17), *Enterococcus hirae* (ID INCQS 19), *Geobacillus stearothermophilus* (ID INCQS 144), *Listeria innocua* (ID INCQS 354) e *Pseudomonas aeruginosa* (ID INCQS 26), foram consideradas satisfatórias, conforme item 3.4.5, apenas na terceira abertura de ampola, do mesmo lote, contendo a cepa liofilizada. Os resultados dos Testes de Viabilidade e Autenticação (características

microscópicas e identificação bioquímica) de cada cepa bacteriana estão contidos nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

A cepa *Bacillus cereus* (ID INCQS 3) não apresentou crescimento bacteriano na primeira abertura de uma ampola nos Testes de Pureza e Viabilidade, não sendo possível realizar o teste de autenticação, sendo considerada insatisfatória para os três testes. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote a cepa apresentou o mesmo padrão de resultado da primeira abertura. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou resultado satisfatório para os três testes empregados, apenas uma morfologia de crescimento colonial, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim, considerada satisfatória segundo o item 3.4.5.

A cepa *Bacillus subtilis* (ID INCQS 1) não apresentou crescimento bacteriano na primeira abertura de uma ampola nos Testes de Pureza e Viabilidade, não sendo possível realizar o Teste de Autenticação, sendo considerada insatisfatória para os três testes. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou o mesmo padrão de resultado da primeira abertura. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou resultado satisfatório para os três testes empregados, apenas uma morfologia de crescimento colonial, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim, considerada satisfatória segundo o item 3.4.5.

A cepa *Bordetella bronchiseptica* (ID INCQS 23) apresentou na primeira abertura de uma ampola crescimento de apenas uma morfologia colonial no Teste de Pureza, sem indicativo de contaminação, e contagem de colônias superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade, sendo assim considerada satisfatória para esses dois testes. Entretanto, no Teste de Autenticação, a identificação bioquímica realizada através do sistema VITEK® 2 identificou a cepa com 97% de probabilidade de ser *Acinetobacter lwoffii*, sendo assim considerada insatisfatória para esse teste.

É descrito em um estudo na literatura, por PANAGOPOULOS et al, 2010, que o sistema VITEK® 2 apresentou identificação sistematicamente errônea de isolados do gênero *Bordetella*, espécie *Bordetella holmesii*, como *Acinetobacter lowoffii* com nível excelente de identificação, porém no estudo conclui-se que esse erro possivelmente ocorreu pela espécie incorretamente identificada não constar no banco

de dados do sistema VITEK® 2, o que não é uma verdade para a cepa *Bordetella bronchiseptica*, conforme ANEXO B, item 3. Diante disso foi realizada uma segunda abertura de ampola do mesmo lote para confirmar se é um erro de identificação característico do sistema. Na segunda abertura, a cepa apresentou mais de uma morfologia colonial de crescimento, indicativo de contaminação, nos Testes de Pureza e Viabilidade, sendo considerada insatisfatória quanto ao Teste de Pureza. Foi realizada a identificação do contaminante (Cocos Gram positivo) de forma bioquímica através do sistema automatizado VITEK® 2, o qual identificou como grupo *Micrococcus*. Também foi realizada a identificação bioquímica da cepa bacteriana, através do mesmo sistema, o qual identificou com 89% de probabilidade como *Pseudomonas luteola*, o resultado que pode ter sido afetado pela presença da contaminação. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa obteve resultados satisfatórios para os três testes de conformidade empregados, apresentando apenas uma morfologia de crescimento colonial, sem indicativo de contaminação, contagem de colônias superior a 10^4 UFC/mL e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada satisfatória segundo o item 3.4.5.

A cepa *Clostridium sporogenes* (ID INCQS 4) apresentou apenas uma morfologia de crescimento colonial no Teste de Pureza e contagem satisfatória no Teste de Viabilidade na primeira abertura de uma ampola, porém não apresentou resultado na identificação bioquímica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada insatisfatória no mesmo. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, apresentou o mesmo padrão de resultado obtido na primeira abertura. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada satisfatória conforme o item 3.4.5.

A cepa *Enterococcus faecalis* (ID INCQS 17) apresentou mais de uma morfologia de crescimento colonial nos Testes de Pureza e Viabilidade, indicativo de contaminação, na primeira abertura de uma ampola, sendo considerada insatisfatória quanto ao Teste de Pureza. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote a cepa não apresentou crescimento bacteriano nos Testes de Pureza e Viabilidade, não sendo possível realizar o Teste de Autenticação, sendo considerada insatisfatória para os três testes. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou

apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada satisfatória conforme o item 3.4.5.

A cepa *Enterococcus hirae* (ID INCQS 19) apresentou apenas uma morfologia de crescimento colonial no Teste de Pureza, sem indicativo de contaminação, e contagem de colônias superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade. Entretanto, não apresentou resultado na identificação bioquímica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada insatisfatória. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou apenas uma morfologia de crescimento colonial, sem indicativo de contaminação, e contagem de colônias superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade, porém apresentou na identificação bioquímica, através do sistema automatizado VITEK® 2, resultado com 93% de probabilidade para *Enterococcus durans*, sendo assim considerada insatisfatória quanto ao Teste de Autenticação. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada satisfatória conforme o item 3.4.5.

Depois de estabilizada a temperatura recomendada no informe técnico (55°C) na estufa bacteriológica, a cepa *Geobacillus stearothermophilus* (ID INCQS 144) não apresentou crescimento bacteriano nos Testes de Pureza e Viabilidade na primeira abertura de uma ampola, impossibilitando assim a realização do Teste de Autenticidade, sendo considerada insatisfatória para os três testes de conformidade empregados. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou uma única morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem de colônias superior a 10^4 UFC/mL, porém na identificação bioquímica realizada no Teste de Autenticação a cepa apresentou resultado de baixa discriminação no Sistema VITEK® 2, sendo considerada insatisfatória nesse teste. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada satisfatória conforme o item 3.4.5.

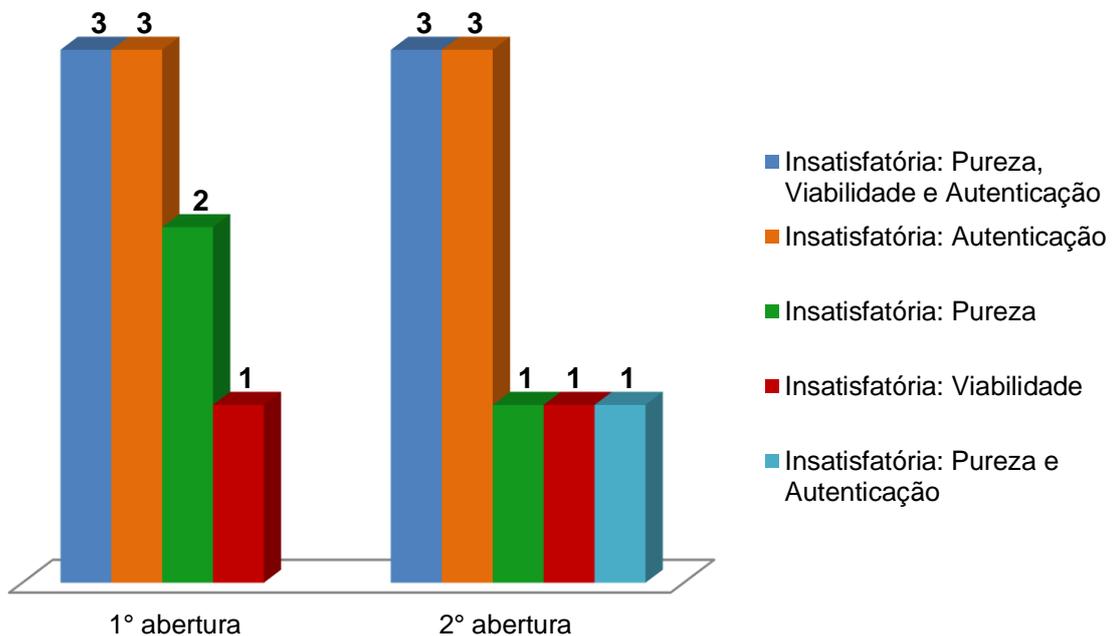
A cepa *Listeria innocua* (ID INCQS 354) apresentou mais de uma morfologia colonial de crescimento, indicativo de contaminação, nos Testes de Pureza e Viabilidade na primeira abertura de uma ampola, sendo assim considerada insatisfatória quanto ao Teste de Pureza. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou apenas uma morfologia de crescimento colonial no Teste de Pureza, porém não apresentou crescimento bacteriano no Teste de Viabilidade, sendo considerada insatisfatória. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada satisfatória conforme o item 3.4.5.

A cepa *Pseudomonas aeruginosa* (ID INCQS 26) apresentou apenas uma morfologia de crescimento colonial, sem indicativo de contaminação, porém as colônias espalharam dentro do tempo de cultivo indicado (24 horas), impossibilitando a contagem de colônias no Teste de Viabilidade. Cabe ressaltar que colônias espalhadas são viáveis, assim essa cepa não pode ser considerada insatisfatória quanto a sua viabilidade. Para mensurar corretamente o número de colônias viáveis e cumprir com o critério de aceitabilidade quantitativo disposto no POP INCQS 65.3230.045 (crescimento bacteriano igual ou superior a 10^4 UFC/mL) foi aberta uma segunda ampola dessa cepa do mesmo lote. Na abertura da segunda ampola, a cepa apresentou mais de uma morfologia colonial de crescimento nos Testes de Pureza e Viabilidade, indicativo de contaminação, sendo considerada insatisfatória quanto à pureza. Na terceira abertura de ampola do mesmo lote, a cepa apresentou apenas uma morfologia colonial de crescimento, sem indicativo de contaminação, contagem superior a 10^4 UFC/mL no Teste de Viabilidade e correta identificação bioquímica e microscópica no Teste de Autenticação, sendo assim considerada satisfatória conforme o item 3.4.5.

As 9 cepas que foram consideradas satisfatórias na terceira abertura de ampola do mesmo lote se comportaram da seguinte forma: na primeira abertura de ampola, 3 cepas foram consideradas insatisfatórias nos três testes empregados (pureza, viabilidade e autenticação); 3 cepas foram consideradas insatisfatórias no Teste de Autenticação; 2 cepas foram consideradas insatisfatórias no Teste de Pureza; e 1 cepa foi considerada insatisfatória no Teste de Viabilidade. Na segunda abertura de ampola do mesmo lote, 3 cepas foram consideradas insatisfatórias nos três testes

empregados (pureza, viabilidade e autenticação), 1 cepa foi considerada insatisfatória nos Testes de Pureza e Autenticação; 3 cepas foram consideradas insatisfatórias no Teste de Autenticação; 1 cepa considerada insatisfatória no Teste de Viabilidade; e 1 cepa considerada insatisfatória no Teste de Pureza, conforme mostrado no gráfico 7.

Gráfico 7 - Insatisfatoriedade apresentada na primeira e segunda aberturas de uma ampola do mesmo lote das cepas consideradas satisfatórias na terceira abertura de ampola.



Fonte: (Do autor, 2019).

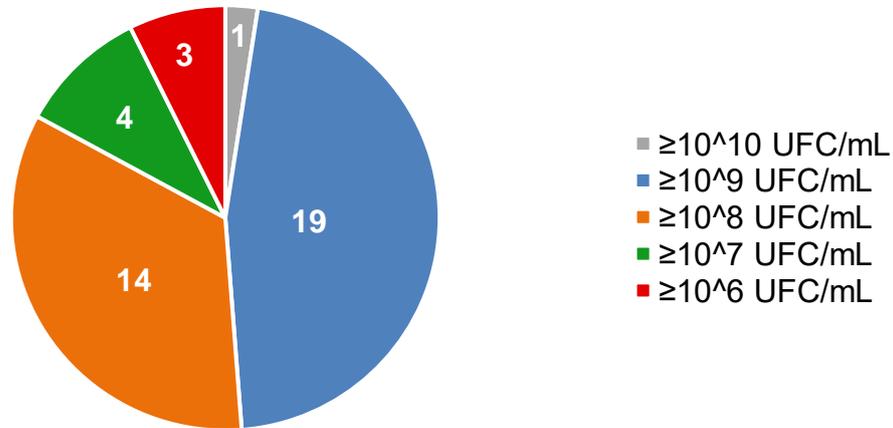
Uma dificuldade apresentada na identificação de microrganismo anaeróbios pelo sistema VITEK® 2 foi a obtenção de inoculo com alta concentração celular ($8-10 \times 10^8$ UFC/mL), visto que o microrganismo por serem anaeróbios possuem crescimento em direção ao interior do meio de cultura. O sistema VITEK® 2, através da utilização do cartão ANC ID, tem desempenho satisfatório validado na literatura para a identificação fenotípica da maioria dos microrganismos anaeróbios de importância médica. Entretanto, pode apresentar dificuldades de identificação para algumas cepas do gênero *Clostridium sp.* que apresentam perfil assacarolítico, ou seja, não utilizam glicose como fonte de carbono. Segundo RENNIE et al. 2008, as cepas bacterianas anaeróbias utilizadas nesse estudo: *Bacterioides vulgatus* e *Clostridium sporogenes*

apresentam correta identificação com o cartão ANC ID pelo sistema VITEK® 2, conforme ANEXO B, item 1.

O POP INCQS 65.3230.045 exige o mínimo de três aberturas de ampolas com resultados insatisfatórios no Teste de Pureza para ser reprovado nos testes de conformidade. Dentro destes parâmetros o trabalho demonstrou que 41 cepas bacterianas apresentaram resultado satisfatório quanto ao Teste de Pureza em, pelo menos, uma das três aberturas de ampolas (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a).

Dos resultados obtidos nos Testes de Viabilidade para as 41 cepas bacterianas consideradas satisfatórias (tabela 1), de acordo com o item 3.4.5, 1 cepa (3%) apresentou contagem de colônias superior a 10^{10} UFC/mL, 19 cepas (46%) apresentaram contagem de colônias superior a 10^9 UFC/mL, 14 cepas (34%) apresentaram contagem de colônias superior a 10^8 UFC/mL, 4 cepas (10%) apresentaram contagem de colônias superior a 10^7 UFC/mL e 3 cepas (7%) apresentaram contagem de colônias superior a 10^6 UFC/mL, conforme mostrado no gráfico 8. As contagens obtidas como resultados dessas cepas foram bem superiores ao critério de aceitação do Teste de Viabilidade estipulado pela CBRVS-Fiocruz no POP INCQS 65.3230.045 e pelo valor utilizado em coleções internacionais como a ATCC (crescimento igual ou superior a 10^4 UFC/mL). A cepa bacteriana que apresentou menor resultado de contagem colonial, *Clostridium sporogenes* (ID INCQS 60), tem valor mais de 100 vezes superior ($1,6 \times 10^6$ UFC/mL) ao critério de aceitabilidade estipulado. Já a cepa bacteriana que apresentou maior resultado na contagem colonial, *Listeria innocua* (ID INCQS 354), possui valor 100.000 vezes superior ($1,7 \times 10^{10}$ UFC/mL) ao critério de aceitabilidade estipulado (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a).

Gráfico 8 - Valor de contagem de colônias obtido nos testes de viabilidade das cepas consideradas satisfatórias.



Fonte: (Do autor, 2019).

Tabela 1 - Resultado do teste de viabilidade das cepas bacterianas consideradas satisfatórias (continua)

Microrganismo	ID ATCC	ID INCQS	Contagem (UFC/mL)	Microrganismo	ID ATCC	ID INCQS	Contagem (UFC/mL)
<i>Bacillus atropaeus</i>	9372	349	$5,6 \times 10^8$	<i>Kocuria rhizophila</i>	9341	10	$6,9 \times 10^9$
<i>Bacillus cereus</i>	11778	3	$1,3 \times 10^7$	<i>Listeria innocua</i>	33090	354	$1,7 \times 10^{10}$
<i>Bacillus cereus</i>	14579	435	$3,1 \times 10^6$	<i>Listeria ivanovii</i>	19119	355	$2,8 \times 10^9$
<i>Bacillus mycoides</i>	6462	419	$4,0 \times 10^6$	<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	266	$2,1 \times 10^8$
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	1	$5,0 \times 10^8$	<i>Micrococcus luteus</i>	10240	11	$2,5 \times 10^9$
<i>Bacillus subtilis</i>	19659	2	$1,7 \times 10^7$	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	7468	9	$2,5 \times 10^8$
<i>Bacillus thurigiensis</i>	33679	213	$1,7 \times 10^8$	<i>Proteus hauseri</i>	13315	106	$4,2 \times 10^8$
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	23	$2,5 \times 10^9$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	230	$2,1 \times 10^8$
<i>Clostridium sporogenes</i>	3584	4	$5,4 \times 10^8$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442	25	$1,2 \times 10^9$

Tabela 1 - Resultado do teste de viabilidade das cepas bacterianas consideradas satisfatórias (conclusão)

<i>Clostridium sporogenes</i>	11437	60	1,6 x 10 ⁶	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619	26	5,7 x 10 ⁸
<i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>Klebsiella aerogenes</i>)	13048	145	1,40 x 10 ⁹	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	99	2,2 x 10 ⁹
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	74	5,9 x 10 ⁹	<i>Raoultella planticola</i> (<i>Klebsiella planticola</i>)	8329	90	1,1 x 10 ⁹
<i>Enterococcus faecalis</i>	4083	17	3,6 x 10 ⁹	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	10708	28	1,3 x 10 ⁹
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	71	5,7 x 10 ⁹	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	14028	150	1,1 x 10 ⁹
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	19	7,2 x 10 ⁸	<i>Staphylococcus aureus</i>	12600	358	2,0 x 10 ⁹
<i>Escherichia coli</i>	8739	219	3,7 x 10 ⁸	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	15	2,6 x 10 ⁹
<i>Escherichia coli</i>	10536	31	3,0 x 10 ⁹	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538P	13	8,1 x 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i>	11229	32	9,2 x 10 ⁸	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	39	3,9 x 10 ⁹
<i>Escherichia coli</i>	25922	33	5,0 x 10 ⁸	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	402	1,3 x 10 ⁹
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	7953	144	7,5 x 10 ⁷	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	16	1,6 x 10 ⁹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i>	13883	147	6,5 x 10 ⁸				

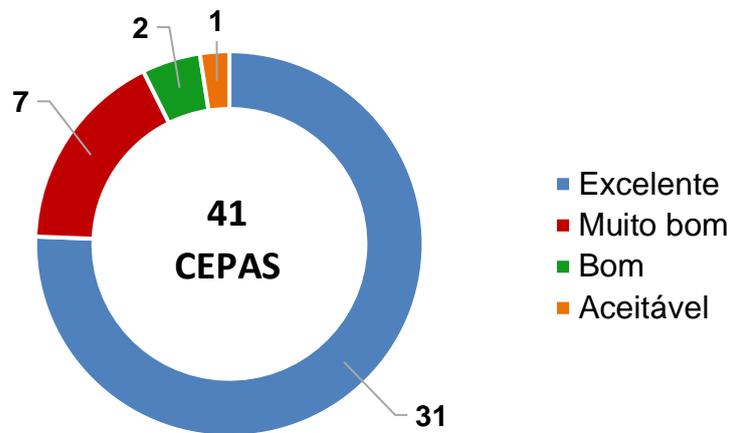
Fonte: (Do autor, 2019).

Os resultados obtidos nos Testes de Autenticação das cepas consideradas satisfatórias quanto a sua conformidade, item 4.2, estão descritos na tabela 2.

Dos resultados obtidos quanto à identificação bioquímica das 41 cepas bacterianas no Teste de Autenticação, realizado através do sistema automatizado

VITEK® 2, 31 cepas (76%) apresentaram resultados considerados Excelente, 7 cepas (17%) apresentaram resultado considerado Muito Bom, 2 cepas (5%) apresentaram resultado considerado Bom e 1 cepa (2%) apresentou resultado considerado Aceitável, conforme critério de confiabilidade fornecido pela fabricante (quadro 3), como mostrado no gráfico 9.

Gráfico 9 - Número de cepas satisfatórias que apresentaram resultado conforme nível de estratificação de confiança de identificação do sistema do VITEK® 2



Fonte: (Do autor, 2019).

Tabela 2 - Resultado da autenticação das cepas bacterianas consideradas satisfatórias (continua)

Microrganismo	ID ATCC	ID INCQS	Característica Microscópica	Cartão VITEK® 2	Resultado Identificação Bioquímica
<i>Bacillus atrophaeus</i>	9372	349	BGP	BCL	<i>Bacillus atrophaeus</i> 94% probabilidade
<i>Bacillus cereus</i>	11778	3	BGP	BCL	<i>Bacillus cereus</i> 95% probabilidade
<i>Bacillus cereus</i>	14579	435	BGP	BCL	<i>Bacillus cereus</i> 95% probabilidade
<i>Bacillus mycoides</i>	6462	419	BGP	BCL	<i>Bacillus mycoides</i> 92% probabilidade
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	1	BGP	BCL	<i>Bacillus subtilis</i> 96% probabilidade

Tabela 2 - Resultado da autenticação das cepas bacterianas consideradas satisfatórias (continuação)

<i>Bacillus subtilis</i>	19659	2	BGP	BCL	<i>Bacillus subtilis</i> 88% probabilidade
<i>Bacillus thurigiensis</i>	33679	213	BGP	BCL	<i>Bacillus thurigiensis</i> 91% probabilidade
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	23	BGN	GN	<i>Bordetella bronchiseptica</i> 99% probabilidade
<i>Clostridium sporogenes</i>	3584	4	BGP	ANC	<i>Clostridium sporogenes</i> 99% probabilidade
<i>Clostridium sporogenes</i>	11437	60	BGP	ANC	Grupo <i>Clostridium</i> 99% probabilidade
* <i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>Klebsiella aerogenes</i>)	13048	145	BGN	GN	<i>Enterobacter aerogenes</i> 99% probabilidade
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	74	BGN	GN	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp. <i>cloacae</i> 95% probabilidade
<i>Enterococcus faecalis</i>	4083	17	CGP	GP	<i>Enterococcus faecalis</i> 97% probabilidade
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	71	CGP	GP	<i>Enterococcus faecium</i> 98% probabilidade
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	19	CGP	GP	<i>Enterococcus hirae</i> 95% probabilidade
<i>Escherichia coli</i>	8739	219	BGN	GN	<i>Escherichia coli</i> 99% probabilidade
<i>Escherichia coli</i>	10536	31	BGN	GN	<i>Escherichia coli</i> 99% probabilidade
<i>Escherichia coli</i>	11229	32	BGN	GN	<i>Escherichia coli</i> 99% probabilidade
<i>Escherichia coli</i>	25922	33	BGN	GN	<i>Escherichia coli</i> 98% probabilidade
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	7953	144	BGP	BCL	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 95% probabilidade

Tabela 2 - Resultado da autenticação das cepas bacterianas consideradas satisfatórias (continuação)

<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	13883	147	BGN	GN	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> 93% probabilidade
<i>Kocuria rhizophila</i>	9341	10	CGP	GP	<i>Kocuria rhizophila</i> 99% probabilidade
<i>Listeria innocua</i>	33090	354	BGP	GP	<i>Listeria innocua</i> 98% probabilidade
<i>Listeria ivanovii</i>	19119	355	BGP	GP	<i>Listeria ivanovii</i> 99% probabilidade
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	266	BGP	GP	<i>Listeria monocytogenes</i> 99% probabilidade
<i>Micrococcus luteus</i>	10240	11	CGP	GP	<i>Micrococcus luteus</i> 96% probabilidade
* <i>Micrococcus yunnanensis</i>	7468	9	CGP	GP	<i>Micrococcus luteus</i> 99% probabilidade
<i>Proteus hauseri</i>	13315	106	BGN	GN	<i>Proteus hauseri</i> 99% probabilidade
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	230	BGN	GN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99% probabilidade
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442	25	BGN	GN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99% probabilidade
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619	26	BGN	GN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99% probabilidade
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	99	BGN	GN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 96% probabilidade
* <i>Raoultella planticola</i> (<i>Klebsiella planticola</i>)	8329	90	BGN	GN	<i>Raoultella planticola</i> 99% probabilidade
* <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	10708	28	BGN	GN	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> . 96% probabilidade
* <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	14028	150	BGN	GN	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> 97% probabilidade

Tabela 2 - Resultado da autenticação das cepas bacterianas consideradas satisfatórias (conclusão)

<i>Staphylococcus aureus</i>	12600	358	CGP	GP	<i>Staphylococcus aureus</i> 99% probabilidade
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	15	CGP	GP	<i>Staphylococcus aureus</i> 98% probabilidade
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538P	13	CGP	GP	<i>Staphylococcus aureus</i> 99% probabilidade
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	39	CGP	GP	<i>Staphylococcus aureus</i> 99% probabilidade
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	402	CGP	GP	<i>Staphylococcus aureus</i> 99% probabilidade
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	16	CGP	GP	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 99% probabilidade

*Microrganismo reclassificado taxonomicamente

BGN – Bacilo Gram Negativo BGP – Bacilo Gram Positivo CGP – Cocos Gram Positivo

Fonte: (Do autor, 2019).

As cepas bacterianas *Bacillus atrophaeus* (INCQS 349), *Bacillus cereus* (ID INCQS 3), *Bacillus cereus* (ID INCQS 435), *Bacillus mycoides* (ID INCQS 419), *Bacillus subtilis* (ID INCQS 1), *Bacillus subtilis* (ID INCQS 2), *Bacillus thurigiensis* (ID INCQS 213) apresentaram crescimento bacteriano no meio Ágar Nutriente adicionado de metais quando incubados conforme metodologia já descrita. Na observação ao microscópio óptico no aumento de 1000x com óleo de imersão, através do método de coloração de endósporos de Wirtz-Conklin, apresentaram a formação de esporos. Corroborando assim para a confirmação da identificação e utilização do cartão VITEK® 2 BCL ID na identificação bioquímica.

Diante dos resultados apresentados sugere-se que as cepas bacterianas consideradas satisfatórias (41 cepas), de acordo com o item 3.4.5, foram consideradas puras, mantiveram sua viabilidade frente ao processo de armazenamento empregado e possuíram correta confirmação da sua identidade. Com isso, o estudo confirmou os resultados obtidos nos testes de conformidade realizados logo após a produção dos lotes de ampolas dessas cepas.

Entretanto, cumpre ressaltar que apesar do maior percentual de amostras terem sido consideradas satisfatórias (91%), segundo a metodologia empregada, as

mesmas apresentaram alta variabilidade nos resultados obtidos nos ensaios com diferentes ampolas de um mesmo lote de cepas bacterianas. O que infere a necessidade da realização a posteriori de um estudo estatístico para avaliação da amostragem significativa necessária frente ao quantitativo de cada lote produzido para a realização dos testes de controle de qualidade pós liofilização, visto o impacto direto da conformidade dessas cepas nos resultados dos ensaios em que são recomendadas e nas ações de vigilância sanitária decorrentes dos mesmos.

Após a realização do estudo estatístico de amostragem, é sugerido que os resultados obtidos sejam implementados na rotina do Setor de Bactérias e Arqueas com conseqüente modificação na revisão dos POPs INCQS 65.3230.045 e 65.3230.047 no que tange aos ensaios de conformidade (pureza, viabilidade e autenticação pós liofilização) com valores mais significativos e rígidos de amostragem quanto ao lote (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018b).

O objetivo de qualquer método de manutenção é conservar ao máximo a viabilidade, garantindo a quantidade de células viáveis, e prover estabilidade genética do microrganismo ao isolamento por maior período de tempo possível. A escolha do método deve ser baseada nas particularidades do microrganismo, características do método e seu custo de manutenção, capacidade laboratorial, disponibilidade de equipamentos e capacidade de recuperação de microrganismos viáveis (ABREU; TUTUNJI, 2004; GIRÃO et al., 2004).

O próprio método de preservação leva uma injúria das células bacterianas e com isso há diminuição do número de células viáveis. As bactérias mediante a utilização de métodos de conservação produzem mecanismos de resposta, como: proteínas especializadas para a resistência térmica, mudanças estruturais da membrana celular e reparo do material genético como alternativa para a sobrevivência. Esses mecanismos conferem capacidade de recuperação das células injuriadas frente a um ambiente favorável. Esse decaimento na viabilidade devido ao método de preservação utilizado foi avaliado durante o Teste de Viabilidade realizado logo após a produção do lote e liofilização da cepa e segundo os critérios utilizados pela CBRVS-Fiocruz e coleções internacionais foram considerados satisfatórios (BOZIARIS; ADAMS, 2001; VIEIRA et al., 2007).

Também, fatores relacionados ao método de estocagem e acondicionamento dessas ampolas influenciam significativamente a vida de prateleira dos microrganismos liofilizados, interferindo no decaimento da viabilidade dos mesmos. Os microrganismos liofilizados armazenados em ampolas ou frascos de vidro devem ser acondicionados em ambientes com baixa umidade, baixas temperaturas (2 a 8°C para esse método de preservação), a vácuo e protegidos da luz (DAY; MCLELLAN, 1995; MORGAN et al., 2006).

Os microrganismos podem estar presentes em uma amostra que passou por um método de conservação em três estados: inviabilizados (possuem injúria letal e incapacidade de multiplicação), apresentando injúria subletal (possuem capacidade de multiplicação sob condições favoráveis, apesar dos danos celulares sofridos) e viáveis. (BAATI et al., 2000; VIEIRA et al., 2007).

Durante a pesquisa bibliográfica do trabalho não foram encontrados muitos estudos na literatura que contemplem a validação de protocolos relativos a manutenção e estocagem de amostras microbiológicas. Entretanto, nos estudos disponíveis diversos protocolos de estocagem têm sido desenvolvidos e aplicados, os quais não tem demonstrado serem plenamente eficazes, visto as peculiaridades dos microrganismos e características intrínsecas das técnicas. Desse modo, têm-se considerado a associação de mais de um protocolo para garantir a melhor recuperação dos microrganismos (GOLDMAN; GREEN, 2008; COSTA et al., 2009).

Há estudos na literatura que avaliaram de forma temporal a taxa de sobrevivência entre determinados microrganismos em relação ao método de preservação e armazenamento empregado, no qual foi demonstrado que a taxa de sobrevivência é variável entre as diferentes espécies. A viabilidade relativa das bactérias após a liofilização decresce menos nas bactérias formadoras de esporos, seguida das gram positivas e gram negativas, o que pode ser explicado pela diferença na estrutura celular desses microrganismos. As bactérias gram positivas possuem maior taxa de sobrevivência imediatamente após à liofilização quando comparadas às gram negativas, quando expostas as mesmas condições. Em relação ao período de estocagem, verifica-se que a taxa de sobrevivência de algumas espécies se mantém fixa de forma temporal, enquanto em outros microrganismos apresentam um declínio durante os primeiros cinco anos, tendendo a estabilizar por volta de 15 anos (MIYAMOTO-SHINOHARA, 2008).

Não foi possível realizar um estudo comparativo de decaimento temporal da viabilidade de cada lote das cepas bacterianas após a liofilização, similar aos descritos na literatura, pois nos certificados de análise obtidos no levantamento de dados arquivados no laboratório, os resultados dos Testes de Viabilidade realizados pós liofilização, previamente ao presente estudo, foram expressos na forma de Satisfatório (crescimento bacteriano acima de 10^4 UFC/mL) ou Insatisfatório. Não sendo assim, registrado o valor absoluto da contagem de colônias.

Os lotes das cepas bacterianas utilizadas nesse estudo foram considerados satisfatórios nos testes mencionados. Como esses resultados na época eram registrados sem os valores absolutos nos certificados de análise, as cepas consideradas satisfatórias em relação a viabilidade no presente estudo não puderam ser comparadas ao seu valor prévio de contagem e assim poder inferir sobre a qualidade do método de estocagem utilizado pela CBRVS-Fiocruz para a manutenção da viabilidade desses microrganismos. Essa inferência pode ser realizada quanto às cepas que apresentaram problemas de viabilidade, sugerindo que o método de armazenamento das ampolas empregado pode não ser adequado para esses microrganismos. É sugerido que seja realizado periodicamente um estudo para a avaliação da pureza, autenticidade e decaimento da viabilidade das cepas já produzidas e armazenadas na CBRVS-Fiocruz.

Cumprе ressaltar uma possível modificação na forma de registro dos resultados dos Testes de Viabilidade no certificado de análise ou em registros internos do laboratório, como foi inicializado e realizado durante um tempo no Laboratório de Microrganismos de Referência, registrando o valor absoluto de contagem do crescimento bacteriano (UFC/mL) no Teste de Viabilidade para posterior estudo periódico de decaimento temporal da viabilidade frente a forma de armazenamento das ampolas, contendo o liófilo, que a CBRVS-Fiocruz emprega. Para esse próximo estudo, poderão ser utilizados, como base comparativa, os dados obtidos nesse trabalho para as cepas bacterianas utilizadas.

É sugerido que, antes da realização desses próximos estudos temporais confirmatórios da pureza, autenticação e decaimento da viabilidade das cepas seja avaliado o vácuo nas ampolas, visto que, o mesmo, é um fator preponderante para a manutenção da viabilidade das cepas bacterianas. O teste de análise de vácuo está contido no POP INCQS 65.3230.014 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018i). Seria indicado também a realização do teste de

vácuo antes do envio das cepas ao cliente, caso a mesma não apresentasse vácuo deveria ser descartada e seria enviada uma cepa que apresentasse resultado satisfatório para esse teste.

Segundo o POP INCQS 65.3230.045 os lotes das cepas consideradas insatisfatórias nesse estudo *Bacteroides vulgatus* (ID INCQS 59), *Clostridium sporogenes* (ID INCQS 352) e *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae* (ID INCQS 30) deveriam ser descartados. Entretanto, como o estudo realizado tem cunho confirmatório aos testes de conformidade (pureza, viabilidade e autenticação) realizados após a produção e liofilização dessas cepas, e os mesmos foram considerados, em tempo, satisfatórios deve-se realizar, posteriormente, novos testes de conformidade para essas cepas com lotes anteriores produzidos a partir da ampola matriz e/ou ampolas da memória, com a finalidade de rastrear a causa do problema (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a).

A metodologia dos testes de conformidade empregada no presente estudo foi adaptada em algumas peculiaridades a que consta nos POPs do INCQS, já mencionados. O critério de aceitabilidade do resultado do Teste de Pureza para os microrganismos anaeróbios, segundo o POP INCQS 65.3230.045, seria a ausência de crescimento bacteriano em placa contendo Ágar Caseína Soja incubada à $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em aerobiose. Para este trabalho, essas cepas foram incubadas, concomitantemente, em duas condições atmosféricas de crescimento. Em aerobiose, segundo o critério do POP, para avaliar a presença de contaminantes aeróbios. Como também em atmosfera de anaerobiose na temperatura recomendada no informe técnico para cada cepa bacteriana (37°C). Essa adaptação foi realizada tendo em vista que é mais relevante avaliar a presença de contaminantes anaeróbios nessa ampola, do que aeróbios, pois o microrganismo será cultivado em atmosfera de anaerobiose, inibindo o crescimento dos contaminantes aeróbios e propiciando o crescimento dos contaminantes anaeróbios (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a).

O critério de aceitabilidade do Teste de Pureza foi adaptado no presente estudo para a cepa *Geobacillus stearothermophilus* (ID INCQS 144). O POP INCQS 65.3230.045 estipula como critério de aceitação dos resultados do Teste de Pureza para microrganismos aeróbios, as colônias apresentem morfologia de crescimento colonial com características específicas da cepa bacteriana, isenta de contaminação. A cepa *Geobacillus stearothermophilus* (ID INCQS 144) possui temperatura

recomendada de crescimento de 55°C, desse modo, não apresenta crescimento na temperatura recomendada pelo POP (36,5 °C ± 1,5 °C). Diante disso, o critério de aceitação utilizado para essa cepa foi a ausência de crescimento bacteriano em placa, contendo Ágar Caseína Soja, no Teste de Pureza (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a).

Diante do exposto, é sugerido que haja a modificação desses pontos abordados na próxima revisão do POP INCQS 65.3230.045 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a).

Alguns microrganismos apresentam mais de uma característica morfológica de crescimento colonial. A partir da experiência técnica da equipe do laboratório, foi avaliado se há, tanto no padrão de crescimento, quanto nas morfologias observadas nas placas, alguma diferença discrepante da esperada. Cumpre ressaltar que não há bem descrito na literatura as características macroscópicas de crescimento colonial das cepas estudadas nos meios de cultivo utilizados no presente trabalho, recomendados nos informes técnicos das cepas bacterianas. As características macroscópicas dessas cepas são descritas para crescimento em meios seletivos, o que não é o caso. Diante disso, a análise da pureza foi realizada através da avaliação das cepas que apresentaram nos crescimentos suspeita de contaminação por possuírem mais que uma morfologia colonial em placa. Nesses casos, foram avaliadas as características morfotintoriais da possível contaminação. Se essas características também fossem semelhantes entre as diferentes cepas, era feita sua identificação bioquímica e a análise da pureza ficou condicionada à autenticação.

É sugerido ainda que seja atualizado o catalogo da CBRVS-Fiocruz modificando ou acrescentando os nomes das cepas bacterianas que foram reclassificadas taxonomicamente, conforme já mencionado. No caso das cepas do gênero *Salmonella sp.*, padronizar a nomenclatura atual para o nome reclassificado da espécie e subespécie, visto que o laboratório não possui metodologia implementada para identificação a nível de sorogrupos.

6 CONCLUSÃO

Dados os resultados obtidos nesse trabalho, pôde-se concluir que a metodologia empregada foi aplicável a 98% das amostras analisadas, não sendo possível realizar a autenticação da cepa *Mycobacterium smegmatis* (ID INCQS 21) pela mesma não ser identificada através do sistema VITEK® 2.

91% das cepas estudadas foram consideradas satisfatórias quanto a sua conformidade (Pureza, Viabilidade e Autenticação), segundo o critério de aceitação contido nos POPs utilizados.

Do total das cepas analisadas, 7% foram consideradas insatisfatórias por não cumprirem um ou mais dos três requisitos aplicados nesse estudo e devem ser reavaliadas para se decidir a manutenção, ou não, destes lotes na coleção e/ou a realização de produção de novos lotes.

A metodologia implementada no setor possui alguns parâmetros que não abrangem particularidades de certos microrganismos e precisaram ser adaptadas. Sugere-se a revisão dos procedimentos para serem mais abrangentes e desta forma a não restringir a análise de alguns microrganismos.

Os resultados sugerem que mesmo sem ter uma base de comparação para o decaimento da viabilidade, a metodologia empregada para a conservação das ampolas da CBRVS-Fiocruz é adequada e eficiente para a grande maioria das espécies estudadas, mostrado pela alta contagem observada nas placas de cultivo.

Durante o estudo foi visto que algumas das cepas estudadas foram reclassificadas taxonomicamente e, com isso, é sugerida a modificação na sua nomenclatura na CBRVS-Fiocruz.

Recomenda-se a implementação de metodologias alternativas para os microrganismos que não puderam ser identificados pela bioquímica. Mesmo que não validadas, metodologias como PCR, Sequenciamento ou Sorologia podem ser complementares da autenticação.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v.02 n.2, p. 236-25, 2004
- ABREU, E. A fisicatura-mor e o cirurgião-mor dos Exércitos no reino de Portugal e Estados do Brasil. **Revista do IHGB**, v. 63, n. 101, p. 154-306, 1900.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Culture Method**. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/E6FA2163B72E4DCD880719A2612F2C92.ashx>. Acesso em: 07 jan.2020a.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Culture Method**. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/45E208A3191F4C7EA9B7E1063EB55303.ashx>. Acesso em: 07 jan. 2020b.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Culture Method**. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/F11236DC0E36489ABFA10BF4A411C525.ashx>. Acesso em: 07 jan. 2020c.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Culture Method**. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/983F7B4AC3424F87840FD6A09934462E.ashx>. Acesso em: 07 jan. 2020d.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Culture Method**. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/5E5D6C56E76D4DD2A9B745A2D640A78F.ashx>. Acesso em: 07 jan. 2020e.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Culture Method**. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/F63FE3883EBD485389C1F71EE27D3D31.ashx>. Acesso em: 07 jan. 2020f.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Culture Method**. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/A7C690670B414670A7868AADF4084AC3.ashx>. Acesso em: 07 jan. 2020g.
- ARANDA, A.T. Coleções Biológicas: Conceitos básicos, curadoria e gestão, interface com a biodiversidade e saúde pública. *In*: TERCEIRO SIMPÓSIO SOBRE A BIODIVERSIDADE DA MATA ATLÂNTICA (SIMBIOMA), 3., 2014, São Paulo. **[Anais]**... São Paulo, 2014. 56p.
- BAATI, L; FABRE-GEA, C.; AURIOL, D. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing on the viability and cellular protein levels. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 241-247, sep. 2000.
- BEVERIDGE, TJ. Use of the gram stain in microbiology. **Biotech Histochem**. v. 76, n.3, p.111-118, Maio 2001.

BOZIARIS, I.S.; ADAMS, M.R. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, ed.4, p. 715- 724, out. 2001.

BRASIL. Conselho Nacional de Secretários de Saúde. **Vigilância em saúde**: parte 2. Brasília: CONASS, 2011. v. 06. 113 p. (Coleção Para Entender a Gestão do SUS).

BRASIL. Decreto° de 17 de janeiro de 1829. Manda observar o Regulamento da Inspeção da saúde pública do porto do Rio de Janeiro. **Coleção das leis do Império do Brasil**: parte 1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1829. p. 41-44.

BRASIL. Decreto n°. 464, de 17 de agosto de 1846. Manda executar o Regulamento do Instituto Vacínico do Império. **Coleção das leis do Império do Brasil**: parte 2. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1847. p. 86-87.

BRASIL. Decreto n°. 598, de 14 de setembro de 1850. Concede ao Ministério do Império um crédito extraordinário de duzentos contos para ser exclusivamente despendido no começo de trabalhos, que tendam a melhorar o estado sanitário da capital e de outras províncias do Império. **Coleção das leis do Império do Brasil**: parte 1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1851. p. 299-301.

BRASIL. Decreto n. 9.554, de 3 de fevereiro de 1886. Reorganiza o serviço sanitário do Império. **Coleção das leis do Império do Brasil**: parte 2. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1886. p. 57-103.

BRASIL. Decreto n. 1.647, de 12 de janeiro de 1894. Providencia sobre o Instituto Sanitário Federal e dá-lhe Regulamento. **Coleção das leis da República dos Estados Unidos do Brasil**: parte 2. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1895. p. 2-20.

BRASIL. Decreto n. 2.449, de 1º de fevereiro de 1897. Unifica os serviços de higiene da União. **Coleção das leis da República dos Estados Unidos do Brasil**: parte 2. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1897. v. 1. p. 76-78.

BRASIL. Decreto n. 9.159, de 1 de março de 1884. Comete à Inspeção de Saúde do Porto a polícia sanitária do litoral, e dá outras providências com relação a este assunto. **Coleção das leis do Império do Brasil**: parte I. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1884. tomo XXXI. p.81-82.

BRASIL. Decreto nº 5.156, de 8 de Março de 1904. Dá novo regulamento aos serviços sanitários a cargo da União. **Diário Oficial da União**: Poder Executivo, Rio de Janeiro, 8 mar. 1904.

BRASIL. **Lei de 1º de outubro de 1828**. Dá nova forma às Camaras Municipaes, marca suas attribuições, e o processo para a sua eleição, e dos Juizes de Paz. Brasília: Casa Civil. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/lim/LIM-1-10-1828.htm. Acesso em: 03 jan. 2020.

BRASIL. Lei nº 3.987, de 2 de janeiro de 1920. Reorganiza os serviços da Saúde Pública. **Diário Oficial da União**: poder executivo. Rio de Janeiro, 2 jan. 1920.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: poder executivo. Brasília, 24 set. 1976.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 9 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: poder executivo. Brasília, 10 set. 1990.

Brasil. Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 24 ago. 1977.

BRASIL. Decreto nº 49.974-A. Regulamenta, sob a denominação de Código Nacional de Saúde, a Lei nº 2.312, de 3/9/54. **Diário Oficial da União**. Brasília, 28 jan. 1961b.

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

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

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

BRENNER, F.W. *et al.* Salmonella nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.7, p. 2465-7, jul. 2000.

CAMPOS, A. L. V. Políticas internacionais de saúde na era Vargas: o Serviço Especial de Saúde Pública, 1942- 1960. *In*: GOMES, A. C. (org.). **Capanema**: o ministro e seu ministério. Rio de Janeiro: FGV/USF, 2000. p. 195-220.

CAMPOS, C. E. A. As origens da rede de serviços de atenção básica no Brasil: o Sistema Distrital de Administração Sanitária. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 14, n. 3, pp.877-906, 2007.

CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. Coleções de culturas de microrganismos. *In*: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Resumo**. São Paulo, CRIA, 2004. (Coleções de culturas de microrganismos).

CAVALCANTI, S. D. B. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina**

Tropical de São Paulo. 2010. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CEFAR EM NOTÍCIAS. Procedimentos para a conservação de microrganismos. **Informativo Cefar de Microbiologia**, ano 3, ed. 13, jan./fev., 2006. Circulação Bimestral.

COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde**. Editora Hucitec/SOBRAVIME. São Paulo, 1999, 460 p.

COSTA, E. C. *et al.* Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Introduction. **Methods Mol Biol.**, New Jersey, v. 38, p.1-5, 1995.

DRANCOURT, M. *et al.* Phylogenetic analyses of Klebsiella species delineate Klebsiella and Raoultella gen. nov. with description of Raoultella ornithinolytica comb. nov. Raoultella terrigena comb. nov. and Raoultella planticola comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**.v.51, n. 3, p. 925–932, maio 2001.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. 1 v.

FIALHO, M. M. **Validação do sistema de gerenciamento de banco de dados da coleção de culturas de fungos de referência do INCQS/FIOCRUZ**. 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

FRANCO SANTOS, T.C.; DE ALENCAR BARREIRA, I. A mulher e a enfermeira na nova ordem social do Estado Novo. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 17, n. 3, 2008.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Pesquisa e Ensino**. (Coleções Biológicas). Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/colecoes-biologicas>. Acesso em: 15 ago. 2019

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Principal**. Disponível em: <http://cbrvs.fiocruz.br/>. Acesso em: 05 jan. 2020a.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Histórico**. Disponível em: <http://cbrvs.fiocruz.br/>. Acesso em: 05 jan. 2020b.

GIRÃO, M. D. *et al.* Viabilidade de cepas de Malassezia pachydermatis mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online]**, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p. 229-233, maio/jun. 2004.

GOLDMAN, E.; GREEN, L. H. **Practical handbook of microbiology**. 3. ed. Londres: CRC Press, 2008.

GUIZELINI, B. *et al.* Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. **Arch Microbiol**, v. 194, p. 991- 999, dez. 2012.

HALKET, G.; DINSDALE, A. E.; LOGAN, N. A. Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endosporeformers. **Lett Appl Microbiol**. v.50, n.1, p. 120-126, jan. 2010.

HOCHMAN, G. Reformas, instituições e políticas de saúde no Brasil (1930-1945). **Educar**, Curitiba, n. 25, p. 127-141, 2005.

HUANG, C. H. *et al.* Reclassification of *Micrococcus aloeverae* and *Micrococcus yunnanensis* as later heterotypic synonyms of *Micrococcus luteus*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 69, n.11, p. 3512-3518, nov. 2019.

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

Estrutura. Disponível em:

https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=74&Itemid=70. Acesso em: 04 jan. 2020a.

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

Estrutura. Organograma do INCQS. Disponível em:

https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=206. Acesso em: 04 jan. 2020b.

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

Atividades. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=68; Acesso em: 15 ago. 2019.

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

65.3230.045: teste de viabilidade e pureza da produção de bactérias de referência.

Rev. 2. Rio de Janeiro, 2018a.

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

65.3230.047: caracterização bacteriana por métodos de autenticação. Rev. 1. Rio de Janeiro, 2018b.

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

65.3240.010: método para avaliação da atividade esporocida. Rev. 2. Rio de

Janeiro, 2018c.

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

65.3240.016: método para avaliação das atividades bacteriostática e fungistática de saneantes e substâncias preservativas. Rev. 1. Rio de Janeiro, 2018d.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3240.011**: método da diluição de uso. Rev. 2. Rio de Janeiro, 2018e.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.006**: fluxo de documentos na produção, manutenção e fornecimento de bactérias e fungos. Rev. 5. Rio de Janeiro, 2018f.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **PU 3210.102**: método de coloração de gram. Rev. 6. Rio de Janeiro, 2018g.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **PU 3230.031**: Vitek 2 para uso em cartões de identificação bacteriana (Vitek-BCL, Vitek-GP, Vitek-GN e Vitek-ANC). Rev. 1. Rio de Janeiro, 2018h.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP65.3230.014**: Preservação e produção de fungos pelo método de liofilização da CFRVS. Rev. 7. Rio de Janeiro, 2018i.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3240.003**: contagem e identificação de *Bacillus cereus* a partir de alimentos. Rev. 2. Rio de Janeiro, 2019a.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3240.023**: pesquisa e enumeração de coliformes a 35 e a 45 °c em alimentos e em água para consumo humano e identificação de *E. coli*. Rev. 1. Rio de Janeiro, 2019b.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3240.002**: pesquisa e contagem de estafilococos coagulase positiva a partir de alimentos e identificação de *Staphylococcus aureus*. Rev. 2. Rio de Janeiro, 2019c.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3240.031**: método para avaliação da atividade bactericida de desinfetantes para águas de piscinas. Rev. 0. Rio de Janeiro, 2019d.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3240.026**: pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos. Rev. 1. Rio de Janeiro, 2019e.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.046**: Identificação de Bactérias por Sequenciamento de gene funcional. Rev. 0. Rio de Janeiro, 2017.

KOLK, A.H. *et al.* *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. **J Clin Microbiol**, v.32, n.5, p.1354–1356, maio 1994.

LUCCHESI, G. A Vigilância sanitária no Sistema Único de Saúde. *In*: CONFERÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Eixo II – texto 5,

2001. **Caderno de textos**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001. p. 53-69.

MINAYO-GOMEZ, C.; THEDIM-COSTA, S.M.F. A construção do campo da saúde do trabalhador: percurso e dilemas. **Cadernos de saúde pública**, v. 13, Supl. 2, p. 21-32, 1997.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. *et al.* Survival of freeze-dried bacteria. **The Journal of general and applied microbiology**, Tokyo, v. 54, n.1, p. 9-24, fev.2008.

MORGAN, C. A. *et al.* Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, n. 2, p.183-193, ago. 2006.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.67, p.2079 –2080. jul. 2017.

PANAGOPOULOS, M.I. *et al.* *Bordetella holmesii* bacteremia in asplenic children: report of four cases initially misidentified as *Acinetobacter lwoffii*. **Journal of clinical microbiology**. v. 48, n.10, p. 3762-3764, out. 2010.

PAOLI, DE P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 897-910, nov. 2005.

PIMENTA, T. S. Transformações no exercício das artes de curar no Rio de Janeiro durante a primeira metade do Oitocentos. **Hist. cienc. Saúde**, v. 11, Supl. 1, p.67-92, 2004.

PINCUS, D.H. Microbial identification using the bioMerieux VITEK 2 System. *In*: MILLER, M.J. **Encyclopedia of rapid Microbiological Methods**. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 2006. p. 1-32.

PIOVESAN, M. F. **A Construção política da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**. 2002. 108 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de Procedimentos Técnicos e Metodologias Empregadas para o Estudo de Bacillus e Gêneros Esporulados Aeróbios Correlatos**. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015.

RENNIE, R. P. *et al.* Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. **J Clin Microbiol.**, v.46, n.8, p.2646-2651, ago. 2008.

RODRIGUES, I. J. S. S. **Validação de um algoritmo para identificação de Mycobacterium spp. no diagnóstico laboratorial**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica) - Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

ROMEIRO, R. S. Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2006. Material Didático. Disponível em: <http://www.Ebah.com.br/contente/Aaaaafeyj/PreservacaoCulturaFitopatogenica>. Acesso em: 04 jan. 2020.

SETTE, L. **Recursos humanos e infra-estrutura para coleções microbiológicas**. Campinas: CGEE, 2005. Nota Técnica.

SILVEIRA, L. C. **Ciência, tecnologia, inovação e vigilância sanitária**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Desenvolvimento Sustentável) -Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

TINDALL, B. J; SUTTON, G.; GARRITY, G. M. Enterobacter aerogenes Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and Klebsiella mobilis Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name Klebsiella mobilis Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 67 n. 2, p.502-504, fev. 2017.

TINDALL, B. J. *et al.* Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 521–524, 2005.

TRENTO, A. Colorações Usadas em Microbiologia. **Academia de Ciência e Tecnologia – ACT**. São José do Rio Preto, 2018. p. 1-13. Disponível em: http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/Artigos_cientificos/3-Coloracao_microbiologia.pdf. Acesso em: 05 jan. 2020.

TSUKIMOTO, E. R. **Avaliação de novos métodos para a cultura de anaeróbios**. 2018. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

VIEIRA, V. R. *et al.* R. Efeito do congelamento na contagem de Salmonella Enteritidis pelo método do número mais provável (NMP) em cecos de frangos de corte. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 2, p. 140-147, 2007.

WFCC. WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS. **Home**. Disponível em: <http://www.wfcc.info/>. Acesso em: 04 jan. 2020.

ZAMORA, L. M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. **Food Science and Technology International**, London, v. 12, p. 77-84, fev. 2006.

**APÊNDICE A – REFERÊNCIAS E ENSAIOS ONDE SÃO RECOMENDADAS A
UTILIZAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS**

MICROORGANISMO	ID ATCC	ID INCQS	ENSAIO	REFERÊNCIA
<i>Bacillus atrophaeus</i>	9372	349	5.5.3.5 MICRO-ORGANISMOS EMPREGADOS EM TESTES E ENSAIOS	Farmacopeia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Bacillus cereus</i>	11778	3	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopeia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Bacillus cereus</i>	14579	435	N° 65.3240.003	POP INCQS
<i>Bacillus mycoides</i>	6462	419	N° 65.3240.003	POP INCQS
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	1	5.5.3.1.4 ADEQUAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS 5.5.3.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS ESTÉREIS 5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopeia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Bacillus subtilis</i>	19659	2	N°65.3240.010	POP INCQS
<i>Bacillus thurigiensis</i>	33679	213	N° 65.3240.003	POP INCQS
<i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	59	5.5.3.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS ESTÉREIS	Farmacopéia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	23	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6° edição, volume 1.

<i>Clostridium sporogenes</i>	3584	4	Nº 65.3240.010	POP INCQS
<i>Clostridium sporogenes</i>	11437	60	5.5.3.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS ESTÉREIS	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.
<i>Clostridium sporogenes</i>	19404	352	5.5.3.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS ESTÉREIS	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.
<i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>Klebsiella aerogenes</i>)	13048	145	Nº65.3240.023	POP INCQS
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	74	Nº 65.3240.023	POP INCQS
<i>Enterococcus faecalis</i>	4083	17	Nº 65.3240.002	POP INCQS
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	71	Nº 65.3240.031	POP INCQS
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	19	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.
<i>Escherichia coli</i>	8739	219	5.5.3.1.4 ADEQUAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.
			5.5.3.4 TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA	
<i>Escherichia coli</i>	10536	31	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.
<i>Escherichia coli</i>	11229	32	Nº65.3240.031	POP INCQS
<i>Escherichia coli</i>	25922	33	Nº65.3240.026	POP INCQS
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	7953	144	5.5.3.5 MICRO-ORGANISMOS EMPREGADOS EM TESTES E ENSAIOS	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.

<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i>	10031	30	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i>	13883	147	N°65.3240.023	POP INCQS
<i>Kocuria rhizophila</i>	9341	10	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Listeria innocua</i>	33090	354	N° 65.3240.024	POP INCQS
<i>Listeria ivanovii</i>	19119	355	N° 65.3240.024	POP INCQS
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	266	N° 65.3240.024	POP INCQS
<i>Micrococcus luteus</i>	10240	11	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Micrococcus luteus</i>	14452	12	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Micrococcus</i> <i>yunnanensis</i>	7468	9	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Mycobacterium</i> <i>smegmatis</i>	607	21	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6° edição, volume 1.
<i>Proteus hauseri</i>	13315	106	N° 65.3240.026	POP INCQS
			5.5.3.1.4 ADEQUAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS	
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	9027	230	5.5.3.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS ESTÉREIS	Farmacopéia Brasileira 6° edição, volume 1.
			5.5.3.4 TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA	

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442	25	Nº65.3240.011	POP INCQS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619	26	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	99	Nº65.3240.023	POP INCQS
<i>Raoultella planticola</i> (<i>Klebsiella planticola</i>)	8329	90	Nº 65.3240.016	POP INCQS
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. enterica</i>	10708	28	Nº65.3240.011	POP INCQS
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. enterica</i>	14028	150	5.5.3.1.4 ADEQUAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.
<i>Staphylococcus aureus</i>	12600	358	Nº 65.3240.002	POP INCQS
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	15	Nº65.3240.023	POP INCQS
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538P	13	5.5.3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	39	5.5.3.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS ESTÉREIS 5.5.3.4 TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	402	5.5.3.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS ESTÉREIS 5.5.3.4 TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA	Farmacopéia Brasileira 6º edição, volume 1.

*Staphylococcus
epidermidis*

12228

16

5.5.3.3 ENSAIO
MICROBIOLÓGICO
DE ANTIBIÓTICOS

Farmacopéia
Brasileira 6ª edição,
volume 1.

Fonte: (do autor, 2019)

APÊNDICE B – CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MEIOS DE CULTURA RECOMENDADOS PARA AS CEPAS BACTERIANAS

Microorganismo	ID ATCC	ID INCQS	LOTE Utilizado	Meio de Cultura	Temperatura de Incubação	Tempo de incubação	Atmosfera
<i>Bacillus atrophaeus</i>	9372	349	1103349	Nutriente	30°	24 horas	Aerobiose
<i>Bacillus cereus</i>	11778	3	0312003	Nutriente	30°	24 horas	Aerobiose
<i>Bacillus cereus</i>	14579	435	0415435	Nutriente	30°	24 horas	Aerobiose
<i>Bacillus mycoides</i>	6462	419	0911419	Nutriente	30°	24 horas	Aerobiose
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	1	0617001	BHI	30°	24 horas	Aerobiose
<i>Bacillus subtilis</i>	19659	2	0810002	Nutriente	30°	24 horas	Aerobiose
<i>Bacillus thurigiensis</i>	33679	213	1013213	NSMP modificado	30°	24 horas	Aerobiose
<i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	59	0318059	TSA/ TSB + sangue desfibrinado ou RCM	37°	24 horas	Anaerobiose
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	23	0208023	Nutriente	37°	24-48 horas	Aerobiose
<i>Clostridium sporogenes</i>	3584	4	0411004	TSA/ TSB + sangue desfibrinado ou RCM	37°	24-48 horas	Anaerobiose
<i>Clostridium sporogenes</i>	11437	60	0517060	RCM	37°	24-48 horas	Anaerobiose
<i>Clostridium sporogenes</i>	19404	352	0809352	TSA/ TSB + sangue desfibrinado ou RCM	37°	24-48 horas	Anaerobiose
<i>Enterobacter aerogenes (Klebsiella aerogenes)</i>	13048	145	0218145	Nutriente	30°	24 horas	Aerobiose
<i>Enterobacter cloacae subsp cloacae</i>	13047	74	1013074	Nutriente	30°	24 horas	Aerobiose

<i>Enterococcus faecalis</i>	4083	17	0617017	BHI	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	71	126071	BHI	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	19	1007019	BHI	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Escherichia coli</i>	8739	219	0118219	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Escherichia coli</i>	10536	31	0714031	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Escherichia coli</i>	11229	32	0712032	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Escherichia coli</i>	25922	33	0898033	TSA/ TSB	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	7953	144	0707144	Nutriente	55°	24 horas	Aerobiose
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	10031	30	1206030	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	13883	147	0516147	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Kocuria rhizophila</i>	9341	10	0616010	TSA/TSB	30°	24 horas	Aerobiose
<i>Listeria innocua</i>	33090	354	0511354	BHI	37°	24-48 horas	Aerobiose
<i>Listeria ivanovii</i>	19119	355	07100355	BHI	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	266	1111266	BHI ou TSA/ TSB + sangue desfibrinado	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Micrococcus luteus</i>	10240	11	0516011	Nutriente	30°	48-72 horas	Aerobiose
<i>Micrococcus luteus</i>	14452	12	-	Ágar Neomicina	26°	48-72 horas	Aerobiose
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	7468	9	0805009	Nutriente	30°	24-48 horas	Aerobiose

<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607	21	0312021	BHI	37°	2-7 dias	Aerobiose
<i>Proteus hauseri</i>	13315	106	0612106	TSA/ TSB	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	230	0616230	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442	25	0615025	TSA/ TSB	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619	26	1206026	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	99	0516099	TSA/ TSB	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Raoultella planticola</i> (<i>Klebsiella planticola</i>)	8329	90	0907090	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. enterica</i>	10708	28	0315028	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. enterica</i>	14028	150	1016150- 2	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. aureus</i>	12600	358	0911358	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. aureus</i>	25923	15	0317015	TSA/ TSB	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. aureus</i>	6538P	13	0217013	TSA/ TSB	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. aureus</i>	6538	39	1117039	TSA/ TSB	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	402	0899402	TSA/ TSB	37°	24 horas	Aerobiose
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	16	0117016	Nutriente	37°	24 horas	Aerobiose

ID ATCC = Número de identificação (registro) ATCC **ID INCQS** = Número de identificação (registro) INCQS.

Fonte: (Do autor, 2019).

**ANEXO A – FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA RECOMENDADOS
PELO ATCC, QUE CONSTAM NOS INFORMES TÉCNICOS DAS CEPAS
BACTERIANAS**

1- Meio Ágar/ Caldo Nutriente (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2020a)

Meio Ágar:

Ágar Nutriente (BD 213000) 23 g

Água Deionizada 1000 mL

Autoclavar a 121°C.

Meio Caldo:

Caldo Nutriente (BD 234000) 8 g

Água Deionizada 1000 mL

Autoclavar a 121°C.

Para fazer o caldo omitir o ágar.

Composição do Ágar Nutriente:

Extrato de carne..... 3 g

Peptona..... 5 g

Ágar. 15 g

Ajustar o pH final para 6.8 +/- 0.2.

2- Meio Ágar/ Caldo Infusão Cérebro Coração (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2020b)

Meio Ágar:

Ágar Infusão Cérebro Coração (BD 211065)	52 g
Água Deionizada	1000 mL

Autoclavar a 121°C.

Meio Caldo:

Ágar Infusão Cérebro Coração (BD 237500)	37 g
Água Deionizada	1000 mL

Autoclavar a 121°C.

Para fazer o caldo omitir o ágar.

Composição da Infusão Cérebro Coração:

Infusão de Cérebro de Vitelo.....	200 g
Infusão de Coração de Carne	250 g
Proteose Peptona.....	10 g

Dextrose.....	2 g
NaCl.....	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Água Deionizada.....	1000 mL

Ajustar o pH final para 7.4 +/- 0.2.

3- Meio TSA/TSB – Ágar/ Caldo Caseína Soja (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2020c)

Meio Ágar:

Ágar Caseína Soja (BD 236950)	40 g
Água Deionizada	1000 mL

Autoclavar a 121°C.

Meio Caldo:

Caldo Caseína Soja (BD 211825)	30 g
Água Deionizada	1000 mL

Autoclavar a 121°C

Para fazer o caldo omitir o ágar.

Composição do Ágar Caseína Soja:

Triptona.....	17 g
Soytone.....	3 g
Dextrose.....	2,5 g
NaCl.....	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Ágar.....	15 g

Ajustar o pH final para 7.3 +/- 0.2.

4- Meio Ágar/ Caldo Clostridial Reforçado Modificado (RCM) (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2020d)

Triptose.....	10 g
Extrato de carne.....	10 g
Extrato de levedura.....	3 g
Dextrose.....	5 g
NaCl.....	5g
Amido Solúvel.....	1 g

HCl L-Cisteína.....	5 g
Acetato de Sódio.....	3 g
Resazurin (0,025%).....	4 mL
Água Deionizada.....	1000 mL

Misturar os ingredientes e dissolver. Ajustar o pH para 6,8. Dispensar e autoclavar a 121°C.

5- Meio Esporulação Nutriente incluindo Fosfato – NSMP (Nutrient Sporulation Medium including Phosphate) (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2020e)

Ácido Casimino.....	5 g
Glicose.....	2 g
KH ₂ PO ₄	0,86 g
K ₂ HPO ₄	0,55 g
Citrato de Sódio.....	0,60 g
CaCl ₂	0,1 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O.....	0,016 g
MnCl ₂ x 6H ₂ O.....	0,43 g

ZnCl₂..... 7 mg

FeCl₃..... 3 mg

Ágar (se necessário) 15 g

Água Deionizada..... 1000 mL

Ajustar o pH para 6,5. Autoclavar a 121°C. Após autoclavação, meio apresentará precipitação. Ele ficará claro depois de ficar em temperatura ambiente por 1 dia.

6- Meio TSA/TSB – Ágar/ Caldo Caseína Soja com 5% de Sangue de Ovelha

(desfibrinado) (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2020f)

Meio Ágar:

Ágar Caseína Soja (BD 236950) ... 40 g

Sangue de Ovelha (desfibrinado) .. 50 mL

Água Deionizada 950 mL

Autoclavar a 121°C. Arrefecer o meio esterilizado a ~ 47°C. Adicione assepticamente 50 ml de sangue de ovelha desfibrinado à temperatura ambiente. Misture delicadamente e distribua conforme necessário.

Meio Caldo:

Caldo Caseína Soja (BD 211825) 30 g

Sangue de Ovelha (desfibrinado) 50 mL

Água Deionizada 950 mL

Seguir o mesmo procedimento que o meio de Ágar acima.

Se o produto comercializado não estiver disponível, o Ágar Caseína Soja pode ser produzido a partir do zero, seguindo a formulação abaixo:

Composição do Ágar Caseína Soja:

Triptona..... 15 g

Soytone..... 5 g

NaCl..... 5 g

Ágar..... 15 g

Água Deionizada 950 mL

Ajustar o pH final para 7.3 +/- 0.2.

Para fazer o caldo omitir o ágar.

4- Meio Ágar/ Caldo Neomicina (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2020g)

Extrato de carne.....	1.5 g
Extrato de levedura.....	3 g
Peptona.....	6 g
Glicose.....	1g
Casitona.....	4 g
Solução Neomicina.....	50 mL
Ágar.....	15 g
Água Deionizada.....	950 mL

Ajustar o pH para 7.0 Autoclavar a 121°C.

Solução Neomicina:

Neomicina.....	1 g
Água Deionizada	50 mL

* Filtrar a solução esterilizada e adicionar ao meio básico estéril

ANEXO B – MICRORGANISMOS CORRETAMENTE IDENTIFICADOS POR CARTÃO DO SISTEMA VITEK® 2.

1- Microrganismos corretamente identificados no cartão ANC ID VITEK® 2.

Bacterial species	Total no. of isolates tested	Overall % correctly identified	% of low discrimination	% Incorrectly identified	% Unidentified
<i>Actinomyces israelii</i>	2	50	0	50	0
<i>Actinomyces meyeri</i>	2	100	0	0	0
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	4	100	0	0	0
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	100	0	0	0
<i>Bacteroides caccae</i>	3	100	0	0	0
<i>Parabacteroides (Bacteroides) distasonis</i>	7	100	0	0	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	40	97.5	0	2.5	0
<i>Bacteroides ovatus</i>	8	100	0	0	0
<i>Bacteroides stercoris</i>	1	100	0	0	0
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	21	95.2	4.8	4.8	0
<i>Bacteroides uniformis</i>	6	100	0	0	0
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1	100	0	0	0
<i>Bacteroides vulgatus</i>	13	100	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4	75	25	25	0
<i>Clostridium baratii</i>	1	100	0	0	0
<i>Clostridium bifermentans</i>	5	100	100	0	0
<i>Clostridium butyricum</i>	1	100	100	0	0
<i>Clostridium cadaveris</i>	3	100	0	0	0
<i>Clostridium clostridioforme</i>	4	75	25	25	0
<i>Clostridium difficile</i>	4	75	0	25	0
<i>Clostridium paraputrificum</i>	5	100	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	32	100	0	0	0
<i>Clostridium ramosum</i>	11	90.9	0	9.1	0
<i>Clostridium septicum</i>	8	87.5	0	12.5	0
<i>Clostridium sordellii</i>	2	0	0	50	50
<i>Clostridium sporogenes</i>	2	100	100	0	0
<i>Clostridium subterminale</i>	1	100	100	0	0
<i>Clostridium tertium</i>	7	71.4	0	28.6	0
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	2	100	0	0	0
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	3	100	66.7	0	0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	10	100	0	0	0
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	9	100	0	0	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	20	100	5	0	0
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	2	100	0	0	0
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	5	80	0	20	0
<i>Eggerthella lenta</i>	9	100	0	0	0
<i>Eubacterium limosum</i>	3	100	0	0	0
<i>Finegoldia magna</i>	14	100	0	0	0
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	3	100	0	0	0
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	7	71.4	0	28.6	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7	100	14.3	0	0
<i>Lactobacillus gasserii</i>	2	100	0	0	0
<i>Micromonas micros</i>	7	100	0	0	0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	3	100	0	0	0
<i>Prevotella bivia</i>	7	100	14.3	0	0
<i>Prevotella buccae</i>	3	100	0	0	0
<i>Prevotella intermedia</i>	3	66.7	0	33.3	0
<i>Prevotella melaninogenica</i>	4	75	25	25	0
<i>Prevotella oralis</i>	1	100	0	0	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	35	97.1	0	2.9	0
<i>Veillonella</i> spp.	6	100	0	0	0
Cumulative totals	365	95.1	4.9	4.6	0.3

Fonte: (Adaptado de RENNIE *et al.*, 2008).

2 - Microrganismo corretamente identificados no cartão GP ID VITEK® 2.

<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Listeria seeligeri</i>
<i>Aerococcus urinae</i>	<i>Listeria welshimeri</i>
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Micrococcus luteus/lylae</i>
<i>Alloicoccus otitis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Dermacoccus nishinomijaensis/ Kytococcus sedentarius</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Staphylococcus arlettae</i>
<i>Enterococcus cecorum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterococcus columbae</i>	<i>Staphylococcus auricularis</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Staphylococcus cohnii ssp. cohnii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus cohnii ssp. urealyticum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>
<i>Facklamia hominis</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Staphylococcus kloosii</i>
<i>Gemella bergeri</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Gemella sanguinis</i>	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
<i>Globicatella sanguinis</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Staphylococcus vitulinus</i>
<i>Granulicatella elegans</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>Helcococcus kunzii</i>	<i>Staphylococcus xylosum</i>
<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Kocuria rosea</i>	<i>Streptococcus alactolyticus</i>
<i>Kocuria varians</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Streptococcus canis</i>
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	<i>Streptococcus constellatus ssp. constellatus</i>
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	<i>Streptococcus constellatus ssp. pharyngis</i>
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Streptococcus cristatus</i>
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Streptococcus downei</i>
<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae ssp. dysgalactiae</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum</i>	<i>Streptococcus equi ssp. equi</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i>	<i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i>
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<i>Streptococcus equinus</i>
<i>Listeria grayi</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
<i>Listeria innocua</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Streptococcus hyointestinalis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus infantarius</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Streptococcus ovis</i>	<i>Streptococcus lutetiensis/Streptococcus bovis</i>
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis/Streptococcus oralis</i>
<i>Streptococcus pasteurianus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	<i>Streptococcus suis I</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus suis II</i>
<i>Streptococcus porcinus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus thoralensis</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>
<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Staphylococcus caprae</i>
<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Staphylococcus carnosus ssp. carnosus</i>
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
	<i>Staphylococcus uberis</i>
	<i>Streptococcus vestibularis</i>
	<i>Vagococcus fluvialis</i>

Fonte: (Adaptado de PINCUS, 2006).

3- Microrganismo corretamente identificados no cartão GN ID VITEK® 2.

Enterobacteriaceae	Non-Enterobacteriaceae
<i>Buttiauxella agrestis</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> ssp. <i>dentrificans</i>
<i>Cedecea davisae</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> ssp. <i>xylosoxidans</i>
<i>Cedecea lapagei</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Acinetobacter junii</i>
<i>Citrobacter farmeri</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Actinobacillus ureae</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Aeromonas hydrophila/Aeromonas caviae</i>
<i>Citrobacter sedlakii</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Citrobacter youngae</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> ssp. <i>faecalis</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i> 1	<i>Bordetella trematum</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i> 2	<i>Brevundimonas diminuta/vesicularis</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Budvicia aquatica</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> group
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>
<i>Enterobacter intermedius</i>	<i>Burkholderia mallei</i>
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
<i>Escherichia coli</i>	CDC group EF-4 (<i>Pasteurella</i>)
<i>Escherichia coli</i> O157	CDC group EO-2 (<i>Psychrobacter</i>)
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>
<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Chryseobacterium gleum</i>
<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
<i>Ewingella americana</i>	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Delftia acidovorans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i>	<i>Francisella tularensis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>rhinoscleromatis</i>	<i>Methylobacterium</i> spp.
<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Moraxella</i> group
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Myroides</i> spp.
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
<i>Moellerella wisconsensis</i>	<i>Oligella ureolytica</i>
<i>Morganella morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	<i>Pasteurella aerogenes</i>
<i>Morganella morganii</i> ssp. <i>sibirii</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
<i>Pantoea</i> spp.	<i>Photobacterium damsela</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Proteus vulgaris</i> group/ <i>Proteus penneri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Providencia rustigianii</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i> ssp. <i>arizonae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Salmonella</i> group	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>
<i>Salmonella</i> ser. Paratyphi A	<i>Ralstonia pauca</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
<i>Serratia ficaria</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
<i>Serratia fonticola</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
<i>Serratia liquefaciens</i> group	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>
<i>Serratia odorifera</i>	<i>Sphingobacterium thalophilum</i>
<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Serratia rubidaea</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Shigella</i> group	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i> group	<i>Vibrio fluvialis</i>
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Vibrio hollisae</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Vibrio metschnikovii</i>
<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Yokenella regensburgei</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	<i>Vibrio vulnificus</i>

Fonte: (Adaptado de PINCUS, 2006).

4- Microrganismo corretamente identificados no cartão BCL ID VITEK® 2.

<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	<i>Brevibacillus choshinensis</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Brevibacillus invocatus</i>
<i>Bacillus badius</i>	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
<i>Bacillus cereus/Bacillus thuringiensis</i>	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Geobacillus thermoglucosidasius/</i> <i>Geob. thermodenitrificans</i>
<i>Bacillus firmus</i>	
<i>Bacillus lentus</i>	<i>Paenibacillus alvei</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Paenibacillus durus</i>
<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Paenibacillus gluconolyticus</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Paenibacillus macerans</i>
<i>Bacillus smithii</i>	<i>Paenibacillus pabuli</i>
<i>Bacillus sphaericus/Bacillus fusiformis</i>	<i>Paenibacillus peoriae</i>
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
<i>Bacillus subtilis/Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>
<i>Brevibacillus agri</i>	<i>Paenibacillus validus</i>
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>
<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>Virgibacillus proomii</i>
<i>Brevibacillus centrosporus</i>	

Fonte: (Adaptado de PINCUS, 2006).

Species	Total strains*	Overall correct identification (%)	
		BCL	BAC
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	100	100
<i>Bacillus cereus</i> †	14	100	64
<i>Bacillus coagulans</i>	3	100	0
<i>Bacillus firmus</i>	6	100	33
<i>Bacillus licheniformis</i>	13	100	77
<i>Bacillus megaterium</i>	4	75	100
<i>Bacillus mycoides</i> †	3	100	100
<i>Bacillus pumilus</i>	10	100	90
<i>Bacillus subtilis</i>	15	100	100
<i>Bacillus thuringiensis</i> †	8	100	100
<i>Bacillus flexus</i> ‡	1	0	100
<i>Bacillus simplex</i> ‡	3	67	0
<i>Bacillus soralis</i> ‡	1	100	0
<i>Bacillus sp.</i> ‡	2	100	0
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	1	100	100
<i>Brevibacillus centrosporus</i>	1	100	0
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1	100	NT
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	2	100	NT
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	2	100	NT
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	5	60	75
<i>Paenibacillus alvei</i>	5	100	80
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	1	100	100
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	1	100	100
<i>Paenibacillus lautus</i> ‡	2	0	0
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	3	67	67
Total	109	93	70

Fonte: (Adaptado de HALKET, 2010).

ANEXO C – PROVAS BIOQUÍMICAS CONTIDAS POR CARTÃO DO SISTEMA VITEK® 2.

1- Provas bioquímicas contidas no cartão GP ID VITEK® 2.

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
2	D-AMYGDALIN	AMY	0.1875 mg
4	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	PIPLC	0.015 mg
5	D-XYLOSE	dXYL	0.3 mg
8	ARGININE DIHYDROLASE 1	ADH1	0.111 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
11	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
13	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
14	CYCLODEXTRIN	CDEX	0.3 mg
15	L-Aspartate ARYLAMIDASE	AspA	0.024 mg
16	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	BGAR	0.00204 mg
17	ALPHA-MANNOSIDASE	AMAN	0.036 mg
19	PHOSPHATASE	PHOS	0.0504 mg
20	Leucine ARYLAMIDASE	LeuA	0.0234 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
24	BETA GLUCURONIDASE	BGURr	0.0018 mg
25	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
26	L-Pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
27	BETA-GLUCURONIDASE	BGUR	0.0378 mg
28	Alanine ARYLAMIDASE	AlaA	0.0216 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
30	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	POLYMXIN B RESISTANCE	POLYB	0.00093 mg
37	D-GALACTOSE	dGAL	0.3 mg
38	D-RIBOSE	dRIB	0.3 mg
39	L-LACTATE alkalinization	ILATk	0.15 mg
42	LACTOSE	LAC	0.96 mg
44	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	NAG	0.3 mg
45	D-MALTOSE	dMAL	0.3 mg
46	BACITRACIN RESISTANCE	BACI	0.0006 mg
47	NOVOBIOCIN RESISTANCE	NOVO	0.000075 mg
50	GROWTH IN 6.5% NaCl	NC6.5	1.68 mg
52	D-MANNITOL	dMAN	0.1875 mg
53	D-MANNOSE	dMNE	0.3 mg
54	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	MBdG	0.3 mg
56	PULLULAN	PUL	0.3 mg
57	D-RAFFINOSE	dRAF	0.3 mg
58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	O129R	0.0084 mg
59	SALICIN	SAL	0.3 mg
60	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0.3 mg
62	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
63	ARGININE DIHYDROLASE 2	ADH2s	0.27 mg
64	OPTOCHIN RESISTANCE	OPTO	0.000399 mg

Fonte: (Adaptado de PINCUS, 2006).

2- Provas bioquímicas contidas no cartão GN ID VITEK® 2

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0.1875 mg
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0.3 mg
7	D-CELLOBIOSE	dCEL	0.3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BCAL	0.036 mg
10	H ₂ S PRODUCTION	H ₂ S	0.0024 mg
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0.0408 mg
12	Glutaryl Arylamidase pNA	AGLTp	0.0324 mg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0.3 mg
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	GGT	0.0228 mg
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	OFF	0.45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0.036 mg
18	D-MALTOSE	dMAL	0.3 mg
19	D-MANNITOL	dMAN	0.1875 mg
20	D-MANNOSE	dMNE	0.3 mg
21	BETA-XYLOSIDASE	BXYL	0.0324 mg
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	BAlap	0.0174 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
26	LIPASE	LIP	0.0192 mg
27	PALATINOSE	PLE	0.3 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
33	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0.3 mg
34	D-TAGATOSE	dTAG	0.3 mg
35	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
36	CITRATE (SODIUM)	CIT	0.054 mg
37	MALONATE	MNT	0.15 mg
39	5-KETO-D-GLUCONATE	5KG	0.3 mg
40	L-LACTATE alkalisation	ILATk	0.15 mg
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
42	SUCCINATE alkalisation	SUCT	0.15 mg
43	Beta-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0.0306 mg
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
45	PHOSPHATASE	PHOS	0.0504 mg
46	Glycine ARYLAMIDASE	GlyA	0.012 mg
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	ODC	0.3 mg
48	LYSINE DECARBOXYLASE	LDC	0.15 mg
52	DECARBOXYLASE BASE	ODEC	N/A
53	L-HISTIDINE assimilation	IHISa	0.087 mg
56	COUMARATE	CMT	0.126 mg
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0.0378 mg
58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	O129R	0.0105 mg
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	GGAA	0.0576 mg
61	L-MALATE assimilation	IMLTa	0.042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0.03 mg
64	L-LACTATE assimilation	ILATa	0.186 mg

Fonte: (Adaptado de PINCUS, 2006).

3- Provas bioquímicas contidas no cartão BCL ID VITEK® 2.

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
1	BETA-XYLOSIDASE	BXYL	0.0324 mg
3	L-Lysine-ARYLAMIDASE	LysA	0.0228 mg
4	L-Aspartate ARYLAMIDASE	AspA	0.024 mg
5	Leucine-ARYLAMIDASE	LeuA	0.0234 mg
7	Phenylalanine ARYLAMIDASE	PheA	0.0264 mg
8	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BCAL	0.036 mg
10	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
11	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
12	Alanine ARYLAMIDASE	AlaA	0.0222 mg
13	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0282 mg
14	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0.0408 mg
15	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
18	CYCLODEXTRIN	CDEX	0.3 mg
19	D-GALACTOSE	dGAL	0.3 mg
21	GLYCOGEN	GLYG	0.1875 mg
22	myo-INOSITOL	INO	0.3 mg
24	METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE acidification	MdG	0.3 mg
25	ELLMAN	ELLM	0.03 mg
26	METHYL-D-XYLOSIDE	MdX	0.3 mg
27	ALPHA-MANNOSIDASE	AMAN	0.036 mg
29	MALTOTRIOSE	MTE	0.3 mg
30	Glycine ARYLAMIDASE	GlyA	0.012 mg
31	D-MANNITOL	dMAN	0.3 mg
32	D-MANNOSE	dMNE	0.3 mg
34	D-MELEZITOSE	dMLZ	0.3 mg
36	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	NAG	0.3 mg
37	PALATINOSE	PLE	0.3 mg
39	L-RHAMNOSE	IRHA	0.3 mg
41	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0.036 mg
43	BETA-MANNOSIDASE	BMAN	0.036 mg
44	PHOSPHORYL CHOLINE	PHC	0.0366 mg
45	PYRUVATE	PVATE	0.15 mg
46	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
47	D-TAGATOSE	dTAG	0.3 mg
48	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
50	INULIN	INU	0.12 mg
53	D-GLUCOSE	dGLU	0.3 mg
54	D-RIBOSE	dRIB	0.3 mg
56	PUTRESCINE assimilation	PSCNa	0.201 mg
58	GROWTH IN 6.5% NaCl	NaCl 6.5%	1.95 mg
59	KANAMYCIN RESISTANCE	KAN	0.006 mg
60	OLEANDOMYCIN RESISTANCE	OLD	0.003 mg
61	ESCULIN hydrolysis	ESC	0.0225 mg
62	TETRAZOLIUM RED	TTZ	0.0189 mg
63	POLYMXIN_B RESISTANCE	POLYB_R	0.00093 mg

Fonte: (Adaptado de PINCUS, 2006).