

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GRUPO *Bacillus cereus*
ISOLADAS EM INDÚSTRIAS FARMACÊUTICAS: UMA REVISÃO DA
LITERATURA**

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GRUPO *Bacillus cereus*
AISLADAS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA: UNA REVISIÓN DE
LA LITERATURA**

**IDENTIFICATION OF SPECIES FROM THE *Bacillus cereus* GROUP
ISOLATED IN PHARMACEUTICAL INDUSTRIES: A LITERATURE
REVIEW**

Ana Beatriz Lima dos Santos Tiburcio

Departamento de Desenvolvimento
Experimental e Pré-Clínico
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0009-0002-7066-0824>
ana.tiburcio@bio.fiocruz.br

Luciana Veloso da Costa

Departamento de Desenvolvimento
Experimental e Pré-Clínico
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0000-0003-1873-4056>
luciana.costa@bio.fiocruz.br

Rebeca Vitória da Silva Lage de Miranda

Laboratório de Laboratório de Controle
Microbiológico
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-7131-6155>
rebeca.lage@gmail.com

Marcelo Luiz Lima Brandão

Departamento de Desenvolvimento
Experimental e Pré-Clínico
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0000-0003-1121-7312>
marcelo.brandao@bio.fiocruz.br

ARTIGO CIENTÍFICO
Submetido em: 10/12/2025
Aprovado em: 15/12/2025

RESUMO

Este artigo teve como objetivo revisar os métodos utilizados para identificar espécies do grupo *Bacillus cereus* sensu lato (*s.l.*), no contexto da indústria farmacêutica. Para isso, realizou-se uma revisão da literatura, selecionando estudos que abordassem técnicas fenotípicas, proteômicas e genotípicas aplicadas à identificação desse grupo bacteriano. A revisão mostrou que os métodos tradicionais como VITEK 2 e MALDI TOF - MS apresentam limitações, especialmente devido à baixa capacidade discriminatória entre espécies próximas. O sequenciamento do gene 16S rRNA também se mostrou insuficiente para diferenciar membros do grupo. Em contraste, outros genes de manutenção como *rpoB* e *gyrB* demonstraram maior precisão. Entretanto, a única forma precisa de atingir em nível de espécie por meio do sequenciamento do genoma completo, que se destacou como o método de identificação definitiva mais confiável. Conclui-se que a combinação de métodos rápidos com ferramentas genômicas de maior resolução é essencial para aprimorar a identificação e fortalecer a rastreabilidade microbiana em ambientes farmacêuticos.

Palavras-Chave: *Bacillus cereus*. Indústria farmacêutica. Contaminação. Controle da Qualidade. Identificação.

RESUMEN

Este artículo tuvo como objetivo revisar los métodos utilizados para identificar especies del grupo *Bacillus cereus* sensu lato (*s.l.*) en el contexto de la industria farmacéutica. Para ello, se realizó una revisión de la literatura, seleccionando estudios que abordaran técnicas fenotípicas, proteómicas y genotípicas aplicadas a la identificación de este grupo bacteriano. La revisión mostró que los métodos tradicionales, como VITEK 2 y MALDI-TOF MS, presentan limitaciones, especialmente debido a la baja capacidad de discriminación entre especies estrechamente relacionadas. La secuenciación del gen 16S rRNA también resultó insuficiente para diferenciar miembros del grupo. En contraste, otros genes de mantenimiento, como *rpoB* y *gyrB*, demostraron mayor precisión. Sin embargo, la única manera precisa de alcanzar la identificación a nivel de especie es mediante el secuenciamiento completo del genoma, que se destaca como el método más confiable para la identificación definitiva. Se concluye que la combinación de métodos rápidos con herramientas genómicas de mayor resolución es esencial para mejorar la identificación y fortalecer la trazabilidad microbiológica en entornos farmacéuticos.

Palavras Clave: *Bacillus cereus*. Industria farmacéutica. Contaminación. Control de calidad. Identificación.

ABSTRACT

This study aimed to review the methods used to identify species of the *Bacillus cereus* sensu lato (*s.l.*) group in the context of the pharmaceutical industry. A literature review was conducted, selecting studies that addressed phenotypic, proteomic, and genotypic techniques applied to the identification of this bacterial group. The review showed that traditional methods, such as VITEK 2 and MALDI-TOF MS, present limitations, especially due to their low discriminatory power between closely related species. Sequencing of the 16S rRNA gene also

proved insufficient to distinguish members of the group. In contrast, other housekeeping genes, such as *rpoB* and *gyrB*, demonstrated greater precision. However, the only accurate approach to achieve species-level identification is through whole-genome sequencing, which stands out as the most reliable method for definitive identification. It is concluded that combining rapid methods with higher-resolution genomic tools is essential to improve identification and strengthen microbial traceability in pharmaceutical environments.

Keywords: *Bacillus cereus*. Pharmaceutical Industry. Contamination. Quality Control. Identification.

1 INTRODUÇÃO

Bacillus cereus sensu lato (s.l.), também conhecido como grupo *B. cereus*, é composto por bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete, aeróbias ou anaeróbias facultativas, produtoras de endósporos (ZERVAS et al., 2020). Esse grupo é composto por uma grande diversidade de espécies do gênero *Bacillus*, como *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus paranthracis*, *Bacillus tropicus*, entre outros (GUPTA et al., 2020). O grupo é excessivamente heterogêneo, apesar de compartilhar características genéticas e morfológicas extremamente semelhantes, o que dificulta a diferenciação das espécies. Essa dificuldade foi evidenciada por Lotte e colaboradores (2022), que por meio de uma análise filogenética baseada na concatenação de sete genes de manutenção, demonstraram a estreita relação entre as 16 espécies que compõem o grupo, incluindo as espécies fundadoras do grupo *B. cereus sensu stricto (s.s.)*, um patógeno oportunista e deteriorador de alimentos, *B. anthracis*, o agente etiológico do antraz, e *B. thuringiensis*, um entomopatógeno, com cepas específicas amplamente utilizadas como agentes de controle biológico (ZERVAS et al., 2020), e espécies emergentes como *B. paranthracis* e *B. wiedmannii* (Fig. 1).

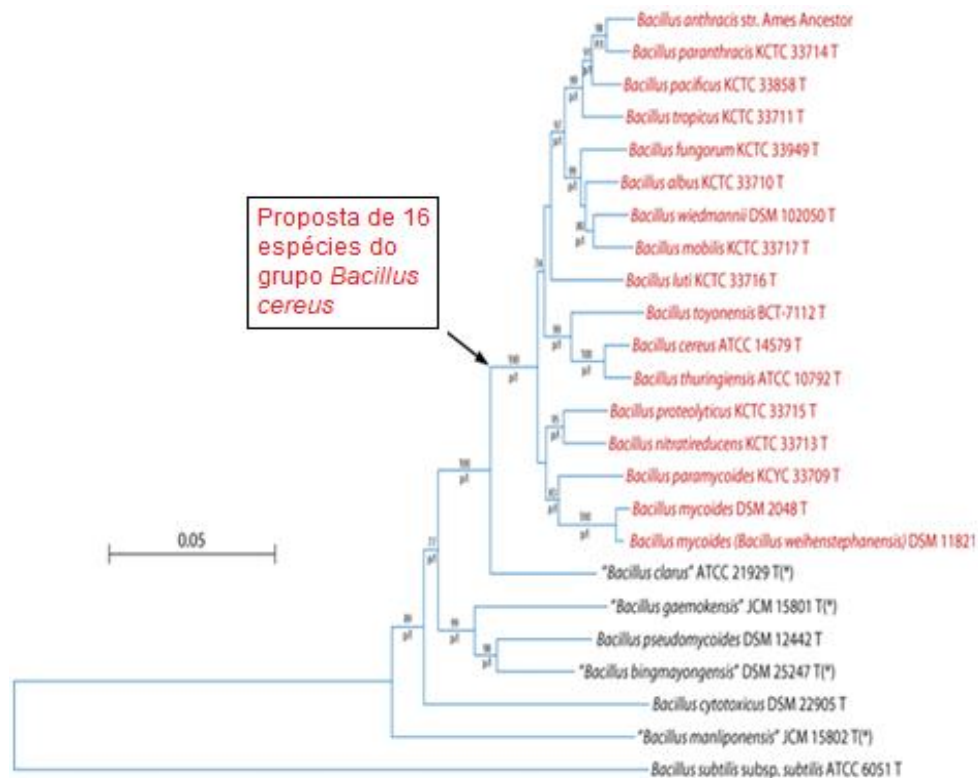


Figura 1. Relações filogenéticas entre as espécies do grupo *Bacillus cereus*, com *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* utilizado como grupo externo. A árvore foi obtida pelo método neighbor-joining, com base na comparação das seqüências concatenadas de sete genes constitutivos (*glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA*, *tpi*). A medida de distância de Kimura 2-parâmetros foi utilizada conforme implementado no MEGA X. Os valores acima das linhas indicam o suporte dos ramos da árvore de acordo com a análise de *bootstrap* ($\times 100$ repetições). Apenas valores superiores a 70% são exibidos. As letras “p” e “l” sob as linhas indicam ramos também encontrados pelos métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança, respectivamente. A barra de escala representa as mudanças acumuladas por nucleotídeo. Os asteriscos indicam espécies publicadas, mas ainda não validadas. Adaptado de Lotte et al. (2022).

Espécies do grupo *B. cereus sensu lato (s.l.)* são encontradas em solos, água, sedimentos, plantas, alimentos e até mesmo em ambientes hospitalares e industriais, sendo reconhecidas tanto pela sua relevância clínica quanto pelo seu impacto na cadeia produtiva de alimentos e fármacos (COSTA et al., 2022b; CALDEIRA et al., 2024; MATTOSO et al., 2025). Do ponto de vista clínico, *B. cereus* é um dos principais agentes causadores de intoxicação alimentar no mundo, estando associado a dois quadros gastrointestinais clássicos: diarreico e o emético, induzido pela produção da toxina cereulida (BENNETT, 2001; TALLENT et al., 2020). Além das doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA), membros do grupo podem causar infecções oportunistas graves, incluindo septicemia, meningite, endocardite e

pneumonias, principalmente quando se trata de indivíduos imunocomprometidos e neonatos (EHLING-SCHULZ et al., 2019; LIN; BRIANDET; KOVÁCS, 2022).

No que diz respeito a indústria farmacêutica, a sua introdução pode ocorrer por diversas fontes, podendo estar presente em matérias-primas, insumos e produtos intermediários ou finais (SANDLE, 2014; COSTA et al., 2022a; CALDEIRA et al., 2024; MATTOSO et al., 2025). Sua capacidade de formação de endósporos resistentes permite que esse microrganismo sobreviva em condições adversas como calor extremo, radiação e na presença de agentes químicos (SETLOW, 2006; STECCHINI et al., 2009; DEAL et al., 2016). Ademais, *B. cereus* também é capaz de formar biofilme, matriz extracelular composta por substâncias poliméricas capaz aderir a diversos tipos de superfícies (plásticos, polipropileno, aço inoxidável, vidro, borracha, entre outros), dificultando sua eliminação (PDA, 2015; DEAL et al., 2016; FERNANDES et al., 2022).

No contexto do controle da qualidade higiênico-sanitário de alimentos para o consumo, a identificação do grupo *B. cereus* em nível de espécie não é obrigatória, segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2022, 2024). Nos grupos de alimentos em que o microrganismo é preconizado, é considerado suficiente o resultado presuntivo obtido a partir do crescimento em meios seletivos, como o ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP) ou ágar Bacara, associado à observação de colônias características de *B. cereus* e ao teste de hemólise, onde se espera β -hemólise (TALLENT et al., 2020; BRASIL, 2024). Essa abordagem é adotada devido ao alto custo para os laboratórios de microbiologia de alimentos para atingir a identificação em nível de espécie, considerando a alta probabilidade de que a linhagem analisada pertença à espécie *B. cereus*, quando encontrada em alimentos (BRASIL, 2024).

Na indústria farmacêutica, a identificação em nível de espécie é essencial para a tomada de decisões de forma assertiva (NUNES RAMOS et al., 2025). Microrganismos provenientes de testes de esterilidade de produtos finalizados, simulações assépticas ou áreas críticas de produção (graus A e B) devem ser identificados em nível de espécie, pois isso permite investigar a origem da contaminação, tomar decisões preventivas e corretivas e avaliar o potencial impacto na qualidade, eficácia, segurança e estabilidade do produto final (FDA, 2004; EMA, 2022; ANVISA, 2024). Mesmo em áreas menos críticas (graus C e D), a identificação e o monitoramento de microrganismos formadores de esporos ou produtores de biofilmes são importantes para controlar contaminantes resistentes a processos de limpeza e desinfecção (SANDLE, 2014; DEAL et al., 2016; EMA, 2022).

Os ensaios bioquímicos convencionais ainda representam os principais métodos laboratoriais utilizados para identificação microbiana. Nestes ensaios, uma suspensão celular é

exposta a substratos e reagentes específicos, e os microrganismos apresentam respostas bioquímicas distintas, conforme seu perfil metabólico (NUNES RAMOS et al., 2025). Pode-se citar como exemplo, o sistema VITEK®2 (bioMérieux) que fornece os resultados da identificação por comparação do perfil bioquímico do microrganismo com sua base de dados (BD). No entanto, em função da limitação dessa BD, o sistema identifica incorretamente ou não é capaz de identificar muitas espécies microbianas de origem ambiental, inclusive espécies de *Bacillus* e gêneros correlatos (COSTA et al., 2022a; de MIRANDA et al., 2023; CALDEIRA et al., 2024).

Outro método amplamente empregado na microbiologia clínica e em alguns laboratórios de controle da qualidade de indústria farmacêutica é a Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF MS) (BLOISE et al., 2022; NUNES RAMOS et al., 2025). Esta técnica permite a identificação rápida, acurada e com baixos custos de insumos, sendo baseada na análise do perfil proteico dos microrganismos. O conjunto de picos obtidos gera um espectro, que funciona como uma espécie de “impressão digital” proteica da amostra analisada. A identificação dos microrganismos ocorre por comparação do espectro gerado com uma BD de espectros de referência previamente catalogados. As BD disponíveis nos sistemas comerciais de MALDI-TOF MS apresentam limitações quanto aos microrganismos de origem ambiental, que compõem a microbiota de ambientes de produção industrial farmacêutica (COSTA et al., 2022a; 2022b; de MIRANDA et al., 2023; CALDEIRA et al., 2024). Além disso, o investimento inicial necessário para a aquisição do equipamento inviabiliza a sua utilização em muitos laboratórios de controle microbiológico farmacêutico (NUNES RAMOS et al., 2025).

Em função das limitações nas metodologias de identificação apresentadas, ressalta-se a busca por métodos complementares, como os métodos genotípicos, que se baseiam na análise de características genéticas específicas microbianas, com o objetivo de determinar sua identidade. Os métodos mais comuns são a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento genético (NUNES RAMOS et al., 2025). A escolha do gene a ser analisado é fundamental para garantir uma identificação mais assertiva. Um dos genes mais utilizados para a identificação bacteriana é o 16S rRNA, gene que dá origem à subunidade menor (30S) do ribossomo dos procariotos. Ele é altamente conservado entre espécies bacterianas, ou seja, é encontrado em praticamente todas as espécies, o que favoreceu a sua utilização como base para a taxonomia bacteriana (CHALITA et al., 2024). No entanto, o gene 16S rRNA também apresenta limitações quando se trata da identificação de espécies do grupo *B. cereus*, já que não

oferece a resolução necessária para diferenciar espécies muito próximas dentro do grupo, pois as sequências deste gene são praticamente idênticas (GUPTA et al., 2020).

Diante dessas limitações, surge a necessidade de estratégias complementares que possibilitem uma identificação mais precisa das espécies do grupo *B. cereus*, permitindo uma avaliação adequada do risco microbiológico e a implementação de medidas preventivas eficientes. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão da literatura sobre os métodos de identificação do grupo *B. cereus* na indústria farmacêutica, discutindo abordagens complementares que possam aprimorar a diferenciação das espécies desse grupo em ambientes críticos de produção.

2 METODOLOGIA

Este estudo consiste em uma revisão integrativa (RI) da literatura, estruturada em fases (SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010; BOTELHO et al, 2011). Inicialmente, buscou-se responder às seguintes questões: Quais os desafios relacionados à diferenciação das espécies do grupo *B. cereus sensu lato (s.l.)* no contexto da indústria farmacêutica? Quais métodos tradicionais e moleculares são empregados para a caracterização dessas bactérias? Quais são as limitações dos métodos atualmente disponíveis? E quais estratégias têm sido propostas para aprimorar a acurácia na identificação microbiológica?

O levantamento bibliográfico foi realizado a partir de junho de 2025 até outubro de 2025 nos seguintes bancos de dados: PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), plataforma Scielo Brazil (Scientific Eletronic Library Online (www.scielo.br), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>) e Google Acadêmico (<https://scholar.google.com/>) utilizando-se as seguintes palavras-chaves: *Bacillus cereus* ou (“or”) *B. cereus* + e (“and”) seguido dos descritores em português: método de identificação, MALDI-TOF, VITEK 2, análise filogenética, indústria farmacêutica, e em inglês: *identification method*, MALDI-TOF, VITEK 2, *phylogenetic analysis*, *pharmaceutical industry*. Também foram consultados documentos publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e Ministério da Saúde. Como critérios de inclusão, foram selecionados artigos publicados entre 2009 e 2025, em inglês e português, abrangendo estudos originais, artigos de revisão e pesquisas aplicadas à indústria farmacêutica envolvendo *B. cereus* e os métodos de identificação das espécies desse grupo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A revisão integrativa permitiu reunir e analisar as principais evidências disponíveis sobre os desafios e estratégias relacionados à identificação de espécies do grupo *B. cereus* no contexto da indústria farmacêutica. Durante o levantamento bibliográfico, foram identificados e selecionados estudos que abordam desde as limitações dos métodos fenotípicos tradicionais até os avanços das técnicas moleculares e genômicas aplicadas à microbiologia industrial. O número de artigos identificados nas bases de dados consultadas está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Estudos identificados e selecionados nas bases de dados consultadas N= 201 no período de 2009 e 2025.

Bases de dados	Estudos identificados	Estudos selecionados
PubMed,	112	4
Scielo Brazil	32	3
Google Acadêmico	57	0
	201	7

Fonte: Elaborada pelos autores.

Após consolidar os artigos recuperados e selecionados, observou-se a presença de duplicações, que foram excluídas, restando um total de 7 artigos (**Tabela 1**). A descrição dos estudos está apresentada no **Quadro 1**.

Quadro 1. Publicações selecionadas referentes à identificação de espécies do grupo *Bacillus cereus sensu lato (s.l.)*.

Autores/ano/tipo de estudo	Instituição dos autores	Objetivo principal
Ki et al. (2009) – Estudo molecular / filogenético	Universidade de Ciência e Tecnologia de Hong Kong	Avaliar a aplicabilidade dos genes <i>rpoB</i> e <i>gyrB</i> para diferenciação de espécies de <i>Bacillus</i> .
Ha et al. (2019) – Estudo aplicado /experimental	Universidade Nacional de Seul, Coreia do Sul	Avaliar o uso de biomarcadores de baixo peso molecular (500–3.000 m/z) para diferenciar espécies próximas de <i>Bacillus cereus</i> por MALDI-TOF MS.
Kovac et al (2016) – Revisão genômica	Cornell University, EUA	Compreender a distribuição e expressão dos genes de toxinas e virulência entre isolados alimentares do grupo <i>Bacillus cereus</i> , para possibilitar uma caracterização confiável que permita avaliar a probabilidade de um isolado causar doença de origem alimentar.
Lotte et al. (2022) – Estudo filogenético comparativo	Universidade de Lyon, França	Revisar e atualizar o conhecimento disponível sobre as infecções invasivas causadas por espécies do grupo <i>Bacillus cereus</i> em recém-nascidos prematuros, abordando aspectos taxonômicos, microbiológicos, clínicos, epidemiológicos e terapêuticos, além de discutir a possível contribuição de cepas hipervirulentas e da imaturidade imunológica neonatal na gravidade dessas infecções.
Costa et al. (2022b) – Estudo aplicado / experimental	Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil	Expandir o banco de dados do MALDI-TOF MS com espectros de linhagens do gênero <i>Bacillus</i> e gêneros relacionados isoladas do ambiente industrial.
Song et al. (2024) – Estudo de validação / microbiologia industrial	Institute for Food and Drug Control, Shanghai, China.	Desenvolver um pipeline integrado de identificação microbiana (MALDI-TOF, 16S rRNA e SGC) aplicado ao monitoramento ambiental de áreas classificadas.
Caldeira et al. (2024) – Revisão e estudo comparativo	INCQS e Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil	Avaliar o desempenho de métodos fenotípicos e genotípicos na identificação de microrganismos em ambientes farmacêuticos.

MALDI-TOF MS - Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo; rRNA - ácido ribonucleico ribossômico; SGC - sequenciamento do genoma completo; Bio-Manguinhos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos; INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz.

Em todos os artigos avaliados, é relatado que a identificação de espécies pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato (s.l.)* continua sendo complexa tanto para a microbiologia clínica quanto para a indústria farmacêutica. A alta similaridade genética e fenotípica entre as espécies estreitamente relacionadas torna os métodos tradicionais de identificação ainda insuficientes. Desta forma, as implicações de uma identificação imprecisa assumem contornos distintos nos dois cenários.

No contexto clínico, o erro pode resultar em um diagnóstico incorreto e em terapias inadequadas (LOTTE et al., 2022), enquanto na indústria farmacêutica, ele pode comprometer a rastreabilidade microbiológica, mascarar rotas de contaminação e afetar a segurança e eficácia dos produtos estéreis, como vacinas (MATTOSO et al., 2025).

No âmbito farmacêutico, essa dificuldade de identificação assume uma dimensão estratégica. Em instalações voltadas para a produção de imunobiológicos, produtos estéreis e termolábeis, em que a esterilização terminal é inviável, o controle microbiológico depende integralmente do monitoramento ambiental e da identificação dos microrganismos detectados. Nesse cenário, as espécies do gênero *Bacillus*, especialmente, membros do grupo *B. cereus sensu lato (s.l.)*, figuram entre os principais desafios, devido à sua capacidade de formar endósporos altamente resistentes, colonizar superfícies e sobreviver a desinfetantes. Assim, identificar não apenas o gênero, mas a espécie, torna-se essencial para avaliar o risco do microrganismo para o processo e para o produto e para traçar estratégias para a sua eliminação ou mitigação (COSTA et al., 2022b; EMA, 2022; CALDEIRA et al., 2024).

No trabalho realizado por Costa et al. (2022a), que avaliou comparativamente o desempenho dos sistemas automatizados VITEK®2 e VITEK® MS (MALDITOF MS, bioMérieux) e do sequenciamento completo do gene 16S rRNA, cerca de 55% dentre as 97 linhagens de *Bacillus* e gêneros relacionados isoladas de ambientes de produção não foram corretamente ou adequadamente identificadas pelo VITEK®2, e cerca de 25% pelo VITEK® MS. O estudo aponta duas razões centrais para esse resultado: primeiro, a limitação intrínseca dos bancos de dados comerciais, projetados principalmente para microrganismos de relevância clínica; segundo a reduzida variabilidade genética entre espécies ambientais de *Bacillus*, que compartilham perfis proteômicos quase idênticos. Esses resultados levaram os autores a recomendar o uso complementar de marcadores moleculares adicionais, como *rpoB* e *gyrB*. Estes genes constitutivos são utilizados na identificação bacteriana porque apresentam maior taxa de mutação que o gene 16S rRNA, o que lhes confere maior capacidade de resolução taxonômica, permitindo a diferenciação de algumas espécies estreitamente relacionadas. Esses genes estão envolvidos em funções essenciais e universais para a sobrevivência e para o

metabolismo básico das células bacterianas: o gene *rpoB* codifica a subunidade beta da RNA polimerase e o gene *gyrB* codifica a subunidade B da DNA girase. Ambos são expressos de forma constante em todas as condições ambientais e apresentam alto polimorfismo, logo o sequenciamento destes genes pode ser utilizado como ferramenta para se obter uma identificação mais precisa de linhagens de origem ambiental. No entanto, o sequenciamento de vários genes envolve etapas demoradas e trabalhosas (NUNES RAMOS et al., 2025) o que pode inviabilizar a sua utilização na indústria farmacêutica.

Ha et al. (2019) relataram que, mesmo com uso de técnicas como MALDI-TOF MS, a diferenciação de espécies filogeneticamente próximas ainda apresenta limitações, já que a base de dados comercial é limitada. Para superar essas limitações, o estudo aplicou a análise de biomarcadores de baixo peso molecular no intervalo de 500 a 3.000 m/z, identificando picos específicos (m/z 714,2 e 906,5) que aprimoraram significativamente a discriminação entre as duas espécies, *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*, independentemente das condições culturais utilizadas. Assim, o método aprimorado possibilita uma identificação mais rápida e precisa, mesmo em casos nos quais características fenotípicas tradicionais se mostram insuficientes.

A mesma dificuldade foi abordada no trabalho de Costa et al. (2022b), que propôs a expansão da BD do VITEK® MS com espectros de linhagens isoladas de ambientes de produção industrial farmacêutica. Vinte e quatro cepas que haviam permanecido “não identificadas” ou “incorretamente identificadas” em estudo anterior (COSTA et al., 2022a) foram submetidas à caracterização genotípica pelos genes 16S rRNA e *rpoB*, e seus espectros foram incorporados à BD do VITEK® MS. Após a ampliação da BD, todas as linhagens foram corretamente identificadas em nível de gênero ou espécie. Além disso, o estudo demonstrou que a padronização dos parâmetros como tempo de incubação, meio de cultura e método de extração proteica, incluindo a etapa de pré-extração com ácido fórmico 70%, proporcionou melhor rendimento na extração proteica, auxiliando na identificação de bactérias formadoras de esporos.

Contudo, há casos em que nenhuma das metodologias supracitadas será capaz de identificar o microrganismo, pois os ambientes de produção farmacêutica podem abrigar microrganismos ainda não descritos. Essa realidade foi exemplificada por Costa et al. (2024), no estudo que descreveu *Bacillus lumedeariae* sp. nov., uma nova espécie isolada durante o monitoramento ambiental de uma instalação de imunobiológicos. VITEK®2 e MALDI Biotyper® (MALDI-TOF MS, Bruker) não identificaram a linhagem e o sequenciamento do 16S rRNA forneceu sequência que apresentava apenas 98,4% de similaridade com a espécies

mais próxima, valor abaixo do ponto de corte da técnica para identificação em nível de espécie ($\geq 98,7\%$). Apenas por meio do sequenciamento do genoma completo (SGC) foi possível reconhecer que se tratava de uma nova espécie. Após a descrição formal e o depósito da cepa em coleções de cultura, o espectro foi incorporado à BD do MALDI Biotyper®, permitindo que a espécie seja identificada futuramente. Esse caso demonstra o papel decisivo do SGC como ferramenta taxonômica e como base para o aprimoramento contínuo dos sistemas automatizados.

Um panorama abrangente é fornecido pelo estudo de Song et al. (2024), que propôs um pipeline integrado para monitoramento microbiológico em áreas farmacêuticas classificadas. O modelo operacional combina MALDI-TOF MS para uma identificação rápida e de menor custo, sequenciamento do gene 16S rRNA para identificação das linhagens não identificadas pela metodologia anterior, inserção dessas espécies na BD do MALDI-TOF MS e SBC para rastreamento das fontes de contaminação em investigações de desvios de processo. Aplicado em larga escala, o sistema alcançou taxas de identificação de aproximadamente 95% em nível de gênero e 75% em nível de espécie, números superiores aos observados em rotinas industriais convencionais. O diferencial dessa abordagem é sua capacidade de rastrear rotas de contaminação utilizando dados genômicos para mapear a circulação de cepas entre áreas de produção e estabelecer uma estratégia de controle de contaminação baseada em evidências filogenômicas. Assim, o SGC não apenas aprimora a identificação taxonômica, mas também fornece subsídios para o gerenciamento de risco e para o cumprimento de exigências regulatórias relacionadas à rastreabilidade microbiológica.

No estudo de Ki et al. (2009), mesmo utilizando sequências do gene *rpoB* com mais de 1.100 pares de base (pb), a identificação em nível de espécie para o grupo *B. cereus* (que inclui *B. anthracis*, *B. thuringiensis* e *B. cereus*) não foi bem-sucedida. Os autores relataram similaridades genéticas extremamente altas (98,3% para DNA e 99,5% para aminoácidos) entre *B. anthracis* e *B. cereus*, o que inviabilizou uma distinção clara e confiável.

Outros genes utilizados para a caracterização de linhagens de *B. cereus* são os descritos no esquema de tipagem por *multilocus sequence typing* (MLST): *glpF*, *gmK*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA* e *tpi*. Em alguns contextos, genes associados à virulência, como *cesB* (cereulide), *hbl* e *nhe*, são utilizados como marcadores complementares, apesar do seu papel estar mais relacionado à caracterização do potencial patogênico do que à classificação taxonômica. A presença do gene *cesB* sugere fortemente que a cepa possa causar a síndrome emética, um risco crítico para a indústria farmacêutica em relação aos produtos administrados por via oral.

Portanto, diante das limitações dos métodos fenotípicos e genotípicos, fica evidente a necessidade de um método com maior poder de resolução taxonômica. Kovac et al. (2016) afirmam que o método capaz de fornecer uma identificação inequívoca em nível de espécie para membros do grupo *B. cereus* é o SGC. Esta abordagem taxonogenômica supera as ambiguidades dos métodos citados anteriormente ao fornecer a totalidade da informação genética, permitindo a construção de filogenias robustas e a detecção de marcadores únicos que delineiam os limites entre espécies. Dessa forma, o SGC se consolida não apenas como a ferramenta mais precisa, mas como o novo padrão-ouro para a distinção taxonômica definitiva neste grupo crítico de microrganismos. Os avanços nas tecnologias de SGC aumentaram a disponibilidade de dados genômicos e reduziram seus custos, permitindo a criação de esquemas taxonômicos baseados na análise *in silico* de genomas (NUNES RAMOS et al., 2025), o que tende a viabilizar, em poucos anos, a utilização do SGC nas rotinas analíticas de laboratórios de controle da qualidade microbiológico.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De forma geral, a identificação precisa das espécies pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato* (*s.l.*) ainda representa um desafio tanto para a microbiologia clínica quanto para a farmacêutica. A elevada similaridade genômica e fenotípica entre as espécies do grupo compromete a eficácia dos métodos tradicionais de identificação e ressalta a necessidade de abordagens complementares que unam ferramentas proteômicas e genômicas. Embora métodos como o MALDI-TOF MS representem avanços significativos em rapidez e praticidade, sua confiabilidade ainda depende da qualidade e abrangência das BD utilizadas. Nesse sentido, a incorporação de genes de manutenção e, principalmente, o uso do SGC despontam como estratégias indispensáveis para a resolução taxonômica definitiva e para o fortalecimento da rastreabilidade microbiológica em ambientes produtivos. Assim, compreender e aprimorar os métodos de identificação dentro desse grupo bacteriano é essencial não apenas para o diagnóstico clínico, mas também para garantir a segurança e a qualidade dos processos industriais farmacêuticos.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Farmacopeia Brasileira. 7. ed. Brasília: Anvisa, 2024.
- BENNETT, R. *Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin. In: **Bacteriological Analytical Manual**. Chap. 15; Food and Drug Administration. 2001.
- BLOISE, I., et al. Microbial Identification in the Clinical Microbiology Laboratory Using MALDI-TOF-MS. **Methods Mol Biol**, v. 2420, p. 207-216, 2022.
- BOTELHO, L. R.; CUNHA, C. C. A.; MACEDO, M. O. O método da revisão integrativa nos estudos organizacionais. **Revista Eletrônica Gestão e Sociedade**, v. 5, n. 11, p. 121-136, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 724, de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 126, p. 205, 6 jul. 2022.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa – IN nº 313, de 4 de setembro de 2024. Altera a Instrução Normativa – IN nº 161, de 1º de julho de 2022, que estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 172, p. 70, 5 set. 2024
- CALDEIRA, N. G. S.; et al. Characterization by MALDI-TOF MS and 16S rRNA Gene Sequencing of Aerobic Endospore-Forming Bacteria Isolated from Pharmaceutical Facility in Rio de Janeiro, Brazil. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 724, 2024.
- CHALITA, M.; et al. EzBioCloud: a genome-driven database and platform for microbiome identification and discovery. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 74, n. 6, p. 006421, 2024.
- COSTA, L. V.; et al. Assessment of VITEK®2, MALDI-TOF MS and full gene 16S rRNA sequencing for aerobic endospore-forming bacteria isolated from a pharmaceutical facility. **Journal of Microbiological Methods**, v. 194, p. 106419, 2022a.

COSTA, L. V.; et al. MALDI-TOF MS database expansion for identification of *Bacillus* and related genera isolated from a pharmaceutical facility. **Journal of Microbiological Methods**, v. 203, p. 106625, 2022b.

COSTA, L. V.; et al. *Bacillus lumedeiriae* sp. nov., a Gram-Positive, Spore-Forming Rod Isolated from a Pharmaceutical Facility Production Environment and Added to the MALDI Biotyper® Database. **Microorganisms**, v. 12, n. 12, p. 2507, 2024.

DEAL, A.; et al. Cleaning and Disinfection of *Bacillus cereus* Biofilm. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 70, n. 3, p. 208-217, 2016.

de MIRANDA, R. V. D. S. L.; et al. Identification of *Sutcliffiella horikoshii* strains in an immunobiological pharmaceutical industry facility. **Lett Appl Microbiol**, v. 76, n. 5, p. ovad056, 2023.

EHLING-SCHULZ, M.; et al. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. **Microbiol Spectr**, v. 7, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018, 2019.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4: European Union Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. **Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products**. Bruxelas, 2022.

FERNANDES, S.; et al. Antimicrobial susceptibility of persister biofilm cells of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 160, 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice**, U.S. Food and Drug Administration, Bethesda, MD, USA, 2004.

GUPTA, R. S.; et al. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it

only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 70, p. 5753-5798, 2020.

HA, M.; et al. Reliable identification of *Bacillus cereus* group species using low mass biomarkers by MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 887–896, 2019. DOI: 10.4014/jmb.1903.03033.

KI, J.; et al. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, n. 1, p. 48-57, 2009. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.01.003.

KOVAC, J.; et al. Production of hemolysin BL by *Bacillus cereus* group isolates of dairy origin is associated with whole-genome phylogenetic clade. **BMC Genomics**, v. 17, n. 581, p. 1–16, 2016. DOI: 10.1186/s12864-016-2883-z.

LIN, Y.; BRIANDET, R.; KOVÁCS, Á. T. *Bacillus cereus* sensu lato biofilm formation and its ecological importance. **Biofilm**, v. 4, p. 100070, 2022.

LOTTE, R.; et al. *Bacillus cereus* Invasive Infections in Preterm Neonates: an Up-to-Date Review of the Literature. **Clin Microbiol Rev**, v. 35, n. 2, p. e0008821, 2022.

MATTOSO, J. M. V.; et al. Quantitative and Qualitative Evaluation of Microorganism Profile Identified in Bioburden Analysis in a Biopharmaceutical Facility in Brazil: Criteria for Classification and Management of Results. **PDA J Pharm Sci Technol**, v. 79, n. 2, p. 125-156, 2025.

NUNES RAMOS, J.; et al. Challenges in the Identification of Environmental Bacterial Isolates from a Pharmaceutical Industry Facility by 16S rRNA Gene Sequences. **DNA**, v. 5, n. 3, p. 33, 2025.

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION (PDA). Bioburden and Biofilm Management in Pharmaceutical Manufacturing Operations. **Technical Report No. 69**, 2015.

SANDLE, T. The Risk of *Bacillus cereus* to Pharmaceutical Manufacturing. **American Pharmaceutical Review**, v. 17, n. 6, 2014.

SETLOW, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 514-525, 2006.

SOUZA, M. T. DE; SILVA, M. D. DA; CARVALHO, R. DE. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **einstein**, v. 8, n. 1 Pt 1, p. 102-106, 2010.

STECCHINI, M. L.; et al. *Bacillus cereus* cell and spore properties as influenced by the micro-structure of the medium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 1899-1910, 2009.

TALLENT, S.M.; et al. *Bacillus cereus*. In: **Bacteriological Analytical Manual**. Chap. 14; Food and Drug Administration. 2020.

SONG, H.; WANG, P.; LI, J. Pipeline integrado para monitoramento microbiológico em áreas farmacêuticas classificadas combinando MALDI-TOF MS, 16S rRNA e Whole Genome Sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, Art. 109876, 2024.

ZERVAS, A.; et al. Identification and characterization of 33 *Bacillus cereus* sensu lato isolates from agricultural fields from eleven widely distributed countries by whole genome sequencing. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 2028, 2020.