

COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS VITEK® 2 E MALDI BIOTYPER® NA IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS PERTENCENTES AO GRUPO *Bacillus cereus* ISOLADAS DE UMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DE IMUNOBIOLOGICOS

COMPARISON OF VITEK® 2 AND MALDI BIOTYPER® SYSTEMS FOR IDENTIFICATION OF *Bacillus cereus* group ISOLATED FROM AN IMMUNOBIOLOGICAL PHARMACEUTICAL FACILITY

Ana Beatriz Lima dos Santos Tiburcio

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ
<https://orcid.org/0009-0002-7066-0824>
ana.tiburcio@bio.fiocruz.br

Rebeca Vitória da Silva Lage de Miranda

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ
<https://orcid.org/0000-0002-7131-6155>
rebeca.lage@bio.fiocruz.br

Ana Luiza Sant'ana da Silva Guimarães

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ
<https://orcid.org/0009-0000-8565-5169>
alguimaraes@aluno.fiocruz.br

Paula Araujo de Souza

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ
<https://orcid.org/0000-0002-4381-8107>
paula.souza@bio.fiocruz.br

Luciana Veloso Costa*

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ
<https://orcid.org/0009-0008-3698-372X>
luciana.costa@bio.fiocruz.br

Marcelo Luiz Lima Brandão

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, 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: 13/07/2026

RESUMO

Espécies pertencentes ao complexo *Bacillus cereus* são frequentemente encontradas em ambientes industriais devido à ampla distribuição ambiental e à capacidade de formação de endósporos resistentes. A identificação correta desses microrganismos é fundamental para investigações de fontes de contaminação em produtos farmacêuticos. O presente estudo teve como objetivo comparar o desempenho dos sistemas VITEK®2 e MALDI Biotyper® na identificação de linhagens pertencentes ao complexo *B. cereus* isoladas de uma indústria farmacêutica de imunobiológicos. A caracterização fenotípica de 50 linhagens foi realizada por meio do sistema VITEK®2 utilizando cartões BCL, enquanto a caracterização proteômica foi conduzida por MALDI-TOF MS, com o MALDI Biotyper®. O VITEK®2 apresentou elevada taxa de identificação, com predominância das categorias de muito boa identificação (48%), excelente identificação (26,8%) e boa identificação (24,4%), demonstrando eficiência para reconhecimento do complexo bacteriano, embora sem capacidade de discriminação em nível de espécie. O MALDI-TOF MS apresentou melhor desempenho, com 76% das linhagens identificadas com alta confiança e 24% com baixa confiança, evidenciando maior poder discriminatório. Entretanto, limitações relacionadas à elevada similaridade proteômica entre espécies do complexo e à representatividade das bibliotecas espectrais ainda dificultam a identificação inequívoca em nível de espécie. Os resultados demonstram que ambas as metodologias são ferramentas valiosas para triagem microbiológica rápida, porém a identificação definitiva de espécies pertencentes ao complexo *B. cereus* pode requerer métodos complementares, como o sequenciamento genômico. Adicionalmente, a integração entre abordagens moleculares e proteômicas pode contribuir para o enriquecimento das bibliotecas espectrais e para o aprimoramento contínuo da identificação microbiológica.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*. MALDI-TOF MS. VITEK®2. Controle de qualidade. Indústria farmacêutica.

ABSTRACT

Species belonging to the *Bacillus cereus* complex are frequently found in industrial environments due to their widespread environmental distribution and their ability to form resistant endospores, representing an important challenge for microbiological control in pharmaceutical industries. Accurate identification of these microorganisms is essential for contamination investigations, environmental monitoring, and quality assurance of pharmaceutical products. The aim of this study was to compare the performance of the VITEK®2 and MALDI Biotyper® systems in the identification of strains belonging to the *B. cereus* complex isolated from a pharmaceutical immunobiological manufacturing facility. A total of 50 strains previously identified as belonging to this group were analyzed. Phenotypic characterization was performed using the VITEK®2 system with BCL cards, while proteomic characterization was carried out using MALDI-TOF MS through the MALDI Biotyper® system. VITEK®2 showed a high identification rate, with predominance of the categories very good identification (48%), excellent identification (26.8%), and good identification (24.4%), demonstrating efficiency in recognizing the bacterial complex, although without reliable species-level discrimination. MALDI-TOF MS showed a higher frequency of high-confidence identifications, with 76% of strains identified with high confidence and 24% with low confidence, indicating greater discriminatory potential. However, limitations related to the high proteomic similarity among species within the complex and the representativeness of spectral databases still hinder unequivocal species-level identification. The results demonstrate that both methodologies are valuable tools for rapid microbiological screening; however, definitive

identification of species belonging to the *B. cereus* complex may require complementary methods, such as whole-genome sequencing. Furthermore, the integration of molecular and proteomic approaches may contribute to the enrichment of spectral databases and the continuous improvement of microbiological identification.

Keywords: *Bacillus cereus*; MALDI-TOF MS; VITEK®2; quality control; pharmaceutical industry.

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos pertencentes ao grupo *Bacillus cereus* são frequentemente isolados em ambientes industriais devido à ampla distribuição ambiental e à capacidade de formação de endósporos resistentes, característica que favorece sua persistência em diferentes nichos da cadeia produtiva (Caldeira *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2022a). Em indústrias farmacêuticas, espécies pertencentes ao grupo *B. cereus* podem ser detectadas em monitoramentos ambientais, sistemas de água, matérias-primas, produtos intermediários e ensaios de biocarga, tornando sua identificação microbiológica relevante para o controle de qualidade (Mattoso *et al.*, 2025; Oliveira *et al.*, 2025; Ramos *et al.*, 2024). O grupo *B. cereus* possui mais de 6 espécies que podem ser identificados em diferentes nichos conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Espécies do grupo *Bacillus cereus* e suas possíveis origens

Espécie	Origem	Referências
<i>Bacillus cereus</i>	Solo / laticínios	BacDive Database, Meng et al., 2022
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Solo	BacDive Database, El-Kersh et al., 2014
<i>Bacillus anthracis</i>	Solo	BacDive Database, Laroche et al., 2011
<i>Bacillus mycoides</i>	Solo	BacDive Database, Fiedoruk et al., 2021
<i>Bacillus wiedmannii</i>	Leite cru armazenado em uma planta de processamento de laticínios em pó / solo	BacDive Database, Lazarte et al., 2018
<i>Bacillus paranthracis</i>	sedimento do Oceano Pacífico	BacDive Database, Liu et al., 2017

Segundo Mattoso *et al.* (2025), a análise de biocarga em diferentes etapas da cadeia produtiva farmacêutica evidenciou elevada ocorrência de microrganismos classificados como objetáveis e críticos, demonstrando a importância do monitoramento microbiológico contínuo como ferramenta essencial para garantia da qualidade. Esses achados reforçam que a presença

de microrganismos em amostras de biocarga ou no monitoramento ambiental pode indicar falhas nos controles de processo, sanitização ou integridade operacional, representando risco potencial à segurança do produto. Alinhado a essa necessidade de controle, Soares *et al.* (2024) reforça que o monitoramento da biocarga fornece informações cruciais sobre os riscos microbiológicos aos quais os produtos estão expostos, permitindo a implementação de medidas de ação subsequentes. Esse cenário torna-se ainda mais relevante quando são detectadas bactérias formadoras de esporos, como espécies do gênero *Bacillus*, devido à sua alta resistência a condições adversas e processos de esterilização. De fato, no perfil microbiológico cultivável de áreas limpas Grau D avaliado por Soares *et al.* (2024), o gênero *Bacillus* figurou entre os principais isolados bacterianos encontrados, destacando-se a espécie pertencentes ao grupo *B. cereus*. Nesse contexto, a European Medicines Agency (2022) recomenda que microrganismos esporulados isolados em áreas classificadas de determinados graus de limpeza sejam identificados até o nível de espécie, uma vez que essa caracterização é fundamental para avaliação de risco, rastreamento da origem da contaminação e implementação de ações corretivas e preventivas.

A identificação em nível de espécie constitui uma etapa fundamental e obrigatória em casos de detecção de microrganismo em testes de esterilidade (EMA, 2022; USP, 2015), pois esse conhecimento contribui para investigação da origem de contaminações microbiológicas, avaliação de riscos e definição de medidas preventivas e corretivas em ambientes produtivos farmacêuticos (Vasconcellos *et al.*, 2023, 2026). Além disso, contribui para o monitoramento da persistência daquele microrganismo no ambiente para avaliação do potencial impacto na qualidade, segurança e estabilidade de produtos farmacêuticos, especialmente imunobiológicos, vacinas e biofármacos (Mattoso *et al.*, 2025; Oliveira *et al.*, 2025; Ramos *et al.*, 2024).

O grupo *B. cereus sensu lato* é composto por bactérias Gram-positivas, produtoras de endósporos e apresentam características genéticas e morfológicas intimamente relacionadas (Zervas *et al.*, 2020). Esse grupo é composto por espécies como *B. cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus wiedmannii* e *Bacillus paranthracis* (Gupta *et al.*, 2020). A persistência dessas bactérias em ambientes industriais está associada principalmente à capacidade de formação de endósporos resistentes e biofilmes aderidos a diferentes superfícies, incluindo aço inoxidável, vidro, polímeros e sistemas de distribuição de água. Essas estruturas favorecem a permanência microbiana em áreas produtivas e dificultam processos de higienização e desinfecção (Deal *et al.*, 2016; Setlow, 2006; Stecchini *et al.*, 2009).

Atualmente, métodos automatizados baseados em análises bioquímicas, como o sistema VITEK®, e técnicas proteômicas baseadas em espectrometria de massas, como MALDI-TOF MS, representam algumas das principais ferramentas utilizadas para identificação microbiana em laboratórios de microbiologia clínica e controle de qualidade farmacêutico. O sistema VITEK® realiza a identificação bacteriana por meio da avaliação do perfil metabólico dos microrganismos (NUNES RAMOS *et al.*, 2025), enquanto o MALDI-TOF MS baseia-se na análise dos perfis proteômicos gerados a partir das amostras bacterianas. Ambos os métodos dependem da sua base de dados local para uma identificação confiável (Caldeira *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2022a; 2022b; Miranda *et al.*, 2023).

O uso dessas metodologias tem contribuído significativamente para a redução do tempo analítico e para o aumento da rapidez na identificação microbiológica em ambientes laboratoriais. Entretanto, as diferenças metodológicas entre essas técnicas podem influenciar na sua capacidade de identificação, especialmente quando aplicadas a espécies pertencentes ao grupo *B. cereus*. A elevada similaridade genética, fenotípica e metabólica compartilhada entre os membros desse grupo representa um desafio adicional para a discriminação das espécies, podendo impactar o desempenho dos diferentes métodos de identificação microbiológica (Tiburcio *et al.*, 2026).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo comparar o desempenho dos sistemas VITEK®2 e MALDI-TOF MS na identificação de espécies pertencentes ao grupo *B. cereus* isoladas de uma indústria farmacêutica, visando avaliar a aplicabilidade dessas metodologias no contexto do controle microbiológico industrial.

2. METODOLOGIA

2.1. LINHAGENS BACTERIANAS

Foram selecionadas para o estudo linhagens previamente identificadas como pertencentes ao grupo *B. cereus* isoladas de uma indústria farmacêutica de imunobiológicos localizada no Rio de Janeiro, Brasil, no período de 2024 a 2025, de diferentes tipos de amostras da cadeia produtiva, como monitoramentos ambientais (n=14), análises de água (n=21), investigação (n=5), determinação de biocarga (n=4), cultivo celular (n=3), entre outros (n=3).

2.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA UTILIZANDO O VITEK®2

As linhagens bacterianas foram caracterizadas fenotipicamente por meio de testes bioquímicos realizados com cartões BCL específicos para bactérias Gram – positivas

formadoras de endósporos, no sistema semiautomatizado VITEK® 2 (VITEK MS-CHCA, bioMérieux, Craponne, France), seguindo as instruções do fabricante.

2.3. CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA POR MALDI-TOF MS

As linhagens selecionadas foram cultivadas ágar triptona de soja (TSA) por um período de 24 a 48 h, à temperatura de $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Após o tempo de incubação, uma porção de cada colônia foi transferida com o auxílio de uma alça descartável para os poços (spots) de lâminas descartáveis específicas para o sistema MALDI Biotyper® (Bruker, EUA), sendo os esfregaços preparados em quadruplicata, cobrindo toda a área do respectivo spot. Para cada análise, foi utilizada a solução padrão *Bacterial Test Standard* (BTS, Bruker, EUA) como controle, conforme as orientações do fabricante. Em cada spot da amostra, foi aplicada uma alíquota de 1,0 µL de ácido fórmico a 70% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Após a secagem completa à temperatura ambiente, foi adicionada uma alíquota de 1,0 µL da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha), aguardando-se a cristalização. As lâminas foram inseridas no equipamento MALDI Biotyper® para aquisição dos espectros de massa, que foram analisados com o software MBT Compass HT v. 5.1.100. Os resultados obtidos foram expressos em forma de escores, classificados por um sistema de codificação por cores que indica o grau de confiança da identificação: verde representa alta confiança para identificação em nível de espécie (escore entre 2,00 e 3,00), amarelo indica baixa confiança (escore entre 1,70 e 1,99) e vermelho corresponde à ausência de identificação (escore entre 0,00 e 1,69) (Qaudro 2). Nos casos em que não foi obtida identificação score maior que 2,00, foi realizado procedimento de extração com a utilização de etanol, ácido fórmico 70% e acetonitrila, conforme recomendado pelo fabricante. Utilizando uma alça bacteriológica estéril, uma fração de colônia isolada a partir do cultivo em ágar TSA foi coletada e ressuspensa em um microtubo com 300 µL de água destilada estéril. Para a etapa de lavagem e desativação celular, adicionou-se 900 µL de etanol absoluto (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), seguido de homogeneização e centrifugação a 21.000 g durante 2 min. O líquido sobrenadante foi removido por decantação e o processo de centrifugação foi replicado sob parâmetros idênticos. O microtubo permaneceu aberto por 5 min em condições de temperatura ambiente para assegurar a completa volatilização do álcool residual. Posteriormente, realizou-se a lise celular adicionando 25 µL de ácido fórmico a 70% sob agitação, seguidos de 25 µL de acetonitrila a 99,9% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após nova homogeneização, a mistura foi centrifugada a 17.000 g por 2 min para a sedimentação dos

debris celulares. Aliquotas de 1 µL do extrato proteico resultante foram transferidas, em duplicata, para os poços de uma placa descartável do sistema MALDI Biotyper®. Uma vez secas as amostras, aplicou-se 1 µL da solução de matriz HCCA sobre cada spot. Após a evaporação final do solvente da matriz, a placa foi introduzida no espectrômetro de massas MALDI Biotyper® para a aquisição dos espectros conforme o método padrão.

Quadro 2 - Exibição de resultados de identificação no programa MBT Compass Library Revision K

Score (Faixa)	Interpretação	Símbolo	Cor
2,00 – 3,00	Identificação com alta confiança (nível espécie)	(+++)	Verde
1,70 – 1,99	Identificação com baixa confiança (nível espécie)	(+)	Amarelo
0,00 – 1,69	Não foi possível realizar a identificação	(-)	Vermelho

Fonte: Bruker, 2022.

A consistência das identificações foi reportada pelo equipamento nas categorias A, B ou C, considerando a concordância entre os dois melhores resultados obtidos na análise espectral: categoria A - alta confiabilidade da identificação, geralmente associada à concordância entre os dois mais altos escores; categoria B - consistência baixa, com concordância parcial entre os dois mais altos escores; categoria C - ausência de concordância, com ausência de identificação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O sistema VITEK®2 identificou todas as linhagens analisadas como *B. cereus group*, apresentando elevada taxa de identificação para a maioria das linhagens (97,5%), enquanto apenas 2,4% das linhagens apresentaram baixa discriminação (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos níveis de identificação das linhagens do grupo *Bacillus cereus* (n=50) obtidos pelo sistema VITEK®2

Classificação	n.º de linhagens (%)
Muito boa identificação	24 (48,0)
Excelente identificação	13 (26,8)
Boa identificação	12 (24,4)
Baixa discriminação	1 (2,4)
Total	50

Legenda: As categorias “Excelente identificação” (96–99%), “Muito boa identificação” (93–95%), “Boa identificação” (89–92%) e “Baixa discriminação” (85- 88%), com múltiplas possibilidades de identificação)

correspondem aos níveis de confiança atribuídos pelo sistema VITEK® 2 com base nos perfis bioquímicos obtidos para as linhagens analisadas, conforme critérios do fabricante.

Os resultados demonstraram que o sistema VITEK®2 apresentou desempenho satisfatório para o reconhecimento dos microrganismos pertencentes ao grupo *B. cereus*, entretanto, a metodologia não possibilitou a discriminação das espécies do grupo. Esse resultado já era esperado, considerando que as espécies pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato* apresentam elevada similaridade genética, fenotípica e morfológica, compartilhando diversas características metabólicas e, conseqüentemente, perfis bioquímicos muito semelhantes. Esta limitação já é apresentada na bula do cartão BCL (bioMérieux, 2018).

Métodos baseados exclusivamente em provas bioquímicas possuem limitações para a diferenciação entre espécies filogeneticamente próximas, como *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. paranthracis* e outras espécies pertencentes ao grupo (Costa *et al.* 2022a). Embora o VITEK®2 represente uma ferramenta valiosa para triagem microbiológica rápida em laboratórios de controle de qualidade e monitoramento ambiental, sua capacidade de resolução taxonômica é insuficiente para identificação definitiva em nível de espécie, tornando necessária a utilização de métodos complementares (Caldeira *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2026; Song *et al.*, 2024).

Os resultados obtidos por MALDI-TOF MS demonstraram um bom desempenho na identificação das linhagens pertencentes ao complexo *Bacillus cereus*. Observou-se predominância de identificações com alta confiança (escore $\geq 2,00$), correspondendo a 76% das linhagens analisadas, enquanto 24% apresentaram escores entre 1,70 e 1,99, classificados como identificação com baixa confiança. Apenas uma linhagem não apresentou identificação satisfatória pelo método (Tabela 2). A elevada frequência de escores $\geq 2,00$ evidencia a capacidade do MALDI Biotyper® para identificação rápida de linhagens isoladas de ambientes farmacêuticos. Essa metodologia apresenta vantagens importantes para a rotina laboratorial, incluindo rapidez analítica, simplicidade no preparo das amostras, alta reprodutibilidade e redução do tempo necessário para obtenção dos resultados quando comparada a métodos microbiológicos convencionais (Nunes Ramos *et al.*, 2025; Souza *et al.*, 2026a,b).

Tabela 2 – Classificação dos resultados de identificação das linhagens pertencentes ao complexo *Bacillus cereus* (n=50) obtidos no MALDI Biotyper®

Resultado	Classificação do escore	Faixa de escore	Consistência	n.º de linhagens (%)
<i>Bacillus cereus</i> /	Alta confiança	$\geq 2,00$	A	36 (72,0)
<i>Bacillus thuringiensis</i>			B	2 (4,0)

Baixa confiança	1,70 – 1,99	A	9 (18,0)
		B	3 (6,0)

Legenda: Distribuição das linhagens de acordo com as faixas de escore estabelecidas pelo sistema MALDI Biotyper®. Escores $\geq 2,00$ - identificação com alta confiança; escores entre 1,70 e 1,99 - identificação com baixa confiança; e escores $< 1,70$ - não identificados (Bruker, 2022)

Apesar do elevado percentual de identificações classificadas como de alta confiança, a discriminação em nível de espécie entre membros do grupo *B. cereus* permanece um desafio. Essa limitação pode ser explicada pelo princípio analítico do método, que se baseia predominantemente na análise de proteínas ribossomais. Como essas proteínas são altamente conservadas entre espécies filogeneticamente próximas, os perfis espectrais gerados tendem a apresentar grande similaridade, dificultando a diferenciação precisa entre espécies pertencentes ao mesmo complexo bacteriano (Tiburcio *et al.*, 2026). Um exemplo do relatório emitido pelo MALDI Biotyper® está apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Exemplo de identificação obtida no MALDI Biotyper® evidenciando múltiplas possibilidades de classificação para linhagens pertencentes ao complexo *Bacillus cereus*

Rank	Matched pattern	log(score) (Conf.)	NCBI
1	Bacillus cereus_thuringiensis_PG_III BfR_BA_01162 BFR	2,37 (+++)	86661
2	Bacillus cereus_thuringiensis_PG_III BfR_BA_01090 BFR	2,26 (+++)	86661
3	Bacillus cereus 4080 LBK	2,19 (+++)	1396
4	Bacillus cereus_thuringiensis_PG_III BfR_BA_01152 BFR	2,16 (+++)	86661
5	Bacillus cereus 994000168 LBK	2,15 (+++)	1396
6	Bacillus cereus_thuringiensis_PG_III 191127_02 QLAB	2,13 (+++)	86661
7	Bacillus cereus_thuringiensis_PG_III 191127_09 QLAB	2,09 (+++)	86661
8	Bacillus cereus_thuringiensis_PG_IV 16116145_1 MVD	2,03 (+++)	86661
9	Bacillus cereus CICC 23949 CICC	2,03 (+++)	1396
10	Bacillus cereus_thuringiensis_PG_III 994000168 LBK_2	2,03 (+++)	86661

Legenda: Exemplo de identificação para uma linhagem pertencente ao complexo *Bacillus cereus*, evidenciando a ocorrência de duas ou mais possibilidades taxonômicas com valores de escore $\geq 2,00$, decorrentes da elevada proximidade filogenética entre as espécies do grupo.

Além da similaridade genética existente entre os integrantes do grupo *B. cereus sensu lato*, outro fator que pode influenciar a qualidade das identificações está relacionado às bibliotecas espectrais utilizadas pelos equipamentos. Muitas bases de dados comerciais apresentam maior representatividade de microrganismos de importância clínica, enquanto espécies ambientais frequentemente encontradas em instalações farmacêuticas podem estar

sub-representadas. Essa limitação pode reduzir a capacidade de discriminação taxonômica do método para determinados grupos bacterianos (Costa *et al.*, 2022b; Miranda *et al.*, 2023; Nunes Ramos *et al.*, 2025). Além disso, estudos já reportaram resultados errôneos emitidos pelo MALDI Biotyper®. Souza *et al.* (2026a) relataram que uma linhagem isolada da indústria farmacêutica identificada pelo MALDI Biotyper® com baixa confiança (escore de 1,82) foi posteriormente identificada por sequenciamento do genoma completo como *B. paranthracis*.

Alguns estudos descritos na literatura científica, como o de Ha *et al.* (2019), propõem uma reformulação da estratégia de identificação empregada pelo MALDI-TOF MS. Em vez de basear a identificação principalmente em proteínas ribossomais, altamente conservadas entre espécies filogeneticamente próximas, os autores sugerem a utilização de proteínas e metabólitos de baixa massa molecular como potenciais biomarcadores para discriminação taxonômica. Tradicionalmente, os espectros obtidos por MALDI-TOF MS são analisados na faixa de m/z entre 3.000 e 20.000, região na qual predominam proteínas de pequeno e médio porte, incluindo proteínas ribossomais e estruturais. Entretanto, espécies pertencentes ao complexo *Bacillus cereus* apresentam metabolismo central bastante semelhante, o que contribui para a geração de perfis espectrais altamente relacionados. Em contrapartida, diferenças mais específicas podem estar associadas à produção de metabólitos secundários, como sideróforos, toxinas e outros compostos característicos, frequentemente encontrados em faixas inferiores de massa, entre 500 e 3.000 m/z . Essa abordagem tem demonstrado potencial para aumentar o poder discriminatório do MALDI-TOF MS na diferenciação de espécies estreitamente relacionadas. Contudo, tratase de uma estratégia que ainda se encontra predominantemente em nível de pesquisa científica. Sua implementação em ambientes industriais, como na indústria farmacêutica, exigiria considerável esforço analítico e regulatório, uma vez que todo o método precisaria ser validado seguindo o que é preconizado pelas Boas Práticas de Fabricação. (Brasil, 2022).

Dessa forma, embora o MALDI Biotyper® tenha demonstrado desempenho superior ao observado para métodos exclusivamente bioquímicos, sua utilização isolada pode não ser suficiente para identificação em nível de espécie de linhagens pertencentes ao grupo *B. cereus*. Nesses casos, a utilização de métodos complementares, como o sequenciamento de genes constitutivos ou o sequenciamento do genoma completo, não apenas permite a identificação mais precisa de espécies pertencentes ao grupo *B. cereus*, mas também contribui para o enriquecimento contínuo das bases de dados utilizadas pelo equipamento (Costa *et al.*, 2022b, 2024). Uma vez que a identidade taxonômica de uma linhagem é confirmada por metodologias de maior poder discriminatório, seus espectros proteicos podem ser incorporados à biblioteca

do MALDI-TOF MS como novos espectros de referência. Esse processo possibilita a expansão da base de dados e aumenta a representatividade de espécies anteriormente ausentes ou subrepresentadas, especialmente aquelas de origem ambiental (Souza *et al.*, 2026b).

Como consequência, o enriquecimento contínuo das bibliotecas espectrais tende a aumentar a capacidade discriminatória do método e a melhorar a acurácia das identificações futuras. Nesse contexto, os métodos moleculares não devem ser vistos apenas como ferramentas confirmatórias, mas também como importantes aliados no aprimoramento das bases de dados do MALDI-TOF MS, contribuindo para o desenvolvimento de bibliotecas cada vez mais robustas e representativas da diversidade microbiana.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram que tanto o VITEK®2 quanto o MALDI-TOF MS constituem ferramentas úteis para a identificação rápida de microrganismos pertencentes ao grupo *B. cereus* em laboratórios de controle microbiológico. O VITEK®2 apresentou bom desempenho para reconhecimento das linhagens em nível de grupo, porém com limitações para discriminação em nível de espécie devido à elevada similaridade bioquímica existente entre os membros do grupo. O MALDI-TOF MS apresentou maior capacidade de identificação e elevada frequência de resultados com alta confiança, entretanto também demonstrou limitações na diferenciação de espécies estreitamente relacionadas pertencentes ao grupo *B. cereus*. Os resultados reforçam que a identificação definitiva dessas espécies pode requerer métodos complementares de maior poder discriminatório, como o sequenciamento genômico. Além disso, a utilização de abordagens moleculares para confirmação taxonômica pode contribuir para o enriquecimento contínuo das bibliotecas espectrais do MALDI-TOF MS, ampliando sua capacidade de identificação e favorecendo o aprimoramento das análises microbiológicas em ambientes industriais.

AGRADECIMENTOS

Ana Beatriz L. S. Tiburcio agradece ao suporte do CNPq em forma de Bolsa referente ao Programa PIBITI/Fiocruz (Processo #14879). Ana Luiza S. S. Guimarães agradece ao suporte da FAPERJ em forma de Bolsa referente ao Programa IC/FAPERJ. Paula A. de Souza agradece ao suporte da Fiocruz em forma de Bolsa referente ao Programa de Pós-Doutorado Junior (Inscrição número 641-20251230). Marcelo L. L. Brandão agradece ao suporte do CNPq em forma de Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ-C) (Processo: 304877/2024-7) e a

FAPERJ em forma de Bolsa de Jovem Cientista do Nosso Estado (Processo: E-26/204.245/2025-BOLSA N.º de Matrícula: 2005.03225.2). Este projeto contou com apoio financeiro da FAPERJ N.º de processo: SEI-260003/004513/2025 - APQ1 / N.º DE MATRÍCULA 2005.03225.2 / Ref. Proc. -26/210.563/2025.

REFERÊNCIAS

- BIOMÉRIEUX. *VITEK® 2 BCL Identification Card Product Insert*. Marcy-l'Étoile, France: bioMérieux, 2018. BacDive: the Bacterial Diversity Metadatabase. Disponível em: <https://bacdive.dsmz.de/>. Acesso em: 11 jun. 2026.
- 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.
- BRUKER. **Ref 1854229** - Species/Entry List MBT Compass Library Revision K. Document Revision E. 1–75; Bruker Daltonics GmbH & Co, 2022. KG: Bremen, Germany, 2022.
- 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.
- 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.
- COSTA, A. S. *et al.* Standardization of an Effective Disinfection Methodology Against Microorganisms Isolated from a Pharmaceutical Industry Facility as a Contamination Control Strategy. **Standards**, v. 6, n. 2, p. 22, 2026.
- 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.
- 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.
- DERZELLE SLAROCHE, S. *et al.* Characterization of Genetic Diversity of *Bacillus anthracis* in France by Using High-Resolution Melting Assays and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 12, 2011.

EL-KERSH, T. A., AL-AKEEL, R. A., AL-SHEIKH, Y. A., ALHARBI, S. A. Isolation and distribution of mosquitolarvicidal cry genes in *Bacillus thuringiensis* strains native to Saudi Arabia. **Trop Biomed**, v. 31, n. 4, p. 616-32, 2014.

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.

FIEDORUK, K. *et al.* Pan-Genome Portrait of *Bacillus mycoides* Provides Insights into the Species Ecology and Evolution. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 1, p. e00311-21, 2021.

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.

LAZARTE, J. N. *et al.* *Bacillus wiedmannii* biovar thuringiensis: A Specialized Mosquitocidal Pathogen with Plasmids from Diverse Origins. **Genome Biology and Evolution**, v. 10, n. 10, p. 2823-2833, 2018.

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.

LIU, Y. *et al.* Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 67, n. 8, p. 2499-2508, 2017.

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.

MENG, L *et al.* Characterization and spoilage potential of *Bacillus cereus* isolated from farm environment and raw milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 940611, 2022.

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.

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., 2025, Rio de Janeiro.

RAMOS, V. B. A. *et al.* Desenvolvimento de classificação da criticidade de bactérias em monitoramento ambiental de indústria farmacêutica de imunobiológicos. *In: SIMPÓSIO DE BIOSSEGURANÇA E BIOPROTEÇÃO*, 1.; SEMANA DA QUALIDADE DE BIO-MANGUINHOS, 11., 2024, Rio de Janeiro. Anais [...]. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz), 2024. 1 p.

SOARES, G.; AMORIM-NETO, D. P.; COGO-MÜLLER, K. Culturable microbiological profile of a non-sterile drugs pharmaceutical production environment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. e23664, 2024.

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 microbiological identification in a pharmaceutical facility: a case study. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1327175, 2024.

SOUZA, P. A.; *et al.* WGS for identification of a *Bacillus paranthracis* strain isolated from a pharmaceutical facility misidentified by MALDI-TOF MS as *Bacillus cereus/thuringiensis*. *In: SIMPÓSIO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE MEDICAMENTOS*, 1., 2026, Rio de Janeiro. **Anais [...]**. Rio de Janeiro: Fiocruz/Bio-Manguinhos, 2026a.

SOUZA, P. A.; *et al.* Whole Genome Sequencing for species level identification of *Bacillus cereus* isolated from pharmaceutical industry and expansion of MALDI-TOF MS database. *In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOBIOLOGICAL*, 10., 2026. Rio de Janeiro. **Annals [...]**. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2026b. p. 225.

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.

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.

TIBURCIO, A. B. L. S. *et al.* Identificação de espécies do grupo *Bacillus cereus* isoladas em indústrias farmacêuticas: uma revisão da literatura **Revista Científica do UBM**, v. 28, n. 54, p. 124-142, 2026.

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.

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.