

ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENÉTICA DO GENE *hisA* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DO COMPLEXO *Burkholderia cepacia* ISOLADAS DE UMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

MOLECULAR AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE *hisA* GENE FOR THE IDENTIFICATION OF *Burkholderia cepacia* COMPLEX STRAINS ISOLATED FROM A PHARMACEUTICAL INDUSTRY

Alícia Ribeiro Aguiar*

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, RJ
<https://orcid.org/0009-0006-2702-3204>
alicia.aguiar@bio.fiocruz.br

Francisca Letícia de Sousa Sales

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz,
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, RJ
<https://orcid.org/0009-0007-7131-8541>
francisca.sales1910@gmail.com

Luciana Veloso da Costa

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz,
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, RJ
<https://orcid.org/0000-0003-1873-4056>
luciana.costa@bio.fiocruz.br

Giorgio Silva-Santana

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, RJ
<https://orcid.org/0000-0002-3000-6513>
giorgio.santana@bio.fiocruz.br

Marcelo Luiz Lima Brandão

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, RJ
<https://orcid.org/0000-0003-1121-7312>
marcelo.brandao@bio.fiocruz.br

***Autor por correspondência**

ARTIGO CIENTÍFICO
Submetido em: 15/06/2026
Aprovado em: 15/07/2026

RESUMO

As bactérias pertencentes ao Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) representam um importante desafio para a indústria farmacêutica, devido à sua capacidade de sobreviver em diferentes ambientes, principalmente em meios aquosos. Métodos aplicados em laboratórios de controle microbiológico na indústria farmacêutica, como caracterização bioquímica, MALDI-TOF MS e o sequenciamento do gene 16S rRNA, não são capazes de diferenciar as espécies do CBc, em função da proximidade fenotípica e genética entre elas. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar um protocolo de amplificação e sequenciamento do gene *hisA* para identificar linhagens previamente classificadas como pertencentes ao CBc. Foram analisadas 38 linhagens provenientes de uma indústria produtora de imunobiológicos localizada no estado do Rio de Janeiro. Após sequenciamento pelo método de Sanger, as sequências obtidas foram analisadas através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e, em seguida, foi construída uma árvore filogenética de máxima verossimilhança. A análise das sequências resultou na identificação de 29 (76,3 %) linhagens como *Burkholderia contaminans* e oito (21,1 %) com confiança em nível de gênero, mas intimamente relacionada a espécie *B. contaminans*. Uma (2,6 %) linhagem não pôde ser identificada com a técnica avaliada, o que foi corroborado pela análise filogenética. Conclui-se que o sequenciamento do gene *hisA* foi eficaz para identificação da maioria das linhagens em nível de espécie, demonstrando seu potencial como ferramenta complementar para a caracterização de isolados desse complexo em laboratórios de controle microbiológico.

Palavras-Chave: Gene *hisA*. Complexo *Burkholderia cepacia*. Controle microbiológico. Indústria farmacêutica. Caracterização molecular.

ABSTRACT

Bacteria belonging to the *Burkholderia cepacia* Complex (CBc) pose a significant challenge to the pharmaceutical industry due to their ability to survive in various environments, particularly in aqueous media. Methods used in microbiological control laboratories in the pharmaceutical industry, such as biochemical characterization, MALDI-TOF MS, and 16S rRNA gene sequencing, are unable to differentiate between CBc species due to their phenotypic and genetic similarity. In this context, the objective of the present study was to evaluate a protocol for amplifying and sequencing the *hisA* gene to identify strains previously classified as belonging to the CBc. Thirty-eight strains from a manufacturer of immunobiologicals located in the state of Rio de Janeiro were analyzed. After sequencing using the Sanger method, the obtained sequences were analyzed using the *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) from the *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), and a maximum likelihood phylogenetic tree was then constructed. Analysis of the sequences resulted in the identification of 29 (76.3%) strains as *Burkholderia contaminans* and eight (21.1%) with confidence at the genus level but closely related to the species *B. contaminans*. One (2.6%) strain could not be identified using the technique evaluated, a finding corroborated by the phylogenetic analysis. It can be concluded that *hisA* gene sequencing was effective at the species level, demonstrating its potential as a complementary tool for characterizing isolates from this complex in microbiological control laboratories.

Keywords: Gene *hisA*. *Burkholderia cepacia* complex. Microbiological control. Pharmaceutical industry. Phylogenetic analysis.

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica é regida por rigorosas diretrizes regulatórias destinadas a assegurar a segurança, a qualidade e a eficácia dos medicamentos produzidos (Da Costa et al., 2023). Entre essas normas, destacam-se as Boas Práticas de Fabricação (BPF). No Brasil, as BPF para a produção de medicamentos são estabelecidas na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 658 de 2022, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), definindo os requisitos mínimos a serem seguidos pelas indústrias farmacêuticas (Brasil, 2022).

O controle de qualidade é uma etapa fundamental das BPF, sendo necessário em todas as etapas produtivas. Entre suas atribuições, está a avaliação e liberação de matérias-primas, utilidades, águas farmacêuticas, produtos intermediários e final (Brasil, 2022; WHO, 2024). O rigor é ainda maior quando se trata de medicamentos parenterais, administrados por via injetável, tornando o controle da cadeia produtiva mais crítico na indústria farmacêutica. Em razão de sua natureza estéril, esses medicamentos apresentam maior suscetibilidade à contaminação microbiológica, exigindo a adoção de medidas rigorosas para garantir sua qualidade e segurança (Brasil, 2022).

A água em seus diferentes níveis e graus de pureza é uma das principais matérias-primas na indústria farmacêutica, sendo utilizada como ponto de partida, solução de meio de produção, limpeza de equipamentos e como parte da formulação do produto final (Anvisa, 2013; WHO, 2022). A água também é reconhecida por ser um ambiente extremamente favorável ao crescimento microbiano, favorecendo a contaminação de produtos que a contenham ou tenham contato com as cadeias de água presentes na indústria (Selim *et al.*, 2020). A presença da água em formulações e em diversos sistemas da cadeia produtiva favorece o risco de crescimento microbiológico associado (USP, 2024). Visando garantir a qualidade e segurança de lotes produzidos, se faz necessária uma correta identificação dos contaminantes, de modo a auxiliar nas ações preventivas e corretivas, decorrentes de investigações de desvios de processos (Selim *et al.*, 2020; Vasconcellos *et al.*, 2023; Vasconcellos *et al.*, 2026).

O gênero *Burkholderia* é um dos principais grupos bacterianos associados a contaminações de produtos farmacêuticos e soluções aquosas, sendo as espécies que o compõem agentes de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (Dufour et al., 2023; Silva-Santana *et al.*, 2025, Tavares et al., 2020). Por serem bactérias Gram-negativas, possuem lipopolissacarídeos (endotoxinas) que podem representar risco aos processos farmacêuticos (Schneier *et al.*, 2020; Silva-Santana *et al.*, 2025).

Espécies do gênero *Burkholderia*, possuem alta plasticidade genética, estão presentes em diversos ambientes, como solos e ambientes aquáticos (Bevivino *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2010) e já foram isoladas de amostras de indústrias farmacêuticas (Selim *et al.*, 2020; Mattoso *et al.*, 2025; Oliveira *et al.*, 2025; Li *et al.*, 2026). Dentre as espécies do gênero, recebem destaque as 24 espécies que compõem o Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), caracterizado por espécies filogeneticamente relacionadas. Esta elevada proximidade genética representa uma problemática para a diferenciação das espécies do grupo (Baldwin *et al.*, 2007; Silva-Santana *et al.*, 2026).

Tratando-se de indústrias farmacêuticas, métodos rápidos, acurados, menos custosos e menos laboriosos geralmente são priorizados para a identificação microbiana (Ramos *et al.*, 2025). Neste cenário, a técnica Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) associada a expansão da sua base de dados após caracterização molecular (ex.: sequenciamento do gene 16S rRNA ou sequenciamento do genoma completo - SGC) tem se destacado como uma estratégia eficaz para os laboratórios de controle microbiológico das indústrias farmacêuticas (Costa *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2026; Song *et al.*, 2024). Devido à elevada conservação do gene 16S rRNA entre as espécies do complexo, seu sequenciamento não permite a discriminação confiável em nível de espécie (Baldwin *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2024) e o SGC ainda não é acessível para a maioria dos laboratórios (Silva-Santana *et al.*, 2026). Com isto, outras metodologias tornam-se necessárias para uma identificação mais rápida e acurada, como a utilização de marcadores moleculares específicos capazes de diferenciar as espécies do complexo. Neste sentido, muitos genes constitutivos têm sido utilizados devido ao seu maior poder discriminatório. Dentre eles, encontra-se o gene *hisA*, que codifica a enzima 1-(5-fosforribosil)-5-[(5-fosforribosilamino)metilideneamino]imidazol-4-carboxamida isomerase (frequentemente abreviada como ProFAR isomerase, ou simplesmente HisA), cujas regiões polimórficas conservadas são utilizadas como alvo alternativo ou complementar ao sequenciamento do 16S rRNA e ao *multilocus sequence typing* (MLST) (Spilker *et al.*, 2009; Papaleo *et al.*, 2010; Silva-Santana *et al.*, 2026).

Diante da necessidade de métodos capazes de identificar com precisão as espécies do CBc, especialmente em laboratórios de controle microbiológico da indústria farmacêutica, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho do sequenciamento e da análise do gene *hisA* para a identificação de linhagens do CBc isoladas de uma indústria farmacêutica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Trinta e oito linhagens previamente identificadas como pertencentes ao CBc com uso do sistema VITEK®2 foram isoladas de 2008 a 2023 de uma indústria de farmacêutica produtora de imunobiológicos do Estado do Rio de Janeiro de diferentes tipos de amostras, como: água purificada (n= 29; 76,31%), água potável (n=5; 13,15%), validação de processo ou limpeza (n=2; 5,26%), soluções de processo (n=1; 2,63%) e água para injetáveis (n=1; 2,63%). As 38 linhagens se encontram criopreservadas em skim milk (Difco Laboratories, Sparks, Maryland, EUA) suplementado com glicerol (Merck, Hilden, Alemanha) a 30% e armazenadas em ultrafreezer a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Elas também foram depositadas na Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

2.2 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE *hisA*

O DNA genômico bacteriano foi extraído utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Genomic DNA Isolation (Qiagen, Hilden, Alemanha) e a quantificação do DNA foi realizada utilizando o Fluorímetro Qubit™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) com o kit Qubit™ dsDNA BR Assay conforme instruções do fabricante.

A amplificação das linhagens foi realizada por PCR, em volume final de 25 μL , contendo 12,5 μL de Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA); 1 μL de cada iniciador A-442_foward (AGGACCCGGCGGCGAT) e A-442_reverse (TGCAGCATCCCGTCGCG) (10 pmol/ μL) (Papaleo *et al.*, 2010); 8,5 μL de água livre de RNase e DNase e 2 μL de DNA molde (5-20 ng/mL). A reação de PCR seguiu o programa descrito (Papaleo *et al.*, 2010): 95°C por 2 min; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 45 s a 67°C, 1 min a 72°C; e 10 min a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), preparado em água destilada estéril, contendo GelRed® para visualização dos fragmentos de DNA. As amostras foram aplicadas juntamente com um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb), sendo a corrida realizada a 100 V por aproximadamente 40 min. Ao término da eletroforese, os fragmentos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e registrados por sistema de fotodocumentação, sendo esperados fragmentos na faixa de 442 pb. Os produtos de PCR foram posteriormente purificados utilizando o Kit Wizard SV Gel and

PCR Clean-up (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Os produtos purificados foram sequenciados utilizando a metodologia de Sanger, com uso do kit BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing Cycle (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Foi preparada uma reação de 10 µL, contendo 1,5 µL de Terminator 5X Sequencing Buffer; 2 µL de primer forward ou reverse (1,6 pmol/ µL); 1,0 µL de BigDye e 5,5 µL de produto de PCR purificado. A reação de sequenciamento seguiu o programa: 96°C por 1 min; 25 ciclos de 10 s a 96 °C, 5 s a 50°C e 4 min a 60°C.

O material sequenciado foi então purificado com uso do Kit EdgeBio Performa® DTR (Edge BioSystems, Gaithersburg, Maryland, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A separação dos fragmentos foi realizada pela Plataforma RPT01A, pertencente à Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil), e os cromatogramas obtidos foram analisados utilizando o software DNASTAR LaserGene SeqMan v. 7.0.0.0. As sequências foram depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Os resultados provenientes do sequenciamento foram analisados com uso da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) do NCBI, onde as sequências foram comparadas com cepas tipo depositadas no banco (Sayers *et al.*, 2025). Para realizar esta análise e interpretação dos dados foram utilizados dois critérios baseados no *Clinical and Laboratories Standards Institute* (CLSI, 2008) e na USP (2025) conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1. Critérios para avaliação da análise de sequenciamento do gene *hisA* com uso da ferramenta BLAST na base de dados do NCBI, de acordo com as diretrizes do CLSI (2008) e da USP (2025)

Referência	Interpretação de acordo com % de similaridade
CLSI (2008)	≥99,0% de identidade para identificação de espécies (com uma diferença superior a 0,8% entre espécies diferentes); indicar “[Gênero e espécie]”. ≥97,0% de identidade para identificação de gênero; considere relatar “[Gênero], mais intimamente relacionado a [espécie]”. <97,0% de identidade não pode ser identificado definitivamente por sequenciamento do gene <i>hisA</i>; considere relatar “Impossível identificar por sequenciamento do gene <i>hisA</i>, mais intimamente relacionado a [Gênero]”.
USP (2025)	>99,0% de identidade com a linhagem de melhor correspondência pode ser considerado para identificação da espécie. >97,0% de identidade para identificação de gênero; considere relatar “[Gênero].

Fonte: CLSI (2008) e USP (2025).

2.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os dados provenientes do sequenciamento foram utilizados para a construção de uma árvore de máxima verossimilhança. Além das 38 linhagens estudadas, foram selecionadas 24 cepas tipo representantes das 24 espécies que compõe o CBc, depositadas no NCBI, além da cepa *Burkholderia gladioli* American Type Culture Collection (ATCC) 10248 que foi utilizada como grupo externo. Para o alinhamento das sequências utilizou-se o software PhyloSuite v. 1.2.2 (Zhang *et al.*, 2020), com o plugin MAFFT v.7 e parâmetros padrão (Katoh; Standley, 2013). As análises filogenéticas foram realizadas no software MEGA 12 (Kumar *et al.*, 2024), e o melhor modelo evolutivo foi selecionado utilizando o jModelTest (Posada, 2008). O FigTree v. 1.4.4 (Rambaut, 2018) foi utilizado para a pré-edição das árvores filogenéticas, e as imagens finais foram obtidas com o Inkscape v. 1.0.1 (Inkscape Project, 2020).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 38 linhagens apresentaram amplificação do fragmento esperado do gene *hisA* (~442 pares de base), conforme descrito no protocolo descrito por Papaleo, Schirmer e Shapiro (2010). O gene *hisA* é caracterizado como um gene constitutivo, sendo esperado estar presente em todas as linhagens do CBc. O gene sofre moderada variabilidade genética ao longo do tempo e, por consequência, se apresenta como um bom marcador taxonômico para cepas do CBc (Spilker *et al.*, 2009). Desta forma, a amplificação do gene alvo *hisA* em todas as amostras estudadas atesta estado de conservação nas regiões onde ocorrem as ancoragens dos iniciadores (*primers*) específicos, demonstrando robustez e boa especificidade do protocolo utilizado. Outros autores já utilizaram este protocolo para diferenciação de espécies do CBs, principalmente de amostras de origem clínica, e relataram amplificação de todas as linhagens avaliadas (Coutinho *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2020).

A Tabela 1 apresenta os percentuais de similaridade das cepas de referência mais próximas (primeira e segunda maior correspondência) em relação às linhagens estudadas, e seus respectivos números de acesso no NCBI. O tamanho do fragmento sequenciando variou de 335 (linhagem B0115.21) a 452 pb (linhagem B0986.19) (Tabela 1). Todas as linhagens apresentaram maior correspondência com a espécie *B. contaminans* LMG 23361 e segunda melhor correspondência com a espécie proposta por Kousar *et al.* (2026) “*B. mycopellens*” LMG 21824, cujo nome ainda não está válido, conforme a base de dados List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) (Göker *et al.*, 2025). Após análise seguindo os critérios do CLSI (2008) e da USP (2025), 29 (76,3 %) linhagens foram identificadas em nível

de espécie como *B. contaminans*, oito (21,1 %) em nível de gênero como *Burkholderia* sp., e uma (2,6 %) não foi identificada. Ambas as abordagens apresentaram 100% de concordância.

Tabela 1 - Identificação das 38 linhagens do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) no NCBI de acordo com os critérios do CLSI (2008) e da USP (2025)

Linhagem	n.º acesso do NCBI (pb)	1ª Correspondência		2ª Correspondência		Resultado	
		Espécie (%)	n.º acesso do NCBI	Espécie (%)	n.º acesso do NCBI	CLSI (2008)	USP (2025)
B6677.14	PZ069506 (419)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (100)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B6704.14	PZ069474 (445)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (100)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0305.17	PZ069475 (447)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (97,96)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
B0478.17	PZ069476 (445)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (99,77)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,06)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0519.17	PZ069477 (443)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (99,77)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,06)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0550.17	PZ069507 (445)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (99,10)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,06)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0603.17	PZ069509 (449)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (97,30)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (95,28)	OZ183792.1	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
B0856.18	PZ069510 (444)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (98,65)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (95,95)	OZ183792.1	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
B0868.18	PZ069478 (448)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (99,77)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,07)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B1134.18	PZ069473 (396)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (99,74)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,16)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0084.19	PZ069479 (393)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (99,74)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,15)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0088.19	PZ069508 (447)	<i>Burkholderia contaminans</i> LMG 23361 (99,77)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,06)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>

B0986.19	PZ069480	<i>Burkholderia contaminans</i> (452) LMG 23361 (99,55)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (96,84)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B1053.19	PZ069481	<i>Burkholderia contaminans</i> (408) LMG 23361 (99,51)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,04)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B1138.19	PZ069482	<i>Burkholderia contaminans</i> (444) LMG 23361 (99,32 %)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0254.20	PZ069483	<i>Burkholderia contaminans</i> (445) LMG 23361 (99,55)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (96,83)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0100.21	PZ069484	<i>Burkholderia contaminans</i> (429) LMG 23361 (99,06)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,18)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0115.21	PZ069485	<i>Burkholderia contaminans</i> (335) LMG 23361 (94,29)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (93,99)	OZ183792.1	Não identificado	Não identificado
B1540.21	PZ069486	<i>Burkholderia contaminans</i> (399) LMG 23361 (99,75)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,22)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B1603.21	PZ069505	<i>Burkholderia contaminans</i> (366) LMG 23361 (98,90)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (96,98)	OZ183792.1	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
B1869.21	PZ069487	<i>Burkholderia contaminans</i> (341) LMG 23361 (97,07)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (96,48)	OZ183792.1	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
B2817.21	PZ069488	<i>Burkholderia contaminans</i> (444) LMG 23361 (97,94)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (96,61)	OZ183792.1	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
B0694.23	PZ069489	<i>Burkholderia contaminans</i> (418) LMG 23361 (99,28)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,12)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0709.23	PZ069490	<i>Burkholderia contaminans</i> (395) LMG 23361 (99,23)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,44)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0710.23	PZ069491	<i>Burkholderia contaminans</i> (444) LMG 23361 (99,32)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0711.23	PZ069492	<i>Burkholderia contaminans</i> (395) LMG 23361 (98,98)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,21)	OZ183792.1	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.

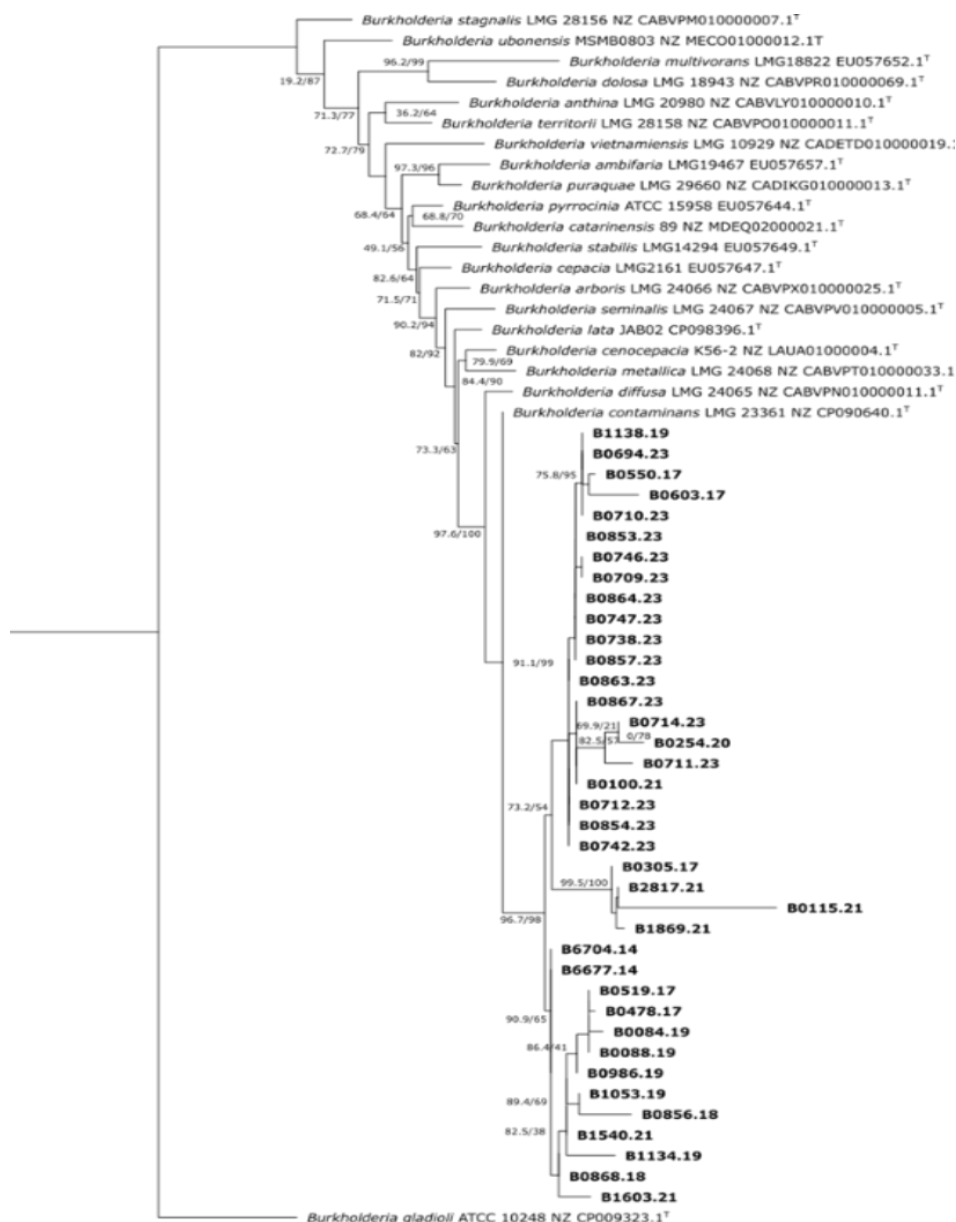
B0712.23	PZ069493	<i>Burkholderia contaminans</i> (445) LMG 23361 (99,32)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0714.23	PZ069494	<i>Burkholderia contaminans</i> (447) LMG 23361 (99,10)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,07)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0738.23	PZ069495	<i>Burkholderia contaminans</i> (446) LMG 23361 (99,32)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0742.23	PZ069496	<i>Burkholderia contaminans</i> (448) LMG 23361 (98,87)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (96,84)	OZ183792.1	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
B0746.23	PZ069497	<i>Burkholderia contaminans</i> (445) LMG 23361 (99,10)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0747.23	PZ069498	<i>Burkholderia contaminans</i> (446) LMG 23361 (99,10)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,07)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0853.23	PZ069499	<i>Burkholderia contaminans</i> (433) LMG 23361 (99,07)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,22)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0854.23	PZ069500	<i>Burkholderia contaminans</i> (445) LMG 23361 (99,32)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0857.23	PZ069501	<i>Burkholderia contaminans</i> (446) LMG 23361 (99,32)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0863.23	PZ069502	<i>Burkholderia contaminans</i> (437) LMG 23361 (99,31)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,47)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0864.23	PZ069503	<i>Burkholderia contaminans</i> (443) LMG 23361 (99,32)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>
B0867.23	PZ069504	<i>Burkholderia contaminans</i> (446) LMG 23361 (99,32)	CP090640.1	<i>Burkholderia "mycopellens"</i> LMG 21824 (97,29)	OZ183792.1	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute; USP - United States Pharmacopeia; pb – pares de base; *Burkholderia mycopellens* - espécie ainda não validada, mas descrita por Kousar *et al.*, 2026.

Fonte: Os autores (2026).

A árvore filogenética das 38 linhagens estudadas corroborou os resultados da análise das sequências do gene *hisA* no NCBI, em que a espécie *B. contaminans* foi a que apresentou maior percentual de similaridade para todas as linhagens (Tabela 1). As 38 linhagens foram agrupadas no mesmo clado, juntamente com a cepa tipo de *B. contaminans* LMG 23361. A topologia da árvore apresentou alto suporte numérico nos nós principais (97.6/100 e 96.7/98 na ramificação inferior) (Figura 1). A única linhagem considerada não identificada (B0115.21) foi posicionada em um ramo mais distante das demais na árvore filogenética, corroborando o baixo percentual de similaridade observado em relação a *B. contaminans* (94,29%).

Figura 1. Árvore de máxima verossimilhança baseada em sequências do gene *hisA* (455 pares de base), ilustrando a posição filogenética das 38 linhagens de *Burkholderia* em relação às espécies do Cbc mais próximas. Os valores nos nós representam o suporte *bootstrap*. *Burkholderia gladioli* ATCC 10248 foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica substituições de nucleotídeos por local.



Fonte: Os autores (2026).

A identificação das linhagens como *B. contaminans*, uma das espécies pertencentes ao CBc, está em concordância com relatos prévios da literatura que demonstram a presença desse microrganismo em ambientes farmacêuticos. Li *et al.* (2026) identificaram *B. contaminans* em amostras provenientes do monitoramento de ar, superfícies, materiais e manipuladores de uma indústria farmacêutica produtora de medicamentos estéreis na China. A persistência dessas bactérias nesses ambientes está relacionada à capacidade adaptativa das espécies do CBc, especialmente à formação de biofilmes, mecanismo que favorece sua sobrevivência e permanência em sistemas industriais (Selim *et al.*, 2020; Silva-Santana *et al.*, 2025). Além disso, Oliveira *et al.* (2025) relataram a detecção de microrganismos pertencentes ao CBc em 453 amostras (11,0%) de águas farmacêuticas, reforçando a relevância desse complexo bacteriano como contaminante de sistemas hídricos utilizados na indústria. Da mesma forma, Mattoso *et al.* (2025) descreveram o isolamento de espécies de *Burkholderia* em amostras de produtos intermediários submetidas ao ensaio de biocarga, classificando esses microrganismos como contaminantes questionáveis devido ao seu potencial impacto sobre a qualidade microbiológica dos produtos.

A correta diferenciação das espécies do CBc se torna relevante para estudos microbiológicos, uma vez que o complexo apresenta ampla distribuição ambiental e elevada diversidade genética. Segundo Li e colaboradores (2025) a coexistência de diferentes espécies geneticamente relacionadas reforça a necessidade de métodos moleculares acurados para sua correta discriminação. No caso das nove linhagens que não foram identificadas em nível de espécie, o uso de técnicas complementares, como o sequenciamento de gene *recA* ou mesmo do genoma total, pode constituir uma alternativa para uma identificação mais acurada (Aguiar *et al.*, 2025; Silva-Santana *et al.*, 2025).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise com base no sequenciamento do gene *hisA* demonstrou ser eficaz para a classificação taxonômica de 29 linhagens como *B. contaminans* e oito como *Burkholderia* sp. Uma linhagem não pôde ser identificada com a técnica avaliada. Desta forma, torna-se necessária a utilização de outras técnicas para identificação de todas as linhagens.

Este estudo contribui para o aprimoramento das metodologias de identificação bacteriana utilizadas em laboratórios de controle microbiológico da indústria farmacêutica, ao evidenciar o potencial da ferramenta proposta para a identificação de espécies do CBc. Embora estudos adicionais de validação sejam necessários, essa abordagem poderá representar uma

alternativa acessível para apoiar o monitoramento microbiológico e fortalecer as estratégias de controle de contaminação em indústrias produtoras de medicamentos estéreis.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia de qualidade para sistemas de purificação de água para uso farmacêutico**. Brasília: ANVISA, 2013.

AGUIAR, A. R. *et al.* Use of *recA* gene sequencing as a complementary tool for identification of *Burkholderia* spp. isolated from an immunobiological industry facility. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOBIOLOGICAL, 9., 2025, Rio de Janeiro. **Annals [...]** Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2025. p. 145.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

BALDWIN, A. *et al.* Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 3, p. 458–461, 2007.

BEVIVINO, A. *et al.* *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 846–851, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 658, de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília, DF: ANVISA, 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing**. Wayne, PA: CLSI, 2008.

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

COUTINHO, C. P. *et al.* Incidence of *Burkholderia contaminans* at a cystic fibrosis centre with an unusually high representation of *Burkholderia cepacia* during 15 years of epidemiological surveillance. **J. Med. Microbiol.**, v. 64, n. 8, p. 927–935, 2015.

DA COSTA, C. *et al.* Gerenciamento de riscos à qualidade: uma abordagem prática para a indústria farmacêutica. **Rev. Cient. UBM**, n. 48, p. 122–138, 2023.

DUFOUR, G. *et al.* Identification of *Burkholderia cepacia* complex by PCR: a simple way. **PDA J. Pharm. Sci. Technol.**, v. 77, n. 6, p. 485–497, 2023.

FERREIRA, A. S. *et al.* Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 2, p. 441–450, 2010.

GÖKER, M. *et al.* List of Recommended Names for bacteria of medical importance: report of the Ad Hoc Committee on Mitigating Changes in Prokaryotic Nomenclature. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 75, p. 6943, 2025.

INKSCAPE PROJECT. Inkscape: vector graphics editor. Version 1.0.1. [S.l.], 2020.

JIN, Y. *et al.* Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. **Biol. Direct.**, v. 15, n. 1, p. 6, 2020.

KOUSAR A, *et al.* Biological control of *Botrytis cinerea* in tomato and *Fusarium graminearum* in wheat using the novel species *Burkholderia mycopellens* and *Burkholderia crassaminum*. **Front Microbiol**, v. 17, p. 1776517, 2026.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KUMAR, S. *et al.* MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. **Mol. Biol. Evol.**, v. 41, n. 12, msae263, 2024.

LI, K. *et al.* Species distribution and antimicrobial susceptibility of diverse strains within *Burkholderia cepacia* complex. **Microb. Drug Resist.**, v. 31, n. 5, p. 154–161, 2025.

LI, Q. *et al.* Leveraging whole-genome sequencing for microbial contamination tracking and risk assessment in pharmaceutical manufacturing. **Front. Microbiol.**, v. 17, p. 1807989, 2026.

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.

OLIVEIRA, A. A.; *et al.* Desenvolvimento de uma metodologia de avaliação de criticidade de bactérias isoladas de águas em uma indústria farmacêutica produtora de imunobiológicos. In: JORNADA CIENTÍFICA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 12., **Anais [...]** 2025, Rio de Janeiro.

PAPALEO, M. F.; SCHIRMER, M.; SHAPIRO, L. Molecular identification of *Burkholderia* species using the *hisA* gene as a taxonomic marker. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 8, p. 2689–2698, 2010.

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Mol. Biol. Evol.**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.

RAMBAUT, A. **FigTree v1.4.4**: tree figure drawing tool. Edinburgh: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2018.

RAMOS, J. N. *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.

SANTANA, G. S. *et al.* Polyphasic characterization of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from a pharmaceutical industry facility. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON

IMMUNOBIOLOGICALS, 8., 2024, Rio de Janeiro. Annals... Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2024. p. 144.

SAYERS, E. W. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2025. **Nucl. Acids Res.**, v. 53, n. D1, p. D20–D29, 2025.

SCHNEIER, M. *et al.* Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 117, n. 8, p. 2588–2609, 2020.

SELIM, N. A. *et al.* Monitoring and controlling bacteria in pharmaceutical industries water system. **J. Appl. Microbiol.**, v. 129, n. 4, p. 1079–1090, 2020.

SILVA-SANTANA, G. *et al.* Pharmaceutical contamination by biofilms formed of the *Burkholderia cepacia* complex: public health risks. **Processes**, v. 13, p. 1270, 2025.

SILVA-SANTANA, G.; DE SALES, F. L. S.; BRANDÃO, M. L. L. Laboratory strategies for the identification of *Burkholderia* species: from classical phenotyping to advanced genomic and proteomic approaches. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 119, n. 3, p. 59, 2026.

SONG, M. *et al.* A comprehensive technology strategy for microbial identification and contamination investigation in the sterile drug manufacturing facility: a case study. **Front. Microbiol.**, v. 15, p. 1327175, 2024.

SPIPKER, T. *et al.* Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 2607–2610, 2009.

TAVARES, M. *et al.* *Burkholderia cepacia* complex bacteria: a feared contamination risk in water-based pharmaceutical products. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 33, n. 3, e00139-19, 2020.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). **USP 47–NF 42: <1231> Water for Pharmaceutical Purposes**. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2024.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). **United States Pharmacopeia 48** – National Formulary 43. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2025.

VASCONCELLOS, L. *et al.* Phenotypical and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. isolated from a pharmaceutical facility. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 77, n. 5, p. ovad101, 2023.

VASCONCELLOS, L. *et al.* Phenotypical and molecular characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from a pharmaceutical facility. **Processes**, v. 14, n. 2, p. 231, 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Good Manufacturing Practices for Sterile Pharmaceutical Products**. WHO Technical Report Series, n. 1044, Annex 2. Geneva: WHO, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials**. 10. ed. Geneva: WHO, 2024.

ZHANG, D. *et al.* PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. **Mol. Ecol. Resour.**, v. 20, n. 1, p. 348–355, 2020.