

**MÉTODOS INOVADORES PARA CONTROLE DE QUALIDADE E
AUTENTICAÇÃO DE CEPAS MICROBIANAS PRODUZIDAS PELA
COLEÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGENICAS (FIOCRUZ/CBP)**

**INNOVATIVE METHODS FOR QUALITY CONTROL AND
AUTHENTICATION OF MICROBIAL STRAINS PRODUCED BY THE
COLLECTION OF PATHOGENIC BACTERIA (FIOCRUZ/CBP)**

Rafael Oscar da Silva

Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde – INCQS,
Fiocruz, Rio de Janeiro- RJ - Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-5740-2607>
rdasilva@aluno.fiocruz.br

Pâmalla de Araújo Pereira

Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde – INCQS,
Fiocruz, Rio de Janeiro- RJ - Brasil
<https://orcid.org/0009-0006-6634-5425>
pamalla.pereira@fiocruz.br

Milena Tiengo da Silva

Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde – INCQS,
Fiocruz, Rio de Janeiro- RJ - Brasil
<https://orcid.org/0009-0001-3234-8621>
mtdasilva@aluno.fiocruz.br

Ivano de Filippis

Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde – INCQS,
Fiocruz, Rio de Janeiro - RJ - Brasil
<https://orcid.org/0000-0003-0610-8648>
ivano.defilippis@fiocruz.br

Débora Ribeiro de Souza Santos

Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde – INCQS
Fiocruz, Rio de Janeiro - RJ - Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-4335-017X>
debora.souza@fiocruz.br

ARTIGO CIENTÍFICO
Submetido em: 25/03/2026
Aprovado em: 26/06/2026

RESUMO

A Coleção de Bactérias Patogênicas (FIOCRUZ/CBP) atua como biorrepositório estratégico, fornecendo cepas bacterianas autenticadas para apoio à pesquisa científica e ao controle da qualidade. Este estudo teve como objetivo avaliar a conformidade de parte do acervo de pesquisa da CBP, através de ensaios microbiológicos, para a de garantia da qualidade do material fornecido. Foram analisados 153 liófilos bacterianos, depositados entre 1989 e 2024, sendo submetidos aos seguintes testes de controle da qualidade: identificação fenotípica, proteômica e molecular, por VITEK®2, MALDITOF/MS e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Todas as cepas apresentaram crescimento puro, viabilidade satisfatória e identificação compatível com o esperado. Os resultados reforçam a confiabilidade do acervo e evidenciam a importância da integração de múltiplas metodologias para a garantia da qualidade e preservação de coleções microbiológicas.

Palavras-chaves: Bactérias. Coleções biológicas. Controle de Qualidade.

ABSTRACT

The Pathogenic Bacteria Collection (FIOCRUZ/CBP) acts as a strategic biorepository, providing authenticated bacterial strains to support scientific research and quality control. This study aimed to assess the conformity of part of the CBP research collection, through microbiological tests, in order to ensure the quality of the material provided. We analyzed 153 bacterial liophiles, deposited between 1989 and 2024, and submitted to the following quality control tests: phenotypic, proteomic and molecular identification by VITEK®2, MALDITOF/MS and partial sequencing of the 16S rRNA gene. All strains showed pure growth, satisfactory viability and identification compatible with the expected. The results reinforce the reliability of the collection and highlight the importance of integrating multiple methodologies for quality assurance and preservation of microbiological collections.

Keywords: Bacteria. Biological collections. Quality Control.

1 Introdução

As coleções biológicas, também conhecidas como acervos biológicos, são centros de conservação *ex-situ* responsáveis por preservar organismos ou parte deles fora de seus habitats naturais. Essas coleções desempenham um papel fundamental ao realizarem atividades como aquisição, preservação, identificação, catalogação e distribuição de organismos, contribuindo para o avanço científico e o desenvolvimento da indústria biotecnológica (Fundação Oswaldo Cruz, 2026; Martins, 2018).

Além disso, elas são essenciais para o ensino, pesquisa, inovação e divulgação científica, além de atuarem como importantes repositórios da biodiversidade. Isto porque, as informações guardadas nestes acervos sobre a fauna, flora e microbiota de determinadas regiões permitem a identificação da origem e a classificação taxonômica de cada linhagem, sendo uns dos principais objetivos das coleções (Fundação Oswaldo Cruz, 2026; Martins, 2018).

A preservação do material biológico visa garantir sua viabilidade e manter suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas por períodos variados, com o menor grau de mutações e variabilidade possível (Aranda, 2014; Sola *et al*, 2012; Sousa *et al.*, 2017). Dentre os métodos de preservação utilizados, a liofilização ou “secagem por congelamento” e

a criopreservação garantem a longevidade e a estabilidade genética dos materiais biológicos, como microrganismos e tecidos, por longos períodos.

A liofilização envolve o congelamento rápido do material biológico e a remoção da água por sublimação do material congelado, sob condições de baixa temperatura, vácuo e alta pressão, permitindo preservar a estrutura celular e demais propriedades dos organismos por períodos que podem variar de 17 a 20 anos. A criopreservação, por sua vez, consiste no congelamento de amostras biológicas a temperaturas baixas (-20 a -80°C) ou ultrabaixas (-150 a -196°C), que pode ser realizado em containers de nitrogênio líquido ou em ultrafreezers, utilizando crioprotetores para minimizar danos celulares. Ambos os métodos considerados métodos de preservação de longo prazo (Sousa *et al.*, 2017).

Outra atividade de suma importância envolvendo os acervos biológicos consiste na identificação bacteriana. Essa etapa é responsável pela caracterização dos microrganismos utilizando métodos de coloração para a realização de microscopia, técnicas convencionais, automatizadas e moleculares para sua classificação taxonômica e determinação de suas características morfológicas, bioquímicas e genéticas (Franco-Duarte *et al.*, 2019). Para isso, diferentes metodologias podem ser empregadas, classificadas em métodos fenotípicos e genotípicos (Ferone *et al.*, 2020; Franco-Duarte *et al.*, 2019).

A microscopia é uma ferramenta fundamental para observar a estrutura morfológica das bactérias, com a coloração de Gram sendo a técnica principal para diferenciar entre Gram-positivas e Gram-negativas com base na estrutura da parede celular (Oplustil *et al.*, 2020; Tortora; Funke; Case, 2012).

Os métodos fenotípicos convencionais são baseados nas características metabólicas e enzimáticas das bactérias e incluem testes bioquímicos, que utilizam reagentes e meios de cultura seletivos e diferenciais que auxiliam na identificação, pois permitem o isolamento de microrganismos específicos (meios seletivos) e ajudam a diferenciar grupos ou espécies distintas (meios diferenciais) através de alterações no meio, como coloração, turvação e presença de gás (Perantoni; Queiroz-Fernandes, 2019).

Com os avanços tecnológicos, outros métodos fenotípicos foram desenvolvidos a fim de melhorar e agilizar a rotina nos laboratórios, tais como o sistema VITEK®2 e o MALDITOF MS (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*), que são baseados nos perfis bioquímico e proteômico, respectivamente, sendo considerados rápidos e eficientes, principalmente quando comparados aos métodos convencionais (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

O VITEK[®]2 é um equipamento capaz de identificar microrganismos por meio de um sistema óptico de transmitância responsável por realizar a leitura, interpretar e comparar com um banco de dados as reações bioquímicas miniaturizadas contidas em cartões específicos descartáveis de reagentes colorimétricos (Franco-Duarte *et al.*, 2019; Hata *et al.*, 2007; Pincus, 2013).

O MALDI-TOF MS, por sua vez, identifica microrganismos e analisa moléculas com base no padrão proteico único de cada espécie, ionizando e vaporizando moléculas de interesse através da interação de um laser com uma matriz orgânica, geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Elbehiry *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; Oviaño& Rodríguez-Sánchez, 2021).

Dentre os métodos genotípicos, o sequenciamento do gene 16S rRNA representa um importante alvo para a classificação taxonômica e filogenética das bactérias. Isto porque o este gene corresponde a uma macromolécula comum a todas as bactérias, encontrada na subunidade 30S dos ribossomos. O gene 16 rRNA possui dez regiões conservadas utilizadas para o desenho dos primers e nove regiões variáveis (V1 a V9), utilizadas na associação entre os parentescos filogenéticos entre as populações bacterianas, possibilitando a identificação à nível de gêneros e espécies (Alves, 2020; Fida *et al.*, 2021). Além disso, esta abordagem permite a identificação de microrganismos difíceis de cultivar, como anaeróbios, micobactérias ou microrganismos não cultiváveis por métodos convencionais de cultura em laboratório (Fida *et al.*, 2021).

No Brasil, uma das instituições conhecidas por possuir acervos biológicos é a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). No total são 36 coleções biológicas reconhecidas institucionalmente, abrangendo categorias microbiológicas, zoológicas, botânicas, histopatológicas e arqueopaleontológicas (Fundação Oswaldo Cruz, 2026; Silva; Chame; Moratelli, 2020; de Filippis, *et al.*, 1995). Dentre essas, a Coleção de Bactérias Patogênicas (Fiocruz/CBP) é uma das coleções microbiológicas da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz. A CBP compreende um acervo com mais de 2000 linhagens bacterianas, de diferentes gêneros e espécies, e atua como biorrepositório estratégico, fornecendo cepas bacterianas autenticadas em apoio à pesquisa científica e ao controle de qualidade (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2026). Este estudo teve como objetivo avaliar a conformidade de parte do acervo de pesquisa da CBP, através de ensaios microbiológicos, como uma forma de garantia da qualidade do material fornecido.

2 Metodologia

O estudo foi dividido em três etapas principais, sendo (i) ensaios microbiológicos de controle de qualidade pré-produção, (ii) produção de novos lotes e preservação por liofilização e (iii) ensaios de controle de qualidade pós-produção.

2.1 Amostras - Foram selecionados representantes das cepas mais solicitadas para o fornecimento externo e, dentre essas, aquelas com estoque crítico (abaixo de 10 ampolas). No total, foram analisados 153 liófilos bacterianos, de gêneros distintos, que foram depositados na CBP entre os anos de 1989 e 2024.

2.2 Controle pré-produção - O controle de qualidade pré-produção incluiu a reidratação do liófilo, análise da pureza, microscopia e autenticação.

2.2.1 Reidratação do liófilo- 153 liófilos bacterianos foram reidratados em *TrypticSoyBroth* (TSB).

2.2.2 Análise da Pureza - A avaliação da pureza das cepas foi realizada por meio de cultivo em *Tryptic Soy Agar* (TSA) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, através da técnica de esgotamento, para obtenção de colônias isoladas, após incubação a $36,5^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ por até 72 horas, em aerobiose.

2.2.3 Análise microscópica - Foi realizada, em microscópio óptico, após coloração das lâminas pelo método de Gram. A análise microscópica foi realizada para confirmação das características morfológicas dos microrganismos avaliados.

2.2.4 Autenticação - A autenticação foi realizada pelo sistema VITEK®2, utilizando cartões do tipo GN para bacilos Gram negativos, GP para os cocos Gram positivos e BCL para os bacilos Gram positivos, de acordo com as instruções do fabricante.

2.3 Produção - As cepas com resultados satisfatórios nos ensaios pré-produção foram submetidas à produção de novos lotes para reposição dos estoques, preservação por liofilização e teste de vácuo. A produção envolveu o cultivo em ágar nutriente ou TSA, por pelo menos 24 horas e em temperatura específica, de acordo com o microrganismo. Após o período de incubação foi preparada uma suspensão bacteriana em solução de *skim milk* a

10% e, aproximadamente, 0,5 mL dessa suspensão foi distribuída em ampolas, submetidas em seguida ao congelamento rápido.

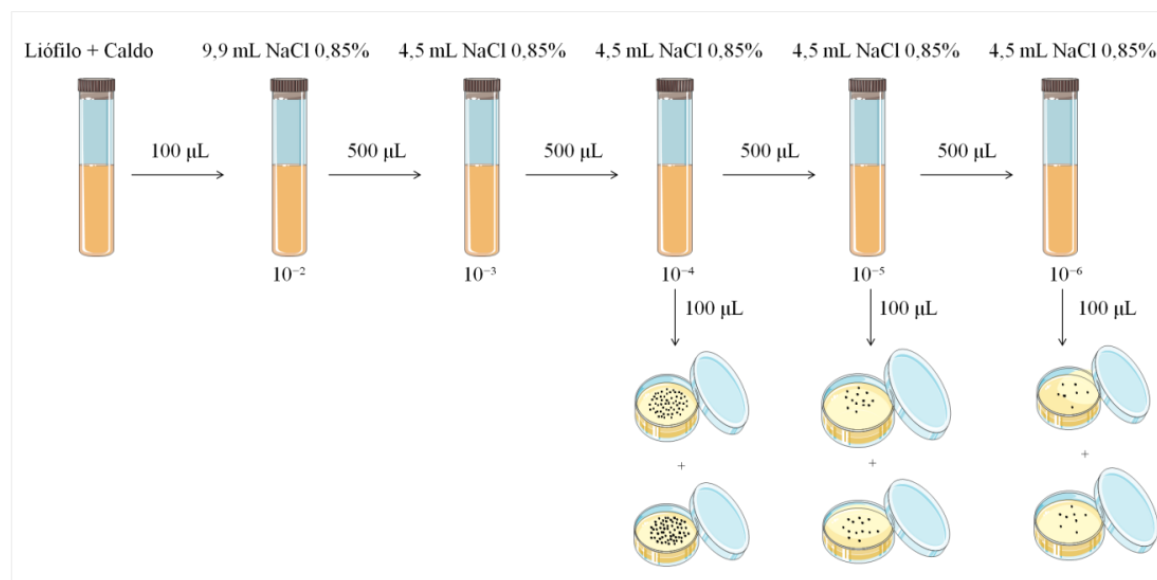
2.3.1 Liofilização - Após, pelo menos, 24 horas acondicionadas em temperatura de $-75^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, as ampolas produzidas foram submetidas ao processo de preservação em longo prazo e seladas a vácuo, no liofilizador Edwards I4r, conforme instruções do fabricante.

2.3.2 Teste de vácuo - Para confirmação da presença do vácuo nas ampolas liofilizadas, foi utilizada uma pistola elétrica individualmente, indicando a presença de vácuo pela visualização de luz violeta no interior da ampola durante a descarga elétrica. As ampolas que não apresentaram vácuo foram descartadas.

2.4 Controle pós-produção - Após a produção dos novos lotes liofilizados de cepas bacterianas, um representante de cada lote foi novamente reidratado e submetido a testes para verificação da viabilidade e novos testes para análise da pureza, microscopia e autenticação fenotípica pelo equipamento VITEK®2. Além disso, foram realizadas identificação proteômica (MALDITOF MS) e análise molecular (PCR e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA), quando necessário.

2.4.1 Verificação da viabilidade - Para determinação da viabilidade do lote produzido foram realizadas diluições seriadas, na base 10 até a diluição 10^{-6} , partindo do líofilo reidratado. O cultivo foi realizado em duplicata das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em meios de cultura do tipo TSA ou nutriente, pela técnica *Spread Plate*, conforme a figura 1. A temperatura e período de incubação variaram de acordo com o microrganismo. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de colônias das duplicatas das três diluições, utilizando, preferencialmente, a duplicata com contagem entre 30 a 300 unidades formadoras de colônias (UFC), para posterior realização do cálculo. Por fim, para determinação do número de UFC/mL, a média do número de colônias presentes na duplicata selecionada foi multiplicada pelo fator de diluição (10^{-4} , 10^{-5} ou 10^{-6}) e o valor obtido foi então dividido pela quantidade de líquido transferido da amostra para o meio de cultivo (100 μL).

Figura 1 – Esquema da Verificação da viabilidade



Fonte: do autor, 2026

2.4.2 Identificação proteômica por matrix-assisted laser desorption/ionization-time offlight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) - Nove cepas do gênero *Bacillus* foram analisadas por MALDI-TOF/MS, utilizando o equipamento MALDI-TOF *microflexLT* (Bruker®), utilizando o *software flexControl* versão 3.4 (BrukerDaltonics, EUA) e comparadas com bibliotecas específicas no MBT BDAL 12.0, *MBT Mycobacteria Library* 7.0 e *MBT Filamentous Fungi Library* 5.0 do *software MBT Compass* versão 4.1 (BrukerDaltonics), conforme as instruções do fabricante.

2.4.3 Extração de DNA - O DNA genômico das amostras foi extraído e purificado utilizando o kit *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook* (Qiagen, Califônia, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A integridade do DNA extraído foi avaliada após eletroforese em gel de agarose a 0,7% e visualização em digitalizador de imagens *ImageQuant* 300 (GE).

2.4.4 Análise molecular (PCR e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA) - Nove cepas do gênero *Bacillus* foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA - A amplificação inicial do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os primers 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGA-3' e 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3', desenhados com base nas regiões V1 e V2 (WANG et al., 2007). Os parâmetros utilizados na reação foram: um ciclo de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 35 segundos, anelamento a 60°C

durante um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguido de uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. A visualização dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Posteriormente, os produtos obtidos foram purificados com kit de purificação *PureLink™* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), de acordo com as especificações do fabricante e a avaliação quantitativa de DNA na amostra foi realizada utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher), o ciclo da reação do sequenciamento foi padronizado com os seguintes parâmetros: um ciclo de desnaturação inicial a 96°C por um minuto, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 segundos, anelamento a 50°C durante cinco segundos e extensão a 60°C por quatro minutos.

Após a reação, o produto foi precipitado com isopropanol 75% e etanol 75%, e desnaturado com *Hi-Ti™ Formamide* (Thermo Fisher), seguido de um ciclo no termociclador de 3 minutos a 95°C, sob o abrigo da luz e uma imersão no gelo por 5 minutos. Posteriormente, a placa foi submetida a uma rotação de 600 rpm (rotações por minuto) por 10 segundos e encaminhada para sequenciamento por eletroforese capilar no sequenciador SeqStudio (Thermo Fisher).

Os cromatogramas gerados pelo analisador genético foram analisados e alinhados com os programas *Chromas Lite* e *Sequencher*. As sequências encontradas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos contra os bancos de dados de nucleotídeos do GenBank (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI), utilizando a ferramenta online BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e *EzBiocloud* (<https://www.ezbiocloud.net/>).

3 Resultados

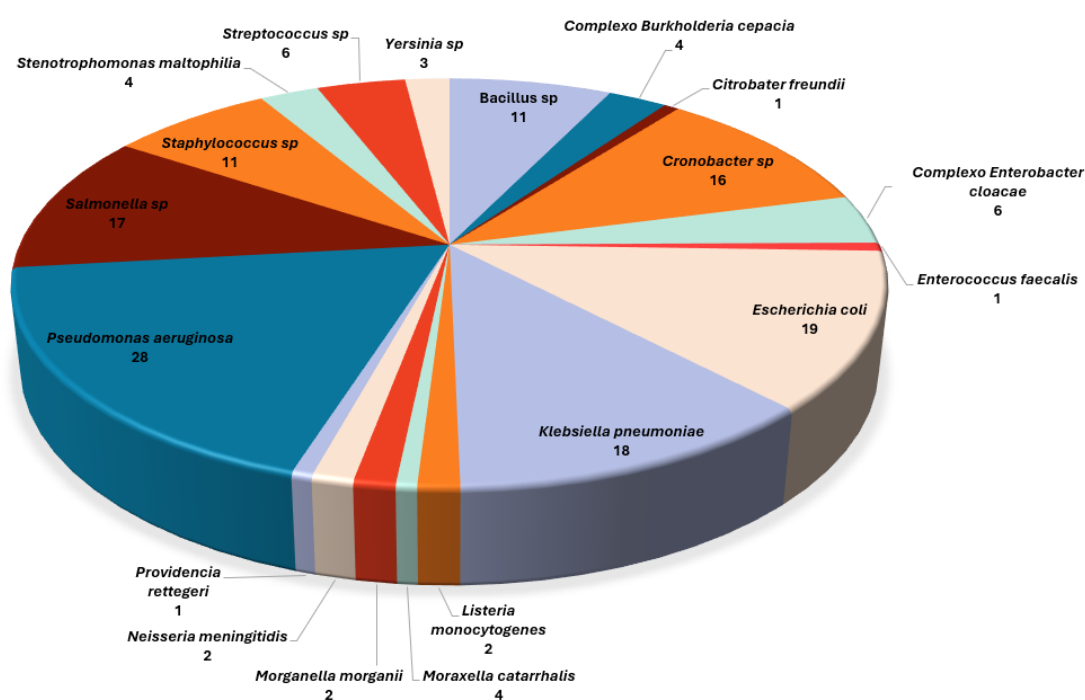
Todas as cepas apresentaram crescimento puro e compatível com a identificação prévia descrita na listagem da CBP. No ensaio de viabilidade todas as cepas avaliadas apresentaram resultado satisfatório, com crescimento acima de 10⁶ UFC/mL.

Todas as cepas foram submetidas a identificação pelo Vitek®2 com os seguintes resultados: membros da ordem *Enterobacterales* (n=83); *Pseudomonas aeruginosa* (n=28); gênero *Bacillus* (n=11); gênero *Staphylococcus* (n=10), sendo *S. aureus* (n=10) e *S. epidermidis* (n=1); gênero *Streptococcus* (n=6), sendo *S. pneumoniae* (n=3), *S. agalactiae* (n=1), *S. equi* (n=1) e *S. mitis/oralis* (n=1); Complexo *Burkholderia cepacia* (n=4); *Stenotrophomonas*

maltophilia (n=4); *Listeria monocytogenes* (n=2); *Neisseria meningitidis* (n=2); *Enterococcus faecalis* (n=1) e *Moraxella catarrhalis* (n=1).

Dentre os membros da ordem Enterobacterales (n=83) foram identificados *Escherichia coli* (n=19), *Klebsiella pneumoniae* (n=18), *Salmonella* sp (n=17), *Cronobacter sakazakii* (n=14), Complexo *Enterobacter cloacae* (n=6), *Morganella morganii* (n=2), *Citrobacter freundii* (n=1), *Cronobacter malonaticus* (n=1), *Cronobacter turicensis* (n=1), *Providencia rettgeri* (n=1), *Yersinia frederiksenii* (n=1), *Yersinia intermédia* (n=1) e *Yersinia kristensenii* (n=1), conforme demonstrado na figura 1.

Figura 1 – Autenticação das cepas pelo sistema automatizado Vitek®2



Fonte: do autor, 2026

Dentre as cepas que foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e ao MALDI-TOF/MS, os resultados obtidos foram satisfatórios, a nível de gênero, com algumas divergências de espécies entre as metodologias utilizadas (tabelas 1 e 2).

Tabela 1–Resultados MALDI-TOF/MS e do Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Cepas	MALDI TOF MS		Sequenciamento 16S rRNA	
	Identificação	Score / Consistência	BLAST	EzBiocloud
P0039 - <i>Bacillus</i> spp.	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. velezensis</i>	(+++)/C	<i>B. subtilis</i> 97,31%; <i>B. amyloliquefaciens</i> 97,05%	<i>B. subtilis</i> 98,62%
P2637 - <i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	(+++)/A	<i>B. megaterium</i> 99,37%; <i>P. megaterium</i> 99,36%	<i>P. megaterium</i> 99,32%
P2806 - <i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	(+++)/A	<i>B. thuringiensis</i> 92,57%; <i>B. cereus</i> 92,57%; <i>B. pseudomycoides</i> 92,57%	<i>B. mycoides</i> 99,63%
P2808 - <i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	(+++)/A	<i>B. subtilis</i> 99,7%; <i>B. velezensis</i> 99,7%	<i>B. subtilis</i> 98,64%
P2809 - <i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	(+++)/A	<i>B. subtilis</i> 97,54%	<i>B. subtilis</i> 99,30%
P2810 - <i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. velezensis</i>	(+)/B	<i>Bacillus</i> sp. 98,72%; <i>Paenibacillus</i> 98,40%; <i>B. subtilis</i> 98,08%	<i>B. subtilis</i> 98,63%
P2814 - <i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	(+++)/A	<i>B. licheniformis</i> 99,04%; <i>Bacillus</i> sp. 99,04%	<i>B. licheniformis</i> 99,32%
P3441 - <i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	(+++)/A	<i>B. cereus</i> 98,40%; <i>Bacillus</i> sp. 98,40%	<i>B. manliponensis</i> 97,65%
P4901 - <i>Bacillus</i> spp.	<i>B. cereus</i>	(+++)/A	<i>B. thuringiensis</i> 99,09%; <i>B. cereus</i> 98,79%	<i>B. thuringiensis</i> 100%

Legenda: (+++) identificação altamente confiável; (+) confiabilidade mais baixa; “A”: a primeira e a segunda melhor consistência indicam a mesma espécie; “B”: o gênero permanece o mesmo, mas a espécie difere entre os resultados; “C”: mudança no gênero entre as duplicatas da primeira ou segunda melhor consistência

Fonte: do autor, 2026

4 Discussão

A seleção de cepas após a análise do relatório com as mais fornecidas da CBP para clientes externos pode estar associada à sua importância clínica. Pelo menos 58% do fornecimento realizado pertenciam à membros da ordem Enterobacterales, sendo este grupo considerado um preocupante desafio em termos de saúde pública, principalmente devido a sua associação com casos de multirresistência e, consequentemente, ao comprometimento do tratamento de infecções (OMS, 2024).

O ensaio de pureza realizado pela CBP, além de ser uma etapa indispensável na manutenção da qualidade do acervo, garante a existência de apenas uma cepa na ampola. Manter a cepa originalmente depositada isolada, pura e viável, permite que as informações taxonômicas e genéticas associadas a ela sejam mantidas e preservadas ao longo do tempo, contribuindo com a conservação da biodiversidade. Além disso, os dados associados a cada linhagem colaboram com diferentes áreas, incluindo a pesquisa, o ensino, a inovação e serviços biotecnológicos.

Com relação à viabilidade das cepas produzidas, o presente estudo demonstrou a eficácia no principal método de preservação utilizado pela CBP, a liofilização. Levando em consideração que as cepas analisadas foram depositadas entre 1989 e 2016, a presença de todos os resultados satisfatórios corrobora com a literatura científica, conforme apontado por Sousa *et al.* (2017) e Sola *et al.* (2012). Estes autores consideram a liofilização um método de alta eficiência na manutenção da viabilidade a longo prazo, com uma estimativa de 17 a 20 anos,

sendo compatível com a maioria dos microrganismos, exceto algas e protozoários (Sola *et al.*, 2012). Sendo assim, os resultados encontrados no ensaio de viabilidade realizado em parte do acervo da CBP atestaram a eficiência da liofilização na manutenção das cepas ao longo das décadas, evidenciando a robustez desse método.

Outros autores, como Singh, Rai e Nair (2022), abordam fatores considerados por eles críticos e que podem interferir na viabilidade das cepas após a liofilização. Tais como a distribuição irregular de calor ou sua variação durante a liofilização, que pode provocar o surgimento de cristais de gelo, capaz de danificar a estrutura celular bacteriana. Ainda neste contexto, Sola *et al.* (2012) destacaram fatores associados a estocagem e acondicionamento do material liofilizado que podem influenciar a viabilidade ao longo prazo, sugerindo que o armazenamento seja realizado em ambiente sob refrigeração, com baixa umidade, ao abrigo da luz e com baixo risco de contaminantes. Sendo assim, vale ressaltar que a CBP não só compreende a importância dessas práticas na preservação do material biológico, como também adota tais medidas em sua rotina, o que pode estar diretamente associado à ausência de resultados insatisfatórios no presente ensaio.

Dentre as autenticações realizadas pelo sistema VITEK®2, 91% das cepas tiveram resultados satisfatórios, identificando corretamente a bactéria de acordo com o relatório de depósito no acervo de pesquisa da CBP. Além disso, 74% destas autenticações alcançaram o nível de espécie, sendo um bom desempenho, no geral. Estes resultados apontam a capacidade do sistema VITEK®2 em caracterizar diferentes cepas na rotina laboratorial, principalmente na prática clínica, assim como foi observado por Madhavan e colaboradores (2021). No estudo conduzido pelos pesquisadores supracitados, em que as cepas analisadas eram principalmente de origem clínica, 97% e 90,9% dos resultados alcançaram os níveis de gênero e espécie, respectivamente.

A limitação associada às cepas com perfis bioquímicos muito semelhantes foi identificada, especialmente nas cepas do gênero *Bacillus*. Para essas cepas, a identificação pelo VITEK®2 alcançou predominantemente o nível de gênero, o que não foi suficiente para uma diferenciação precisa entre as espécies. Como forma de tentar contornar essa limitação, as cepas do gênero *Bacillus* foram submetidas a análise proteômica, por MALDITOF MS e ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Os resultados obtidos com as cepas do gênero *Bacillus* se aproximam de outros estudos realizados com esse grupo de bactérias. Costa e colaboradores (2022) observaram que ao avaliar 34 estirpes de *Bacillus* pelo mesmo método semiautomatizado, encontraram 14 (41%) identificadas ao nível de gênero e 12 (35%) ao nível de espécie, com algumas cepas não

identificadas ou identificadas incorretamente. Essa dificuldade na diferenciação entre as espécies gênero *Bacillus* também foi relatada por Halket, Dinsdale e Logan (2009) e corroborada por Mursyidah e colaboradores (2021).

A utilização do gene 16S rRNA como alvo para diferenciação das espécies do gênero *Bacillus* também foi desafiadora, principalmente devido à alta similaridade desta região entre elas. Os resultados encontrados apontam a importância da utilização de uma classificação polifásica, seja por meio de outras metodologias ou utilizando outros alvos, como pela análise dos genes *rpoB* ou *gyrB*, como forma de tentar melhorar a discriminação entre as espécies, conforme discutido por Costa e colaboradores (2022). No estudo conduzido pelos autores supracitados, em que foi utilizado o mesmo alvo, mas com uma diversidade maior de cepas do gênero *Bacillus*, a maioria (56,7%) das cepas foi identificada apenas ao nível de gênero.

Quando utilizado o MALDITOF MS, os resultados referentes às cepas do gênero *Bacillus* da CBP, apresentaram uma maior precisão quando comparado com as metodologias anteriores utilizadas. Das nove cepas analisadas, sete (78%) foram identificadas ao nível de espécie e apenas duas (11%) ao nível de gênero, com possíveis espécies *B. amyloliquefaciens* ou *B. velezensis*. Este resultado corrobora com o estudo conduzido por Costa e colaboradores (2022), que também realizaram essa comparação entre as três técnicas de identificação utilizadas no presente estudo. O desempenho superior do MALDITOF MS observado, quando comparado a análise do gene 16S rRNA, pode ser atribuído à capacidade do MALDITOF MS de analisar o perfil proteico das cepas, que é mais específico para cada espécie em comparação com a análise do gene 16S rRNA, que pode apresentar alta similaridade entre espécies próximas. E quando comparado com os resultados do sistema VITEK®2, possivelmente o melhor desempenho do MALDITOF MS está relacionado à composição mais abrangente de seu banco de dados e a origem das cepas analisadas, tendo o VITEK®2 um número mais limitado de microrganismos ambientais, por ser um equipamento mais direcionado para a rotina clínica.

Em síntese, embora o sequenciamento do gene 16S rRNA seja considerado um método robusto e bem estabelecido para identificação bacteriana, o sequenciamento parcial do gene demonstrou não ser a melhor metodologia para identificação, o que possivelmente pode estar relacionada com a elevada similaridade entre algumas espécies, podendo chegar a aproximadamente 99%, dificultando a sua distinção precisa. A utilização do gene completo poderia ser uma alternativa por não selecionar apenas uma região específica do gene 16S rRNA (Dixit *et al.*, 2021).

5 Considerações Finais

O presente estudo contribuiu, significativamente, para a garantia da qualidade das cepas do acervo de pesquisa da CBP, por meio de ensaios microbiológicos, incluindo análises de pureza, viabilidade, e autenticação pelo sistema VITEK® 2, MALDITOF MS e sequenciamento genético.

Os resultados dos ensaios realizados foram satisfatórios, evidenciando a eficácia das metodologias e dos processos empregados pela CBP na manutenção e principalmente na preservação das cepas a longo prazo.

O sistema VITEK®2 apresentou um bom desempenho na autenticação de cepas clínicas. Entretanto, para microrganismos ambientais, evidenciou-se a necessidade de técnicas complementares para uma identificação mais precisa. Da mesma forma, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, apesar de ser considerado o padrão ouro, também enfrentou dificuldades na diferenciação de espécies geneticamente semelhantes, enfatizando a importância de considerar a utilização de outros alvos genéticos, quando necessário. O MALDITOF MS, por sua vez, apresentou um melhor desempenho na autenticação das cepas ambientais do gênero *Bacillus*, demonstrando-se superior em comparação com as outras técnicas para este grupo em específico de microrganismos.

Em síntese, este estudo contribuiu para fortalecer e aprimorar os processos da CBP e, além disso, ressalta a importância de uma abordagem integrada, combinando diversas técnicas para uma caracterização mais completa e precisa de linhagens bacterianas. As coleções microbiológicas desempenham importante papel na conservação da biodiversidade, sendo multifuncionais e essenciais para diversas aplicações. Manter a organização e a manutenção eficientes desses centros é crucial para garantir a preservação dos microrganismos ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, H. O. Caracterização integral do gene 16S rRNA de bactérias não esporulantes e sua ação contra *Anticarsia gemmatilis* HÜBNER 1818 (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE). 2020. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2020.
- 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 eletrônicos. São Paulo: 2014. Disponível em: <http://sambio.com.br/simbioma/simbioma%20iii/03.pdf>. Acesso em 03 de março de 2026.

COSTA, E. A. *et al.* Desafios à atuação dos trabalhadores de Vigilância Sanitária nos serviços de saúde. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 10, n. 1, p.14–24, 2022.

de Filippis, I. *et al.* Development of a collection of bacteria causing meningitis in Rio de Janeiro from 1990 to 1991. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 1, p.21-4, 1995.

DIXIT, K. *et al.* Benchmarking of 16S rRNA gene databases using known strain sequences. **Bioinformation**, v. 17, n. 3, 2021.

ELBEHIRY, A. *et al.* How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. **Vaccines**, v. 10, n. 11, p.1-16, 2022.

FERONE, M. *et al.* Microbial detection and identification methods: Bench top assay toomics approaches. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3106-3129, 2020.

FIDA, M. *et al.* Diagnostic Value of 16S Ribosomal RNA Gene Polymerase Chain Reaction/Sanger Sequencing in Clinical Practice. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 6, p. 961-968, 2021.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Coleções Biológicas. Disponível em: <https://fiocruz.br/colecoes-biologicas>. Acesso em: 03 março 2026.

FRANCO-DUARTE, R. *et al.* Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms — from past to present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 1–32, 2019.

HALKET, G.; DINSDALE, A. E.; LOGAN, N. A. Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endospore formers. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 120-126, 2009.

HATA, D. J. *et al.* Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1087-1092, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). Coleções Microbiológicas do INCQS. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=120&Itemid=100. Acesso em: 03 mar. 2026.

LI, D. *et al.* MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. **ACS Measurement Science Au**, v. 2, n. 5, p. 385-404, 2022.

MADHAVAN, A. *et al.* Evaluation of Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight Mass spectrometry (MALDI TOF MS) and VITEK 2 in routine microbial identification. **Ghana Medical Journal**, v. 55, n. 4, p. 308-310, 2021.

MARTINS, P. H. R. Ampliação, caracterização fenotípica e estruturação da Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos nativas do solo do Distrito Federal. 2018. 110 f. **Tese (Doutorado em Biologia Microbiana)** - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

MURSYIDAH, R. M. *et al.* Isolation and Identification *Bacillus* Bacteria in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using the VITEK-2 Compact. **Earth and Environmental Science**, v. 718, n. 1, 2021.

OMS. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022. Geneva: **World Health Organization**; 2022.

OPLUSTIL, C. P. *et al.* **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 4. ed. [São Paulo]: Savier, 2020.

OVIÑO, M.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. Maldi-Tof mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 39, n. 4, p. 192-200, 2021.

PERANTONI, L. M.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M. Evolução das Técnicas Diagnósticas em Microbiologia Clínica. **Salusvita**, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.

PINCUS, D. H. Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. **Encyclopedia of rapid microbiological Methods**, v. 1, p. 1-32, 2013.

SILVA, M.; CHAME, M.; MORATELLI, R. Fiocruz biological collections: Strengthening Brazil's biodiversity knowledge and scientific applications opportunities. **Biodiversity Data Journal**, v. 8, 2020.

SINGH, K. A.; RAI, R.; NAIR, S. S. Review on development of assigned value microbiological reference materials used in food testing. **Food Microbiology**, v. 102, 2022.

SOLA, M. C. *et al.* Manutenção de Microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.

SOUSA, B. R. *et al.* Técnicas de Obtenção, Manutenção e Reativação de Culturas Microbianas. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 2, n. 3, p. 827-842, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Observando micro-organismos através do microscópio. In: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2012. p. 54-75.