

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

Fernanda Ventura Cruz

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE FUNGOS ISOLADOS DO CONTROLE  
MICROBIOLÓGICO DE BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ E ESTRUTURAÇÃO  
DE UMA MICOTECA**

Rio de Janeiro

2015

Fernanda Ventura Cruz

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE FUNGOS ISOLADOS DO CONTROLE  
MICROBIOLÓGICO DE BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ E ESTRUTURAÇÃO  
DE UMA MICOTECA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Manuela da Silva

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na Fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Cruz, Fernanda Ventura

Caracterização fenotípica de fungos isolados na rotina do controle microbiológico de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e estruturação de uma micoteca / Fernanda Ventura Cruz. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

119 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária). Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

Orientadora: Manuela da Silva

1. Boas Práticas de Fabricação. 2. Monitoramento Ambiental. 3. Fungos. 4. Técnicas de Tipagem Micológica. 5. Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz. I. Título

Phenotypic characterization of fungal isolates in routine microbiological control of Bio-Manguinhos / FIOCRUZ and structuring of a mycology collection.

Fernanda Ventura Cruz

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE FUNGOS ISOLADOS DO CONTROLE  
MICROBIOLÓGICO DE BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ E ESTRUTURAÇÃO  
DE UMA MICOTECA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovada em 27 / 08 / 2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Verônica Viana Vieira (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Áurea Maria Lage de Moraes (Doutora)  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Marcelo Elias Fraga (Doutor)  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Manuela da Silva (Doutora) – Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Às minhas amadas avós Ana e Terezinha, meus grandes amores.  
A minha mãe Telma e ao meu pai Ilton por toda dedicação e entrega à família,  
que são meu maior estímulo e incentivo às minhas conquistas.  
Meus irmãos e melhores amigos, Ana Lúcia e Robson.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena  
acreditar no sonho que se tem  
ou que os seus planos nunca vão dar certo  
ou que você nunca vai ser alguém”

Renato Russo

## AGRADECIMENTOS

A realização desse sonho foi repleta de momentos marcantes. Dias de desânimo, cansaço, alegrias, dores, risadas, dificuldades e muito aprendizado. Difícil descrever tantos momentos em uma fase com tantas mudanças pessoais e profissionais. Mais difícil ainda agradecer a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta na finalização dessa etapa tão importante, que por vezes pareceu “inalcançável”.

Agradeço a Deus por suprir todas as minhas necessidades e me dar forças para superar as dificuldades da vida.

Aos meus pais por toda garra e dedicação, que conseguiram construir uma família unida e feliz, a qual amo muito. Muito obrigada por todo amor e paciência.

À minha querida irmã Ana Lúcia e meu irmão Robson, apesar de sermos tão diferentes o carinho e o respeito sempre prevaleceram em nossa convivência. Estamos geograficamente distantes hoje, mas com a certeza de que podemos sempre contar uns com os outros. Amo vocês.

À grande amiga Luciane Medeiros que foi muito além do incentivo que um amigo pode dar. Sem dúvidas se estou aqui hoje, devo tudo a você! Talvez tenha acreditado antes de mim mesma que meu sonho era possível. Serei eternamente grata!

À minha orientadora Dra. Manuela, muito obrigada pelas sugestões e ideias que foram importantíssimas nos momentos de ansiedade e inquietude.

À minha co-orientadora, Dra. Gisela Costa, do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Muito obrigada por sua ajuda e dedicação em todos os momentos, principalmente naqueles mais críticos. Pelo incentivo e parceria, tanto

profissional quanto pessoal. Sua participação foi fundamental para realização deste trabalho.

Às minhas chefias Darcy, Igor, Carina e Josiane. Agradeço imensamente a oportunidade e a confiança, em especial o apoio frente às dificuldades que enfrentei nessa jornada. Toda força foi importantíssima para a estabilidade emocional que precisei para conseguir concluir esse trabalho. Muito obrigada!

Às amigas da vida e parceiras de trabalho: Adriana, Cristhiane, Joyce, Lygia e Luciana Veloso. Todos os momentos que passamos são especiais e agradeço todos os dias poder contar com essa energia que enche meu coração de alegria. Sem vocês eu não teria conseguido. Muito obrigada de coração!

À querida amiga e eterna “chefe” Lilia Seródio obrigada pela oportunidade. Nossos divertidos e agradáveis almoços, momentos tão importantes de descontração e desabafo. Você é muito querida!

Aos colegas da SEPIN: Nilson, Silvia, Paulo, Luciane Gomes, Vânia e Leila, esse trabalho é fruto da união de todas as forças. Obrigada!

Maria Teresa sua atenção e generosidade foram especiais. Esse trabalho também não teria sido concluído sem sua ajuda. Um olhar atento ao lado faz toda a diferença. E você fez! Obrigada.

Amigos da SEMEC e SEPRM, toda ajuda e boa vontade em todos os momentos que precisei. Vocês também são especiais.

Às queridas amigas: Érica, Alessandra, Márcia, Melissa, Jéssica, Vanessa, Ana Carolina e Carina, muito obrigada! As terapias de café da manhã, pausas pelos corredores, caronas e palavras rápidas de incentivo proporcionaram momentos de alívio e alegria nos meus dias.

Aos amigos do DEQUA, todas as palavras de encorajamento foram indispensáveis para recarregar as forças. Muito obrigada a todos!



Muito obrigada pela ajuda na identificação dos fungos filamentosos no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, Roberta Heringer. Sua companhia e carinho foram especiais. Claudinha, sua gentileza também fizeram a diferença. Obrigada.

Á minha querida “família adotiva”, não tenho como retribuir tudo que fizeram por mim. Adriana e Fernando, vocês não abriram somente as portas da sua casa, me acolheram com todo amor do coração. Maria e Ana, nossos jantares em família, festas do pijama, filmes da Disney, entre tantos outros momentos preencheram meu coração que estava inundado de saudades. Muito obrigada!

Meu melhor amigo e companheiro Dudu. Agradeço de coração toda força e coragem dedicadas na construção dessa parte tão importante da nossa história. Principalmente nesses últimos anos, que em meio a tantos obstáculos nunca me deixou esquecer de que o mais importante é estarmos juntos. Seu amor e sua alegria preenchem meus dias de felicidade. Esse trabalho também é seu! Muito obrigada por tudo, em especial por me fazer uma pessoa mais alegre e feliz. Amo você!

Meus queridos, Célia e Heleno. Tenho muita sorte em ser acolhida em uma família tão especial. Nem sei como retribuir tanto cuidado e carinho. Deus me presenteou com o amor de vocês e não tenho dúvidas de que os laços que construímos vão muito além dos de sangue, são de muito amor e respeito.

Aos meus colegas de mestrado, em especial: Bruna, Mayara e Leonardo. Nossas aulas muitas vezes foram corridas e cansativas, mas sempre divertidas e agradáveis. Sinto saudades!

Ao Departamento de Micologia do INCQS, em especial Dra. Marília e Carlinhos, muito obrigada pela boa vontade e ajuda.

Dra. Verônica Viana Vieira sempre disposta a ajudar com palavras carinhosas de incentivo. Minha admiração de antes se uniu à gratidão.

À Coordenação de pós-graduação do INCQS e às “meninas” da secretaria acadêmica sempre tão prestativas e gentis. Um agradecimento especial à coordenadora Kátia Leandro. Sua compreensão e apoio foram fundamentais nos momentos mais difíceis e sensíveis.

Ao Instituto Vital Brazil pela gentileza na doação dos cartões de identificação.

Ao amigo e parceiro de trabalho Manoel Marques, todas as conversas e dicas contribuíram muito para o enriquecimento do trabalho. Ainda teremos diversos trabalhos juntos e nossa parceria se estenderá por muito tempo. Obrigada!

Dra. Francine Ribeiro além da competência médica, seu tratamento foi muito além da relação médico/paciente, o carinho e o cuidado que me dedicou em um dos momentos mais delicados e frágeis da minha vida. Guardo todo cuidado que teve comigo com muito carinho.

A toda minha querida família: Tia Lucimar, Tia Fátima e Marcelo, Tia Lurdinha, Tia Lucinha, Tio João, Tio Braz, Tio Edson, minha “Tiquinha” e todos os primos que tanto amo. Ter uma família tão alegre e unida é um presente de Deus. Vocês são muito importantes na construção da minha história.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

A indústria farmacêutica busca constantemente produzir e oferecer produtos com qualidade com o objetivo de garantir a eficácia do produto e a segurança do usuário. O regulamento que orienta as ações necessárias em todas as indústrias farmacêuticas do Brasil e trata das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) é a RDC 17/2010. Segundo a Resolução, o monitoramento microbiológico de áreas controladas para produção de medicamentos deve ser realizado de modo que a contaminação ambiental seja evitada em todas as etapas de fabricação e, em caso de contaminação, que os micro-organismos isolados nesses ambientes sejam identificados, a fim de auxiliar a investigação da fonte de contaminação. A caracterização de fungos é extremamente importante para o conhecimento desta microbiota. Atualmente, a maioria dos métodos de identificação de micro-organismos utilizados nas indústrias farmacêuticas é baseada em provas bioquímicas (caracterização fenotípica), cujos sistemas são construídos com informações de isolados clínicos e não contemplam a diversidade ambiental. Não existem muitos relatos na literatura referentes aos contaminantes isolados em ambientes industriais. A identificação proteômica de micro-organismos por MALDI-TOF/MS apresenta-se inovadora por ser um método fácil, rápido, de alto rendimento e baixo custo. O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotipicamente por bioquímica e proteômica as leveduras e morfológicamente e por proteômica os fungos filamentosos isolados nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos/Fiocruz e implementar os métodos na rotina de identificação de contaminantes do Laboratório de Controle Microbiológico. Os isolados foram obtidos a partir de amostras de monitoramento ambiental, monitoramento de água, validação e testes de esterilidade. As leveduras foram identificadas pelo sistema bioquímico VITEK 2 Compact (V2) e proteômico VITEK MS RUO (VMS) e os fungos filamentosos foram caracterizados pela morfologia e pelo sistema VMS. Entre fevereiro de 2012 e novembro de 2013 foram isolados 514 fungos, sendo 453 (88%) fungos filamentosos e 61 (12%) leveduras. O sistema VMS apresentou melhor desempenho na identificação das leveduras de referência em comparação com o sistema V2. Na identificação dos isolados de leveduras autóctones, o sistema V2 apresentou maior número de identificações, em

comparação com o sistema VMS, porém esse último teve maior diversidade de gêneros identificados. O gênero *Candida* foi o mais frequentemente identificado em ambas as metodologias. Os gêneros de fungos filamentosos identificados pela morfologia totalizaram 11, sendo *Aspergillus* o gênero encontrado com maior frequência (30% dos isolados), seguido pelos gêneros *Penicillium* (27%) e *Cladosporium* (23%). Foram selecionados 10 isolados autóctones da espécie *A. versicolor* para análise pelo VMS, juntamente com a cepa de referência *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853), com tempo de crescimento de dois, três, quatro, cinco, seis e sete dias de incubação. Foi realizada a análise do BD/SARAMIS (BD) para todas leveduras que foram previamente identificados pela bioquímica e todos os fungos filamentosos previamente identificados pela morfologia. Com base nos resultados, constata-se a importância de inserir no BD os representantes fúngicos que não fazem parte deste banco, assim como os isolados não identificados, para ampliar a performance de identificação de espécies fúngicas. A implementação da metodologia de identificação morfológica dos fungos filamentosos em nível de gênero na rotina do laboratório foi concluída com êxito

Palavras chave: Áreas controladas. Monitoramento Ambiental. Fungos filamentosos. Leveduras. MALDI-TOF/MS.

## ABSTRACT

The pharmaceutical industry constantly seeks to produce and deliver quality products in order to ensure the effectiveness of the product and user safety. The regulation that guides the actions required in all pharmaceutical industries in Brazil and deals with Good Pharmaceutical Manufacturing Practice (GMP) is the RDC 17/2010. According to the resolution, microbiological monitoring of controlled areas for the production of drugs should be performed so that environmental contamination is avoided at all stages of manufacture and in the event of contamination, the micro-organisms isolated in these environments are identified in order to assist the investigation of the source of contamination. The characterization of fungi is extremely important for the knowledge of this microbial population. Currently, most of microorganisms identification methods used in the pharmaceutical industry is based on biochemical tests (phenotypic characterization), whose systems are built with information from clinical isolates and do not include environmental diversity. There are few reports in the literature regarding the isolated contaminants in industrial environments. The proteomic identification of microorganisms by MALDI-TOF/MS is regarded as innovative because it is an easy, quick, of high yield and low cost. The aim of this study was to characterize phenotypically by biochemistry and proteomics the yeasts and morphologically and by proteomics the filamentous fungi isolated from the productive areas of Bio-Manguinhos/Fiocruz and implement the methods in the contaminant identification routine of the Microbiological Control Laboratory. The isolates were obtained from samples of environmental monitoring, water monitoring, validating and sterility testing. The yeasts were identified by the biochemical system VITEK 2 Compact (V2) and by proteomic VITEM RUO MS (VMS) and the filamentous fungi were characterized by morphology and by VMS. Between February 2012 and November 2013, 514 fungi we isolated, from which 453 (88%) were filamentous fungi and 61 (12%) were yeasts. The VMS system was more efficient at identifying the reference yeasts compared to V2 system. For the identification of indigenous yeasts, the V2 system showed a higher number of identifications, compared to the VMS system, however the latter had greater diversity of genera identified. The genus *Candida* was the most frequently identified in both approaches. Filamentous

fungal genera identified by morphology amounted 11, and the genus *Aspergillus* was the most frequently found (30% of isolates), followed by *Penicillium* (27%) and *Cladosporium* (23%). For VMS analyses, 10 indigenous isolates of *A. versicolor* were selected, along with the reference strain *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853), with growth time of two, three, four, five, six and seven days of incubation. The BD/SARAMIS (BD) analyses were performed for all yeasts that were previously identified by biochemical tests and for all filamentous fungi previously identified by morphology. Based on the results, it was realized the importance of including in the BD fungal representatives that are not part of this database, as well as unidentified isolates, to increase the performance of fungal species identification. The implementation of morphological identification methodology of filamentous fungi at the genus level in the laboratory routine was successful.

Keywords: Controlled areas. Environmental monitoring. Filamentous fungi. Yeasts. MALDI-TOF/MS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Princípios da tecnologia de MALDI-TOF MS .....	37
Figura 2 - Fluxograma das atividades realizadas para a caracterização e preservação dos fungos filamentosos e leveduras.....	45
Figura 3 - Amostras recebidas pela SEPIN.....	46
Figura 4 - Placa de monitoramento onde são observadas colônias .....	47
Figura 5 –Esquema da técnica de ponto de inóculo, pela qual o isolado é inoculado em três pontos equidistantes para permitir observação morfológica das colônias. ....	52
Figura 6 - Placa para técnica de microcultivo em lâmina .....	53
Figura 7 - Percentual de fungos filamentosos e leveduras isoladas para identificação no período de 2012/2013 .....	58
Figura 8 - Identificação das leveduras pelos dois sistemas testados .....	66
Figura 9 - Foto do isolado L42 em agar TSA e PDA com sete dias de incubação.....	70
Figura 10 –Imagem referente a observação ao microscópio de esfregaço do isolado L42 submetido a coloração de Gram .....	71
Figura 11 - Gêneros de fungos filamentosos identificados (2012/2013) dentro de um universo de 385 isolados.....	73
Figura 12 - Distribuição dos fungos filamentosos por área de produção.....	79
Figura 13 - Espécies do gênero <i>Aspergillus</i> identificadas (N=33) .....	81
Figura 14 - Espécies encontradas do gênero <i>Penicillium</i> .....	82
Figura 15 - Espécies encontradas do gênero <i>Cladosporium</i> .....	82
Figura 16 - Dendrograma (adaptado) das análises dos isolados de <i>A. versicolor</i> apresentado pelo software SARAMIS .....	93
Figura 17 – SuperSpectra <i>A. versicolor</i> INCQS 40028 (ATCC 16853) .....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites recomendados para monitoramento de partículas viáveis em áreas controladas durante operação.....	24
Tabela 2 – Limites de aceitação de partículas não viáveis. ....	25
Tabela 3 - Fontes de isolamento das leveduras.....	72
Tabela 4 - Total de fungos filamentosos estudados (2012/2013).....	74
Tabela 5 - Número de isolados representantes dos.....	75
Tabela 6 - Fonte de isolamento de fungos filamentosos .....	78
Tabela 7 - Gêneros identificados por área de produção .....	80
Tabela 8 - Resultados dos 385 isolados .....	86
Tabela 9 – <i>Aspergillus</i> spp. identificados (15 isolados).....	87
Tabela 10 - Amostras processadas pelo VITEK MS RUO em quadruplicata ...	91
Tabela 11 – Tabela com as massas e suas respectivas intensidades do SS proposto .....	96



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais riscos evitados pelas BPF.....	20
Quadro 2 - Definição dos graus de classificação das áreas controladas .....	23
Quadro 3 - Classificação de áreas controladas quanto a partículas em suspensão no ar.....	24
Quadro 4 – Dados registrados dos isolados fúngicos no Banco de Dados (planilha Excel).....	48
Quadro 5 - Comparação dos resultados pelos dois métodos testados com nível de confiança.....	60
Quadro 6 – Comparação dos resultados obtidos no presente estudo com trabalhos publicados .....	76
Quadro 7 - Comparação de variações dos protocolos BioMérieux e Maceração utilizadas na identificação pelo VITEK MS RUO de 11 isolados de <i>A. versicolor</i> .....	84
Quadro 8 - Análise do BD/SARAMIS .....	88

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Agar Sangue de Carneiro a 3%
BD/SARAMIS	Bando de dados SARAMIS
BHI	Caldo Infusão Cerebro Coração
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CHCA	Matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
CYA	Extrato de Levedura <i>Czapek</i> Agar
DHB	Matriz ácido 2,5 dihidroxibenzóico
ES	Espectros de Referência
EU GMP	<i>European Union Good Manufacturing Practice</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MALDI-TOF/MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/Mass Spectrometry</i>
MEA	Extrato de Malte Agar
MUM	Micoteca da Universidade do Minho/Portugal
NID	Não identificado
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
PCA	Agar Padrão para Contagem
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PMA	Programa de Monitoramento Ambiental
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RODAC	<i>Replicated Organisms Detection and Counting</i>
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SARAMIS®	<i>Spectral Archiving and Microbial Identification System</i>
SEPIN	Seção de Esterilidade Processos e Insumos
SS	Super Spectra
SUS	Sistema Único de Saúde
TFA	Ácido Trifluoracético
TSA	Agar Trypticase de Soja

UFC	Unidade formadora de colônia
USP 32	Farmacopéia Americana
V2	VITEK 2 Compact
VMS	VITEK MS RUO
VITEK MS RUO®	<i>Mass Spectrometry Microbial Identification System Research Use Only (BioMérieux)</i>
WFCC	<i>World Federation for Culture Collections</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
YST	Cartão de identificação de leveduras - BioMérieux

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS.....	17
1.2 CONCEITO DE QUALIDADE .....	18
1.3 REGULAMENTAÇÃO.....	18
1.4 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO.....	19
1.5 MONITORAMENTO AMBIENTAL .....	21
1.6 ÁREAS CONTROLADAS .....	22
1.6.1 Classificação das áreas .....	22
1.6.2 Amostragem.....	25
1.7 MICRO-ORGANISMOS E O AMBIENTE INDUSTRIAL .....	27
1.8 FUNGOS .....	29
1.8.1 Fungos filamentosos .....	30
1.8.1.1 Gênero: Aspergillus .....	30
1.8.1.2 Gênero: Penicillium.....	31
1.8.1.3 Gênero: Cladosporium .....	32
1.8.2 Leveduras .....	32
1.9 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS .....	33
1.9.1 Métodos fenotípicos .....	34
1.9.1.1 Morfológico .....	34
1.9.1.2 Bioquímico .....	35
1.9.1.3 MALDI-TOF MS .....	35
1.9.2 Métodos genotípicos .....	39
1.10 PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS E ESTRUTURAÇÃO DA MICOTECA .....	40
<b>2 RELEVÂNCIA / JUSTIFICATIVA</b> .....	43
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	44
3.1 GERAL.....	44
3.2 ESPECÍFICOS.....	44
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	45
4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	45
4.2 ESTRUTURAÇÃO DE UM BANCO DE DADOS PARA AS INFORMAÇÕES REFERENTES AOS FUNGOS ISOLADOS .....	47
4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS PELO SISTEMA VITEK 2 COMPACT® E PELO SISTEMA VITEK MS RUO® (BIOMÉRIEUX).....	48

4.3.1 Reisolamento .....	48
4.3.2 Identificação bioquímica pelo sistema VITEK 2 Compact .....	48
4.3.3 Identificação proteômica pelo sistema VITEK MS RUO .....	49
<b>4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS</b> .....	<b>50</b>
4.4.1 Triagem inicial .....	50
4.4.2 Preservação dos gêneros mais frequentes .....	51
4.4.3 Reisolamento e identificação das espécies.....	51
4.4.3.1 Caracterização macroscópica.....	51
4.4.3.2 Caracterização microscópica.....	51
<b>4.5 CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS PELO SISTEMA VITEK MS RUO (BIOMÉRIEUX)</b> .....	<b>54</b>
<b>4.6 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS E CRIAÇÃO DA MICOTECA</b> .....	<b>56</b>
4.6.1 Leveduras .....	56
4.6.2 Fungos filamentosos .....	57
4.6.2.1 Geladeira .....	57
4.6.2.2 Freezer -80°C .....	57
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
5.1 AMOSTRAS E SELEÇÃO DOS ISOLADOS .....	58
5.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DAS LEVEDURAS ..	58
5.2.1 Resultados das cepas de referência (leveduras) submetidas à identificação pelos sistemas VITEK 2 e VITEK MS RUO.....	61
5.2.2 Resultados dos isolados de leveduras autóctones submetidas à identificação pelos sistemas VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO .....	62
5.2.3 Análise do banco de dados SARAMIS (leveduras) .....	67
5.2.4 Diversidade e fontes de isolamento de leveduras.....	71
5.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ..	72
5.3.1 Diversidade ao nível de gênero de fungos filamentosos .....	72
5.3.2 Diversidade de espécies de fungos filamentosos .....	80
5.4 IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS PELO SISTEMA VITEK MS RUO (BIOMÉRIEUX).....	83
5.5 IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PELA MORFOLOGIA NA SEPIN .....	97
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>99</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>102</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O direito à saúde foi inserido na Constituição Federal de 1988, no Art.196, reconhecendo “a saúde como direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação”. Reconhecendo a saúde como direito social fundamental, o Estado obrigou-se à formulação de políticas públicas, seguindo a linha do Direito Internacional, atendendo as perspectivas de promoção, prevenção e cura, impondo ao Poder Público o acesso da população ao tratamento que garantia senão a cura da doença, uma melhor qualidade de vida (BRASIL, 1988).

A criação de uma estrutura organizacional através da Lei Federal 8080, de 19 de setembro de 1990, conferindo ao Sistema Único de Saúde (SUS) não somente o papel de garantir o direito à saúde, mas também estabelecer sua forma de atuação seus e objetivos. Concretizando o direito constitucional à saúde essa Lei determina que, o campo de atuação do SUS abrange: a vigilância epidemiológica, a vigilância sanitária, a saúde do trabalhador e a assistência terapêutica integral (BRASIL, 1990).

Portanto, como uma das áreas de atuação do SUS, a Vigilância Sanitária tem como responsabilidade proteger e prevenir a saúde, bem como a qualidade de vida da população como um todo. A vigilância sanitária é definida como “conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde...” (BRASIL, 1990).

Em decorrência de uma sequência de fatos ocorridos envolvendo produtos destinados à saúde, exigências políticas e sociais externas impulsionaram a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), instituída pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Assim, a administração pública deixou de ser fornecedora exclusiva ou principal de serviços relacionados à vigilância sanitária, e passou a atuar então na função de controle. A finalidade da Agência é: “promover a proteção da saúde da

população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados.” (ANVISA, 2012).

Além disso, a ANVISA exerce o controle de portos, aeroportos, fronteiras e a interlocução junto ao Ministério das Relações Exteriores para tratar de assuntos relacionados à área de vigilância sanitária (ANVISA, 2012).

### 1.1 INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Um grande esforço tem sido feito por parte do Estado, através de diversas ações para atingir autossuficiência na produção de medicamentos e de imunobiológicos, de modo a garantir a saúde da população.

A Fundação Oswaldo Cruz, por meio do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), desempenha um importante papel no suprimento das vacinas essenciais para o calendário básico de imunização do Ministério da Saúde. Foram entregues mais de 103 milhões de doses de vacinas no ano de 2014, com perspectiva de incremento anual nesses quantitativos. Além das vacinas, foram também produzidos mais de cinco milhões de reagentes para kits de diagnóstico e cerca de nove milhões de frascos de biofármacos Alfaepoetina (eritropoietina) e Alfainterferona 2b (interferon).

Dessa forma, Bio-Manguinhos cumpre suas diretrizes de proporcionar o acesso gratuito da população à prevenção por imunização e a redução dos custos do Ministério da Saúde com a importação da maioria dos produtos biológicos (site Bio-Manguinhos).

## 1.2 CONCEITO DE QUALIDADE

Para que o fornecimento de medicamentos e vacinas seja uma estratégia alternativa de política de saúde do governo, além da utilização orientada, deve-se garantir que estes produtos cheguem à população com critérios mínimos de qualidade. A produção farmacêutica possui quatro alicerces principais: segurança, eficácia, acesso e qualidade (DEUS & SÁ, 2011). Martinez (2007), define o conceito de qualidade como “*a totalidade das características de uma entidade que lhe confere a capacidade de satisfazer necessidades explícitas e implícitas dos clientes*”, sendo a qualidade total “*um estado ótimo de eficiência e eficácia na ação de todos os elementos que constituem a existência da empresa*”. E mediante a importância da manutenção da qualidade, as indústrias farmacêuticas sustentam o alicerce da qualidade, tanto para atender às exigências regulatórias, quanto para a satisfação dos usuários (DEUS & SÁ, 2011).

A indústria farmacêutica busca constantemente produzir e oferecer produtos com qualidade exigida, e se tratando de garantia e/ou controle de qualidade de medicamentos esse aspecto não tratará apenas da competitividade do mercado. O próprio tema se justifica, uma vez que a qualidade desses produtos que, ocupam um importante lugar no sistema de saúde sendo utilizado tanto na prevenção, como no tratamento de doenças, tem também um caráter ético, legal e moral. Assim, o não cumprimento das especificações imprescindíveis de um determinado produto pode acarretar em sérias consequências (CASSIANI, 2005).

## 1.3 REGULAMENTAÇÃO

Para garantir que esses produtos cheguem até o consumidor final dentro das especificações mínimas de qualidade foram criadas normas com o objetivo de garantir a eficácia do produto e a segurança do usuário.



Os principais órgãos que estabelecem as normas voltadas à indústria farmacêutica, incluindo a avaliação das práticas adotadas são: a ANVISA, como órgão público nacional e WHO, como entidade internacional, fornecendo uma base técnico-científico de apoio e também a fiscalização para as indústrias nacionais de medicamentos. E para que esses produtos sejam fabricados em conformidade com os padrões internacionais, por meio da ANVISA, o governo define na legislação as orientações e recomendações da WHO, assimilando novos conceitos e assegurando que os produtos destinados à saúde que circulam em território nacional tenham eficácia e qualidade comprovadas (BRASIL, 2010; WHO, 2011).

O regulamento técnico vigente que orienta as ações necessárias em todas as indústrias farmacêuticas do Brasil é determinado pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) de nº 17, publicada em 16 de abril de 2010. Esta RDC trata das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) e preconiza os requisitos básicos a serem adotados na produção, no controle de qualidade e em diversas outras áreas envolvidas na indústria farmacêutica. A resolução enfatiza as atribuições da Garantia da Qualidade nos processos de produção, com objetivo de cumprir as orientações das BPF, que visam diminuir os riscos inerentes à produção farmacêutica (BRASIL, 2010).

#### 1.4 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) são um conjunto de medidas, de caráter obrigatório, que orientam a produção farmacêutica dentro dos padrões de qualidade estabelecidos, de modo a minimizar os riscos inerentes aos processos, os quais não podem ser detectados somente com a realização de ensaios nos produtos finais. Os principais riscos que as BPF abordam são descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Principais riscos evitados pelas BPF

<b>Principais Riscos</b>
Contaminação cruzada
Contaminação por partículas
Troca ou mistura de produto

Fonte: BRASIL, 2010

As BPF estão presentes em todas as atividades envolvidas no processo de fabricação e o fabricante pode optar por metodologias alternativas para acompanhar a evolução tecnológica ou mesmo atender à necessidade específica de um determinado produto, desde que essas metodologias sejam devidamente validadas e corretamente registradas pelo fabricante (NETO, 2010).

Para a fabricação de medicamentos com padrão de qualidade exigido, consequência da adoção das medidas previstas pelas BPF, a produção deve ser realizada em áreas controladas. A limpeza dessas áreas deve ser realizada de forma criteriosa para que a contagem de partículas se mantenha conforme as especificações contidas nas normas vigentes (BRASIL, 2010; ABNT NBR 14644-1, 2005). Diversos fatores podem influenciar a qualidade e a produtividade nessas áreas como: o projeto de engenharia da área, os procedimentos, os equipamentos e os operadores. Estes fatores citados devem ser cuidadosamente planejados e constantemente avaliados para a manutenção da qualidade dos produtos (XAVIER *et al.*, 2013).

Os medicamentos injetáveis devem ter sua produção e métodos de controle de qualidade altamente padronizados, pois são produtos que possuem especificações intrínsecas de pureza e critérios rigorosos devido sua via de administração. É inaceitável qualquer possibilidade de comercialização de um produto de administração parenteral com qualquer tipo de contaminação microbiana, por isso a regulamentação é rigorosa, a fim de garantir a comercialização de produtos eficazes e seguros (WHO, 2011). Os produtos estéreis devem ser processados assepticamente e para a prevenção da circulação de micro-organismos durante o envase. Por isso a carga microbiana

do ambiente e do produto fabricado são extremamente importantes se tratando do nível de qualidade desse produto (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

### 1.5 MONITORAMENTO AMBIENTAL

O monitoramento ambiental é um aspecto importante das BPF, a Resolução 17/2010 descreve que, nas etapas assépticas dos processos de manufatura, o monitoramento deve ocorrer durante todo o processo. Cada etapa da fabricação deve ser realizada em condições ambientais específicas, com a finalidade de minimizar a contaminação do produto, dos operadores, assim como do material utilizado no processamento por partículas e/ou micro-organismos (BRASIL, 2010).

O monitoramento microbiológico de áreas controladas para produção de medicamentos injetáveis e os procedimentos de desinfecção são realizados de modo que a contaminação ambiental seja evitada em todas as etapas de fabricação (WHO, 2011; SBCC, 1997).

O Programa de Monitoramento Ambiental (PMA) de uma instituição de produção farmacêutica deve contemplar as etapas de rotina de todas as áreas envolvidas na produção. Um programa bem elaborado garante uma maior qualidade dos produtos estéreis processados em áreas controladas e sua abordagem deve envolver desde a preparação do material até a liberação dos lotes produzidos (WHO, 2011). Uma série de fatores devem ser considerados para a implementação de um PMA, fatores que devem ser baseados em um estudo de análise de risco formal (FARMACOPEIA EU, 2008).

Um PMA robusto pode fornecer importantes informações sobre a qualidade das áreas controladas, além de fornecer dados que auxiliam a identificação dos problemas existentes ou dos potenciais riscos de contaminação associados aos equipamentos, processos e/ou atividades operacionais (MILLER *et al.*, 2009).

O sucesso do PMA depende de uma metodologia eficaz que proporcione a eficiência das ações programadas, baseando-se no controle do ar, do operador e das superfícies dos equipamentos e utensílios (BRASIL, 2010).

O programa deve estabelecer os níveis de alerta e ação para o monitoramento das áreas controladas. O nível de alerta é definido pelo fabricante, e indica uma variação da condição normal, que, quando ultrapassada, deve gerar um aumento na atenção em relação ao processo. Já o nível de ação, também definido pelo fabricante, quando excedido, demanda uma intervenção imediata, incluindo investigação da causa raiz e ação corretiva. Quando o limite especificado pela RDC 17/2010 é ultrapassado, deve ocorrer a revisão da documentação e investigação efetiva, atendendo assim as exigências da ANVISA e WHO (PINTO *et al.*, 2010).

## 1.6 ÁREAS CONTROLADAS

As áreas controladas são definidas como aquelas em que o controle ambiental é realizado por meio da contagem de partículas viáveis e não viáveis. Estas áreas são projetadas, construídas e utilizadas de forma a diminuir a entrada, a geração e a circulação de partículas contaminantes em seu interior. Para isso, alguns itens devem ser minuciosamente planejados, como desenho de fluxo de pessoal e material, sistema de tratamento de ar, utilidades e qualificação de operadores (BRASIL, 2010).

### 1.6.1 Classificação das áreas

As áreas controladas são classificadas de acordo com a etapa de manufatura de um produto e de suas características, verificando a necessidade de menor ou maior controle de contaminação da área onde esta etapa será processada (BRASIL, 2010).

Essas etapas de produção requerem um determinado nível de limpeza ambiental, de acordo com o processo executado na área “em operação” com a finalidade de minimizar os riscos de contaminação por partículas ou micro-organismos do produto (KRIPPNER, 2010).

Existem diversas normas, legislações e guias de BPF que são normalmente utilizados para a classificação de áreas controladas. Cada documento apresenta uma terminologia e um conceito diferente para a classificação dessas áreas. A designação utilizada pela RDC 17/2010 está baseada na norma de BPF da União Européia e os graus são definidos em A, B, C ou D. As definições de cada grau de classificação estão discriminadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Definição dos graus de classificação das áreas controladas

Grau	Definição da Classificação
<b>A</b>	Zona de alto risco operacional, por exemplo, envase e conexões assépticas. Operações que normalmente devem ser realizadas sob fluxo unidirecional.
<b>B</b>	Áreas circundantes às de grau A para preparações de envase assépticos.
<b>C e D</b>	Áreas limpas onde são realizadas etapas menos críticas na fabricação de produtos estéreis.

Fonte: RDC 17/2010

A classificação de limpeza das áreas controladas é regulada pela norma ABNT NBR 14644-1 – Salas limpas e ambientes controlados associados-Parte 1: classificação da limpeza do ar. Esse documento se refere à análise da concentração de partículas em suspensão no ar dentro de um ambiente controlado, mas sem caracterizar se a partícula é de natureza viável ou não viável (BRASIL, 2005). Não somente a ABNT NBR ISSO 14644-1, mas as BPF descritas na RDC17/2010, o guia da WHO, a Farmacopeia Americana (USP 32) e o *European Union Good Manufacturing Practice* (EU GMP) estabelecem sistemas de classificação para áreas controladas, conforme descreve a Quadro 3.

Quadro 3 - Classificação de áreas controladas quanto a partículas em suspensão no ar.

WHO – BPF	USP 32	ABNT NBR ISO 14644-1	EU GMP
<b>Grau A</b>	Classe 100	ISO 4.8	Grau A
<b>Grau B</b>	Classe 100	ISO 5	Grau B
<b>Grau C</b>	Classe 10.000	ISO 7	Grau C
<b>Grau D</b>	Classe 100.000	ISO 8	Grau D

Fonte: WHO, 2011 (Adaptado pela autora).

A maior preocupação da indústria farmacêutica é com a contagem de partículas viáveis, mais especificamente na produção de injetáveis, onde existe uma preocupação adicional com a contagem de partículas totais. Quanto menor o número de partículas presentes em uma área controlada, menor a probabilidade de introdução de micro-organismos no produto (BRASIL, 2010). A Tabela 1 demonstra os limites recomendados para o monitoramento de partículas viáveis em áreas controladas durante a operação de acordo com as especificações da RDC 17/2010.

Tabela 1 - Limites recomendados para monitoramento de partículas viáveis em áreas controladas durante operação.

<b>Limites recomendados para partículas viáveis</b>				
<b>Grau</b>	<b>Amostragem ativa de ar UFC/m<sup>3</sup></b>	<b>Amostragem passiva de ar (Ø 90mm) UFC/4 horas</b>	<b>Amostragem de superfície (Ø 55mm) UFC/placa</b>	<b>Amostragem de contato operadores UFC/luva</b>
<b>A</b>	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>B</b>	10	5	5	5
<b>C</b>	100	50	25	Não avaliado
<b>D</b>	200	100	50	Não avaliado

Fonte: RDC 17/ 2010 (Adaptado pela autora). Legenda: ø diâmetro da placa

Os limites de aceitação de partículas não viáveis das áreas controladas estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Limites de aceitação de partículas não viáveis.

Grau	Partículas não viáveis			
	Número máximo de partículas permitido/m <sup>3</sup> (repouso)		Número máximo de partículas permitido/m <sup>3</sup> (em operação)	
	Partículas ≥0,5 µm	Partículas ≥5,0 µm	Partículas ≥0,5 µm	Partículas ≥5,0 µm
<b>A</b>	3.520	20	3.520	20
<b>B</b>	3.520	29	352.000	2.900
<b>C</b>	352.000	2.900	3.520.000	29.000
<b>D</b>	3.520.000	29.000	Não avaliado	Não avaliado

Fonte: BRASIL, 2010 (Adaptado pela autora).

A frequência de monitoramento de rotina, segundo o Guia da qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica da ANVISA (BRASIL, 2013), determina que o fabricante pode determinar a frequência da execução do monitoramento ambiental, com exceção das áreas classes A e B. É recomendado também, que seja realizado o monitoramento estático (nas áreas sem operação), a fim de garantir os mesmos níveis de limpeza, quando a área não for utilizada por curtos períodos ou mesmo para verificar a eficácia dos procedimentos de limpeza realizados antes dos processos (BRASIL, 2013).

### 1.6.2 Amostragem

O monitoramento ambiental das áreas controladas é realizado por meio da contagem de partículas totais e/ou contagem de partículas viáveis. A contagem de partículas totais é realizada por um contador eletrônico de

partículas do ar que soma as partículas viáveis e não viáveis do ambiente monitorado (BRASIL, 2010).

A contagem de partículas viáveis do ar nada mais é do que o favorecimento das condições de crescimento de micro-organismos que possam estar presentes nas áreas controladas (Bio-Manguinhos, 2010).

Quatro testes são realizados para verificação das partículas viáveis de um ambiente controlado: a) amostragem ativa do ar; b) amostragem passiva do ar; c) amostragem de contato de superfícies; d) amostragem de contato de operadores (WHO, 2011).

O monitoramento do ar é realizado por dois métodos básicos: amostragem ativa e passiva. O monitoramento ativo é realizado com auxílio de um amostrador de ar, que tem a finalidade de absorver e impactar um volume conhecido de ar do ambiente monitorado por um determinado período. As partículas viáveis do ar depositadas em placas de agar, que são incubadas a temperatura pré-definida a fim de favorecer o crescimento dos micro-organismos. Após o período de incubação as colônias são contadas e registradas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) é expresso como número de UFC por volume de ar amostrado. Já no monitoramento passivo, uma placa contendo meio de cultura é exposta para a sedimentação por gravidade das partículas viáveis do ar e a determinação do número de contaminantes é expressa como número de UFC por placa por tempo (horas) exposto (WHO, 2011; USP 32, 2009; FARMACOPEIA EU, 2008).

A amostragem de contato de superfícies é realizada por meio do contato do meio de cultura em placas tipo *Replicated Organisms Detection and Counting* (RODAC) na superfície em que se deseja analisar. São avaliadas paredes, pisos, superfícies de equipamentos, principalmente as áreas de maior proximidade de contato com o produto, consideradas as áreas mais críticas e, áreas adjacentes (DI 3970, 2010). Para amostragem de superfícies irregulares são utilizadas hastes flexíveis com pontas de algodão estéril (*swabs*), onde o material é coletado e semeado diretamente em placas, pode-se também preparar uma suspensão ou diluição e realizar o plaqueamento utilizando-se meios de cultura apropriados (WHO, 2011).

Desde a década de 1950, quando foram desenvolvidas as primeiras áreas controladas, denominadas como salas limpas, sabe-se que as pessoas



são a principal fonte carreadora de contaminantes (RAMSTORP, 2008). Segundo o guia da WHO, os operadores podem ser as principais fontes de contaminação ao produto, bem como, às superfícies e equipamentos. A amostragem de contato dos operadores é realizada do mesmo modo como é feita a amostragem de contato de superfícies. O monitoramento de contato dos dedos das luvas de ambas as mãos torna-se um importante teste para avaliar essa possibilidade (WHO, 2011).

Nas áreas e em processos onde a proximidade com o produto e as atividades dos operadores podem ser consideradas críticas, outras localizações na vestimenta também podem ser amostradas (WHO, 2011). Estima-se que o corpo humano é capaz de gerar de cinco a dez milhões de fragmentos de pele, cabelo, sujeira e partículas do vestuário por minuto, assim os operadores são considerados a maior fonte de contaminação em uma área controlada (ANGHEL & CHETWYND, 2002). Desta forma, os procedimentos de desinfecção devem ser rigorosamente realizados, inspecionados e avaliados, bem como o operador que realiza o procedimento deve ter ciência da sua conduta e ser devidamente capacitado (IES, 1998).

## 1.7 MICRO-ORGANISMOS E O AMBIENTE INDUSTRIAL

Em ambientes controlados e certificados existem diversos fatores que limitam a presença e a proliferação microbiana. Nessas áreas ocorre um constante controle da umidade e da temperatura, rigorosos procedimentos de limpeza e manutenção são adotados, o sistema de ar é equipado com filtros *High Efficiency Particulate Air* (HEPA) são mantidos em baixos níveis de nutrientes e partículas no ar. Por isso, as instalações de indústrias, os centros cirúrgicos e as áreas controladas de hospitais são considerados ambientes “extremos” em se tratando de sobrevivência microbiana (CRAWFORD, 2005; VENKATESWARAN, 2001; FAVERO *et al.*, 1966).

Entretanto, muitos micro-organismos são capazes de se adaptar e crescer em ambientes com baixa oferta de nutrientes, colonizando superfícies de metal, vidro, entre outras. Estes micro-organismos são denominados

oligotróficos e podem causar muitos problemas de contaminação, deterioração e incrustação tanto na indústria alimentícia, biofarmacêutica, de microcomponentes e em estações espaciais (NAGARKAR *et al.*, 2001; WAINWRIGHT *et al.*, 1993). No trabalho publicado por Nagarkar e colaboradores (2001), foi descrito um número considerável de bactérias oligotróficas em unidades de produção farmacêutica. Porém, estes microorganismos não apresentaram crescimento em meios de cultivo tradicionais.

Na indústria biofarmacêutica, a contaminação inclui além dos microorganismos anteriormente citados, agentes patogênicos ou enzimas que podem degradar o produto, levando à perda do lote, interferindo na segurança do produto ou mesmo comprometendo a sua eficácia (UTESCHER *et al.*, 2007). Os riscos acima citados demonstram a importância do monitoramento das diversas etapas do processo produtivo e a prevenção da contaminação microbiana (ONADIPE, 2007).

Segundo a RDC 17/2010, os micro-organismos isolados em ambientes controlados, de matérias-primas, água e/ou produtos farmacêuticos devem ser identificados a fim de auxiliar a investigação da fonte de contaminação de produtos. Os métodos microbiológicos convencionais recomendados pelas Farmacopéias Americana (USP) e Européia estão limitados por diversos fatores como: variação da resposta biológica dos micro-organismos, crescimento lento de algumas culturas, técnica de análise fastidiosa, o que compromete o tempo e a eficiência do processo produtivo. Já o FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda o uso de métodos genotípicos na identificação de contaminantes, devido à maior precisão quando comparado aos métodos fenotípicos, incluindo os bioquímicos (FDA, 2004). Em contrapartida, esses métodos exigem o crescimento prévio dos micro-organismos em meios de cultivo, o que não é adequado para micro-organismos fastidiosos (USP 32, 2009).

Dentre os principais micro-organismos contaminantes em áreas de produção controladas podem ser citadas as bactérias e os fungos, os quais compreendem um importante grupo de micro-organismos amplamente presentes na natureza e tem impacto em diversos campos de interesse (PINTO *et al.*, 2010).

## 1.8 FUNGOS

Os fungos foram considerados como pertencentes ao reino dos vegetais até 1969, quando foi proposta por Whittaker uma nova classificação, com cinco reinos e agrupando os fungos ao Reino Fungi. Com o avanço das ferramentas moleculares um novo sistema de classificação foi proposto por Woese e colaboradores (1990) que inclui um nível acima dos reinos, domínio. Portanto, os organismos estão atualmente organizados em três domínios: Bacteria, Archaea e Eucaryota, agrupando os fungos aos demais organismos eucariotos.

Os fungos são organismos ubíquos, amplamente distribuídos no ar, no solo, em ambientes aquáticos, nos vegetais, no homem, nos animais, insetos, entre outros (BLACKWELL, 2011). Apresentam-se na forma de leveduras, bolores e cogumelos. Estes são eucariotos quimioheterotróficos, uni ou multicelulares. (LACAZ *et al.*, 2002). Aproximadamente 100.000 espécies de fungos foram descritas (KIRK *et al.*, 2008), mas estima-se a possibilidade da existência de 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 1991).

Sua reprodução é complexa, pois algumas espécies podem utilizar mais de uma forma de propagação, a reprodução sexuada (fungos teleomorfos) ou assexuada (fungos anamorfos). Os fungos anamórficos podem ter sua fase sexuada não descrita até o momento, ou até mesmo tê-la perdido (DEACON, 2006; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). A nomenclatura oficial utilizada por um longo período foi dual para os diferentes estágios sexuais, mas o Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas resultou na mudança para um nome por espécie (SAMSON *et al.*, 2014; HAWKSWORTH, 2011).

A classificação dos fungos é extremamente dinâmica e sucessivas redefinições ocorrem continuamente. As mudanças dos esquemas taxonômicos, bem como a discussão da adoção de apenas um nome, evitando nomes diferentes para os estados de fungos anamorfos e teleomorfos tornam a identificação e classificação dos fungos menos complexa (HAWKSWORTH, 2011).

### 1.8.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos compreendem a maioria pertencente ao Reino Fungi, formados por uma rede de hifas, que em conjunto formam o micélio, cuja função é vegetativa e reprodutiva. Apresentam parede celular constituída por quitina ou celulose, ou ambas (TORTORA *et al.*, 2012; MADIGAN *et al.*, 2010).

As células germinativas produzidas por meio da reprodução assexuada são os conídios, que estão amplamente presentes no ar atmosférico, sendo esse hábitat seu meio de dispersão mais utilizado. Os fungos que se reproduzem desta forma são denominados anamórficos e tem capacidade de se disseminar e de colonizar facilmente diversos locais. Assim, dificilmente podemos encontrar um ambiente livre de contaminação fúngica, pois além da facilidade de dispersão pelo ar, os fungos suportam ainda grandes variações de temperatura, pH e umidade. A incidência das espécies vai variar de acordo com a localidade, estação do ano, umidade do ar, entre outros (TORTORA *et al.*, 2012; MADIGAN *et al.*, 2010; LACAZ *et al.*, 2002; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

#### 1.8.1.1 Gênero: *Aspergillus*

Espécies de *Aspergillus* são encontradas em todo o mundo em vários habitats. São consideradas clinicamente importantes, pois estão relacionados a processos alérgicos, infecções oportunistas, fitopatologias e contaminação alimentar pela produção de metabólitos tóxicos. Além disso, muitos são utilizados em processos biotecnológicos importantes, em medicamentos e alimentos (KLICH, 2002).

O gênero *Aspergillus* é um anamórfico pertencente à Família Trichocomaceae, Ordem Eurotiales, Subclasse Eurotiomycetidae, Classe Eurotiomycetes, Filo Ascomycota. Com a mudança para apenas um nome por espécie, a Comissão Internacional de *Aspergillus* e *Penicillium* revisou as

espécies aceitas para o gênero, que passou a ter 339 representantes (SAMSON *et al.*, 2014). Anteriormente eram aceitos 184 nomes anamórficos e 70 nomes teleomórficos associados, com base nas características morfológicas (PITT *et al.*, 2000).

Sua reprodução é assexuada é caracterizada pela presença de uma estrutura chamada conidióforo, tendo sua parte superior dilatada, em forma de vesícula, na qual se encontram os conídios, as estruturas reprodutivas aderidas às fiáldes. Outra característica do gênero é a presença da célula podal, estrutura que sustenta o conidióforo. Muitas espécies de *Aspergillus* apresentam telemorfos associados (KONEMAN & ALLEN, 2008; KLICH, 2002).

#### 1.8.1.2 Gênero: *Penicillium*

Outro grupo amplamente presente em diversos ambientes, o gênero *Penicillium* tem atuação em diferentes setores, incluindo ambiental, agricultura, saúde e biotecnologia, sendo de grande importância e impacto econômico para o homem. Apesar dos representantes desse gênero ter importante impacto ambiental por serem decompositores de compostos orgânicos, causam grandes destruições em plantações agrícolas e produzem uma grande variedade de micotoxinas. Por outro lado, algumas espécies têm ampla atuação na indústria alimentícia e de medicamentos (REFAI *et al.*, 2015; VISAGIE *et al.*, 2014).

O gênero pertence à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes, filo Ascomycota. Após a adoção de apenas um nome por espécies, a atualização do número de representantes do gênero foi realizada, o que resultou em 354 espécies (VISAGIE *et al.*, 2014).

O gênero tem representantes que apresentam colônias granulares, em diversas nuances de verde e amarelo-acastanhada. A característica microscópica mais marcante é a presença do “penicilo” (escova), uma

ramificação do conidióforo em sétulas primárias e fiálides secundárias, nos quais são produzidos conídios em cadeias (KONEMAN & ALLEN, 2008).

#### 1.8.1.3 Gênero: *Cladosporium*

O gênero *Cladosporium* é também amplamente distribuído na natureza, sendo muito citado em avaliações de ambientes e relacionado a alergias e problemas respiratórios, apesar de não serem relatadas espécies potencialmente patogênicas. Algumas espécies são patógenas de plantas, parasitas de outros fungos e podem ser encontrados no solo, ar, em obras de arte, tecidos, materiais orgânicos, entre outros (KONEMAN & ALLEN, 2008; CROUS *et al.*, 2007).

Por serem um gênero cosmopolita, agente de deterioração, comumente isolados do ar e muitas vezes causadores de impacto ambiental e econômico, diversas áreas tem interesse no estudo desse grupo (BENSCH *et al.*, 2012). Considerado um dos gêneros mais heterogêneos o grupo engloba mais de 772 nomes (DUGAN *et al.*, 2004).

Estes fungos possuem crescimento moderadamente lento, são muito comuns em locais úmidos e as colônias possuem textura aveludada de cor verde-oliva escuro a negro (KONEMAN, 2008).

#### 1.8.2 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, tipicamente esféricos ou ovais. A maioria se reproduz assexuadamente por mitose, muitos por brotamento (KONEMAN, 2008).

Assim como os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente disseminadas na natureza e amplamente utilizadas no ramo da biotecnologia, indústria de alimentos, controle biológico de pragas, entre outros. Mas também

muito relacionadas com a microbiologia clínica, em casos de infecções (TORTORA *et al.*, 2012).

### 1.9 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Para a identificação de micro-organismos exigentes e/ou de crescimento lento, os métodos tradicionais de identificação fenotípica são difíceis e demorados, sendo a interpretação dos resultados um tanto subjetiva e por muitas vezes, a identificação é inconclusiva (ALDRIDGE *et al.*, 1977). A variabilidade fenotípica entre representantes da mesma espécie resulta em algumas cepas com características incomuns para uma identificação fidedigna. Diversos laboratórios em todo o mundo têm desenvolvido ferramentas para uma identificação fenotípica precisa, rápida e de baixo custo de isolados de diversas fontes, da clínica médica, veterinária, amostras ambientais de várias regiões geográficas. No entanto, um número muito elevado de isolados permanece sem identificação após aplicação de diversas metodologias fenotípicas disponíveis (DRANCOURT *et al.*, 2000).

Atualmente, a maioria dos métodos de identificação de micro-organismos utilizados nas indústrias farmacêuticas é baseada na caracterização fenotípica, que tem como base as atividades metabólicas e o aspecto morfológico dos isolados. Os diferentes ambientes em que os micro-organismos se encontram alteram essas características, o que acarreta uma extensa variabilidade. Consequentemente, esses métodos requerem testes complementares para obtenção de uma identificação fidedigna (SHERABA *et al.*, 2010).

Enfrenta-se uma grande dificuldade ao se identificar micro-organismos isolados de amostras ambientais, pois esses contaminantes sofrem estresse ambiental, o que gera variações biológicas. Consequentemente, esses micro-organismos apresentam características bioquímicas/genéticas diferentes daquelas detectadas em micro-organismos isolados de amostras clínicas. Com isso, essas características podem gerar resultados inconclusivos ou equivocados, visto que a base de dados dos métodos de identificação está

calcada em resultados gerados a partir de espécimes oriundos de laboratórios clínicos (PINTO *et al.*, 2010).

Os contaminantes isolados de ambientes industriais não têm sua diversidade microbiana muito estudada. Cada unidade de produção apresenta uma microbiota autóctone diversa, impedindo a comparação entre as diferentes áreas (PINTO *et al.*, 2010). Além disso, poucos estudos são publicados retratando a microbiota autóctone de ambientes industriais, tornando ainda mais difícil a comparação desses resultados (GEBALA & SANDLE, 2013; SANDLE, 2011).

### 1.9.1 Métodos fenotípicos

A grande maioria dos sistemas de identificação bioquímica comercializados foi desenvolvida inicialmente, para isolados da clínica médica. Posteriormente, a indústria alimentícia e atualmente a indústria farmacêutica e de cosméticos passaram a utilizá-los como recurso na identificação. No entanto, ainda existem lacunas nas bases de dados para importantes micro-organismos específicos (PINTO *et al.*, 2010).

#### 1.9.1.1 Morfológico

O método convencional de identificação de fungos filamentosos é baseado nas características da cultura e nas estruturas de reprodução. As chaves de identificação foram construídas mediante as observações dos aspectos macroscópicos e microscópicos desses micro-organismos. A caracterização morfológica é uma importante etapa da identificação e a partir dos detalhes observados em condições específicas (meios de cultivo, temperatura, tempo de crescimento, entre outras) é possível, por meio das chaves de identificação, chegar ao táxon ao qual o isolado pertence. E essas observações são subjetivas, pois os aspectos biológicos são complexos e variam de acordo com as condições em que o fungo é cultivado. Além disso, a



correta identificação com base na morfologia requer muito tempo e expertise dos analistas (SIMÕES *et al.*, 2013).

#### 1.9.1.2 *Bioquímico*

Os testes bioquímicos são bastante comuns dentre os métodos de identificação fenotípicos. Suspensões de células são submetidas a reações bioquímicas por meio de substratos fornecidos e reagentes utilizados. Assim, após a utilização de determinados nutrientes, os micro-organismos apresentam reações específicas que são interpretados por sistemas automatizados ou manuais (PINTO *et al.*, 2010).

O sistema VITEK 2 Compact<sup>®</sup> (BioMérieux) é um sistema de identificação bioquímica automatizado utilizado para a identificação de bactérias e leveduras.

Os bancos de dados, de micro-organismos de interesse clínico, estão bastante consolidados e têm sido aperfeiçoados ao longo do tempo, com a implementação de novas ferramentas e dados (PINTO *et al.*, 2010).

#### 1.9.1.3 *MALDI-TOF MS*

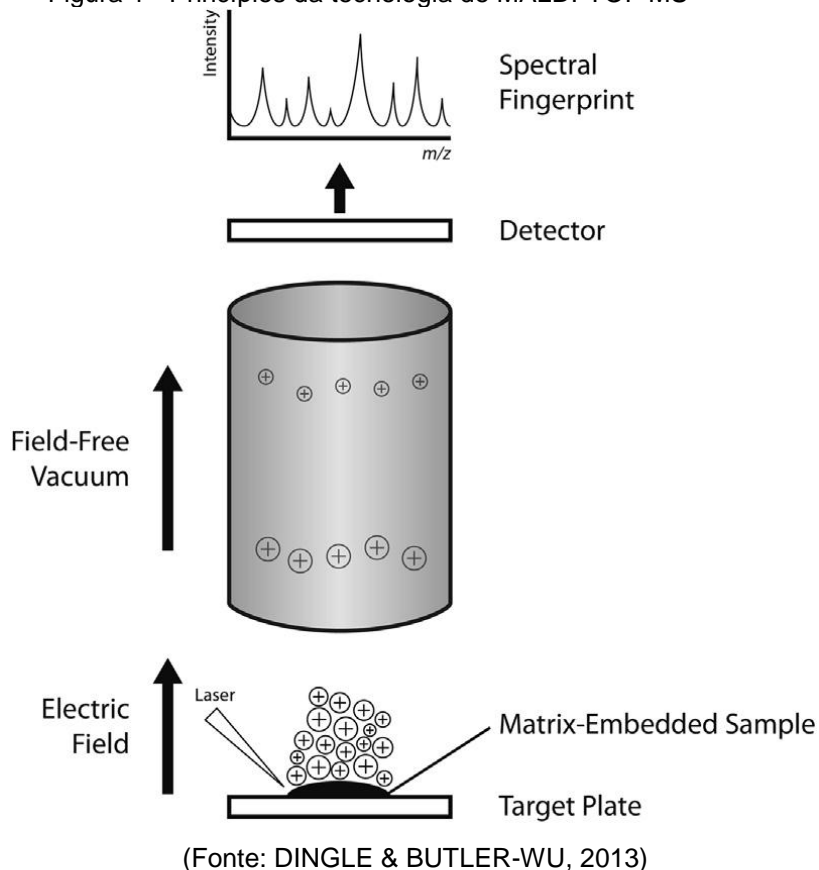
A espectrometria de massas começou a ser aplicada na identificação de micro-organismos nos anos 1970 (ANHALT & FENSELAU, 1975). Diversas abordagens da técnica de ionização de grandes biomoléculas foram desenvolvidas desde então, mas a técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, cuja sigla em inglês é MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, sigla TOF (do inglês *Time of flight*) tornou-se uma ferramenta extremamente utilizada em estudos de proteômica, caracterização de biomoléculas, entre outras. (ASSIS *et al.*, 2011; TANAKA *et al.*, 1988).

A matriz de natureza ácida ajuda a romper as células e consequente extração das proteínas; separa as moléculas que estão aderidas; absorve a energia do laser, provocando a dessorção das moléculas (transferência do estado sólido da amostra em placa para o estado gasoso) e transferem íons de carga positiva para as partículas (TANAKA *et al.*, 1988).

O equipamento é composto por três unidades principais: 1) a fonte de íons que permite a ionização e a dessorção das moléculas; 2) o analisador de massa, que permite a separação dos íons de acordo com a relação massa/carga ( $m/z$ ) e 3) o dispositivo de detecção dos íons separados (DE CAROLIS *et al.*, 2013; CROXATTO *et al.*, 2012).

As amostras são preparadas com a mistura do micro-organismo a ser analisado (ex. colônias de bactérias, fungos ou leveduras) com a matriz diretamente na placa metálica. Após a cristalização da amostra e da matriz o pulso de laser, com comprimento de onda próximo do UV incide sobre cada poço (*spot*). A energia do laser é absorvida pela matriz, levando a dessorção e a ionização da amostra para fase gasosa. Os íons com carga positiva são acelerados sob a influência de um campo elétrico para dentro de um tubo de vácuo, no qual possui um detector em sua extremidade. O tempo de voo é utilizado para calcular a massa das partículas analisadas, representadas em picos de espectro de massa (DE CAROLIS *et al.*, 2013; DINGLE & BUTLER-WU, 2013; CROXATTO *et al.*, 2012). A Figura 1 demonstra os princípios da tecnologia (DINGLE & BUTLER-WU, 2013).

Figura 1 - Princípios da tecnologia de MALDI-TOF MS



A abordagem proteômica é uma alternativa aos métodos genotípicos, sendo a tecnologia MALDI-TOF/MS uma das mais promissoras para a quimiotaxonomia de micro-organismos, por reduzir significativamente o tempo de análise da amostra (FENSELAU, 2013; Van VEEN *et al*, 2010; LAY JR., 2001). Esse aspecto é de extrema importância na indústria farmacêutica, pois a avaliação de uma amostra em menor tempo possível resulta na diminuição do *holding time* de um produto e maior controle dos riscos envolvidos no processo, permitindo intervenções imediatas com ações corretivas e embasando o processo decisório quanto ao processamento e destino do lote (PINTO *et al*, 2010).

Uma das maiores vantagens do uso do MALDI-TOF/MS destacada é a redução no tempo de identificação de uma grande variedade de micro-organismos, como bactérias, fungos e vírus. Diversos estudos ressaltam que o desenvolvimento da técnica revolucionou a identificação de micro-organismos por ser um método fácil, rápido, de alto rendimento e baixo custo (CROXATTO *et al*, 2012; BIZZINI & GREUB, 2010; FENSELAU & DEMIREV, 2001).

O desempenho da técnica com amostras bacterianas na área clínica tem resultado em identificação correta em nível de espécie entre 80-95% dos isolados, comparados a testes bioquímicos convencionais e análises de sequencia de genes 16S rRNA (BIZZINI *et al.*, 2011; Van VEEN *et al.*, 2010; CHERKAOUI *et al.*, 2010).

Além disso, apenas uma pequena fração da colônia é utilizada para se obter a identificação diretamente da placa do micro-organismo, sem a necessidade de repiques para várias placas ou meios de cultura diferentes em condições específicas e diversas, a fim de obter massa suficiente para os testes nos métodos morfológicos e bioquímicos tradicionais. A quantidade de insumos e reagentes necessários para a realização da técnica é inferior àqueles utilizados pelos outros métodos fenotípicos, incluindo os bioquímicos, o que acarreta redução do custo da identificação. Outras vantagens que podem ser destacadas são a eliminação de testes complementares, a técnica é simples para capacitação e treinamento de analistas (TEKIPPE & BURNHAM, 204; CHERKAOUI *et al.*, 2010).

Embora diversos estudos apontem o sucesso na aplicação do MALDI-TOF/MS na identificação de micro-organismos, essa ferramenta apresenta limitações, sendo necessária a constante atualização das Bases de Dados com espectros bem caracterizados ao nível de espécie, ou seja, os espectros de referência, principalmente de espécies estreitamente relacionadas, necessitam de uma consistente inclusão nos banco de dados para uma correta identificação (SENG *et al.*, 2009).

O bom desempenho do MALDI-TOF/MS na identificação de leveduras comumente isoladas em laboratório clínico é demonstrado em diversos estudos (PANDA *et al.*, 2015; DE CAROLIS *et al.*, 2014; BILLE *et al.*, 2011; DHIMAN *et al.*, 2011; BIZZINI *et al.*, 2010; MARKLEIN *et al.*, 2009; QIAN *et al.*, 2008).

Estudos realizados para obtenção da relação de custo/ benefício na identificação de leveduras de interesse clínico, demonstrou que a identificação por MALDI-TOF/MS resultou em 96% a 93% de identificação correta ao nível de espécie, comparada a testes bioquímicos (IRIART *et al.*, 2012; DHIMAN *et al.*, 2011).

Essa metodologia também tem apresentado bons resultados na identificação de fungos filamentosos de interesse clínico, tais como os

pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (HETTICK (a) *et al.*, 2008), *Penicillium* (HETTICK (b) *et al.*, 2008) e *Fusarium* (SEYFARTH ., 2008).

Com mais de 20 anos de desenvolvimento da técnica do MALDI-TOF, é indiscutível o potencial da metodologia não somente para diagnóstico de amostras da clínica médica e veterinária (DE CAROLIS *et al.*, 2013), mas também na área de fitopatologia e botânica (REP *et al.*, 2002), estudos epidemiológicos e de classificação taxonômica (CROXATTO *et al.*, 2012), biotecnologia e indústria farmacêutica (FENSELAU & DEMIREV, 2001), assim como controle de qualidade em coleções de cultura (BECKER (a) *et al.*, 2014).

Nas metodologias de MALDI-TOF/MS atualmente estabelecidas, existe a necessidade do crescimento microbiano em meios de cultivo, da mesma forma que os métodos fenotípicos e genotípicos. Alguns questionamentos ainda devem ser elucidados em relação ao conteúdo de informação que pode ser obtido por meio da análise de um perfil de espectros de massas. Porém, os dados obtidos podem ser considerados complementares àqueles obtidos por meio das outras técnicas de identificação de micro-organismos. Este método apresenta-se como um dos poucos capazes de avaliar, detectar e mensurar modificações bioquímicas em resposta a estresses ambientais, condições nutricionais, tempo de cultivo, entre outros (LAY JR., 2001).

### 1.9.2 Métodos genotípicos

Os avanços na biologia molecular permitiram a utilização das técnicas em diversas áreas, inclusive para a detecção de patógenos e identificação de micro-organismos, em geral. Dentre os métodos existentes no mercado, pode ser citado o MicroSeq (*AppliedBio System*), que consiste num sistema de sequenciamento dos genes RNA ribossomal de fungos e bactérias. O sistema realiza uma Reação em Cadeia Polimerase (PCR) com a utilização de um *primer* universal (PINTO *et al.*, 2010).

A introdução das metodologias genotípicas, dentre as ferramentas de identificação polifásica – considerando a morfologia, aspectos bioquímicos, caracterização de moléculas diversas, entre outras abordagens – permitiu a

revisão dos grupos taxonômicos e o reposicionamento filogenético e descrição de novas de espécies em diversos gêneros (SIMÕES *et al.*, 2013).

#### 1.10 PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS E ESTRUTURAÇÃO DA MICOTECA

Tendo em vista a constante utilização de cepas de micro-organismos em experimentos, tanto de pesquisa quanto desenvolvimento tecnológico, há necessidade de mantê-los e preservá-los em coleções de culturas (SOLA *et al.*, 2012).

Existem atualmente diversas metodologias de preservação de micro-organismos, com objetivos de preservação de curto, médio e longo prazo. Porém, não se pode considerar somente a viabilidade do micro-organismo. A escolha do método de preservação também é importante para evitar a ocorrência de variabilidades ou mutações que alteram as características básicas do isolado original. Portanto, a metodologia de preservação considerada ideal é aquela que mantém o micro-organismo viável, sem alterações das suas características fenotípicas e genotípicas originais e livre de contaminação (HOMOLKA, 2013; SOLA *et al.*, 2012; OECD, 2007).

A manutenção das culturas em óleo mineral é uma das metodologias mais simples que existem. Consiste na aplicação de uma camada de óleo mineral esterilizado sobre a cultura, com a finalidade de limitar o oxigênio disponível, reduzindo assim o metabolismo e a taxa de reprodução do micro-organismo (HAYNES *et al.*, 1955). Costa e colaboradores (2009) ressaltam como desvantagens da técnica a possibilidade de contaminação, instabilidade genética, dificuldades de esterilização e manuseio do óleo mineral.

A técnica de preservação em água destilada estéril, descrita pela primeira vez por Castellani (1967), consiste no armazenamento do micro-organismo em solução salina ou água destilada estéril e ocorre com a transferência de blocos de ágar contendo o isolado para um tubo e posterior adição da solução de água. O armazenamento ocorre em temperatura ambiente, sendo esta técnica indicada para preservação de micro-organismos

sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas (SOLA *et al.*, 2012). Embora a técnica tenha baixo custo e alta reprodutibilidade, assim como a preservação em óleo mineral, os riscos de contaminação são altos e ocorre também a instabilidade genotípica de alguns micro-organismos comprometendo a preservação do isolado (APARECIDO *et al.*, 2007).

O congelamento comum é uma das técnicas amplamente utilizadas atualmente e consiste na preservação do micro-organismo em temperatura relativamente baixa, entre -4 °C e -20 °C. Sendo uma metodologia simples, de baixo custo e segura para o armazenamento dos isolados por períodos de alguns meses até dois anos (TORTORA *et al.*, 2011). Portanto, uma desvantagem destacada sobre o método é a redução da viabilidade de alguns micro-organismos em função de danos ocorridos nas células pela formação de cristais de gelo e também em decorrência da variação eletrolítica na faixa de temperatura (HOMOLKA, 2013).

A fim de reduzir o estresse físico e químico em decorrência do congelamento e do degelo das células e reduzir os possíveis danos causados pelo processo, são utilizados os agentes crioprotetores. Dentre os agentes crioprotetores, há aqueles que atuam intracelularmente, como o glicerol e dimetilsulfóxido; e aqueles que atuam extracelularmente, como sacarose, glicose, sorbitol, entre outros (SOLA *et al.*, 2012).

Apesar do desenvolvimento de diversas metodologias de preservação de micro-organismos, o princípio do congelamento-descongelamento se mantém entre os mais viáveis e utilizados na manutenção de coleções de cultivo (COSTA *et al.*, 2009). A criopreservação compreende a manutenção das culturas a baixas temperaturas, a -80°C em freezers, e a ultrabaixas temperaturas, a -140 °C em *containers* de nitrogênio líquido (HOMOLKA, 2013; SOLA *et al.*, 2012, OECD, 2007).

A técnica de liofilização é considerada uma das mais eficientes para a preservação de micro-organismos. A técnica baseia-se na retirada rápida da água intracelular das culturas congeladas, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo, capazes de provocar sérios danos à célula. Uma das técnicas mais utilizadas na manutenção de coleções biológicas, pois atende a exigência principal de preservação que é a manutenção das características genéticas e fisiológicas do micro-organismo (SELWAL *et al.*, 2011).

As entidades que determinam as diretrizes que as coleções de culturas devem seguir são: *World Federation for Culture Collections* (WFCC) e a *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD). Ambos os guias institucionais, em uma das suas recomendações, por questões de segurança, é de sempre que possível manter os isolados preservados em pelo menos dois procedimentos diferentes, garantindo sempre a viabilidade, pureza e identidade da cepa (WFCC, 2010; OECD, 2007).



## 2 RELEVÂNCIA / JUSTIFICATIVA

A caracterização de fungos é extremamente importante para o conhecimento da microbiota ambiental. A utilização de fungos, seus metabólitos e outros produtos secundários são extensamente utilizados pelo homem, com importante relevância econômica e ambiental. O universo fúngico é muito extenso e ainda há muito que ser estudado.

Além da importância na conclusão das análises microbiológicas de produtos farmacêuticos em áreas de produção, a identificação de contaminantes ao nível de espécie é uma exigência normativa, indispensável para o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e nas investigações efetivas da fonte dos contaminantes isolados no controle microbiológico de Bio-Manguinhos.

A implementação das técnicas, novas metodologias e protocolos referentes à identificação de fungos terá uma aplicação imediata na rotina de identificação de contaminantes da SEPIN, solucionando as atuais dificuldades associadas à carência de métodos adequados para este propósito, e ainda propondo um método rápido e eficaz, como MALDI-TOF/MS.

Além de atender às exigências da legislação vigente, a identificação precisa de fungos resultará na obtenção de lotes-semente de cepas autóctones, as quais serão utilizados como padrões secundários no teste de promoção de crescimento de meios de cultivo e nas validações inerentes às diversas etapas do processo produtivo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Caracterizar fenotipicamente os fungos isolados da Seção de Esterilidade, Processos e Insumos (SEPIN) e implementar os métodos na rotina de identificação de contaminantes deste laboratório.

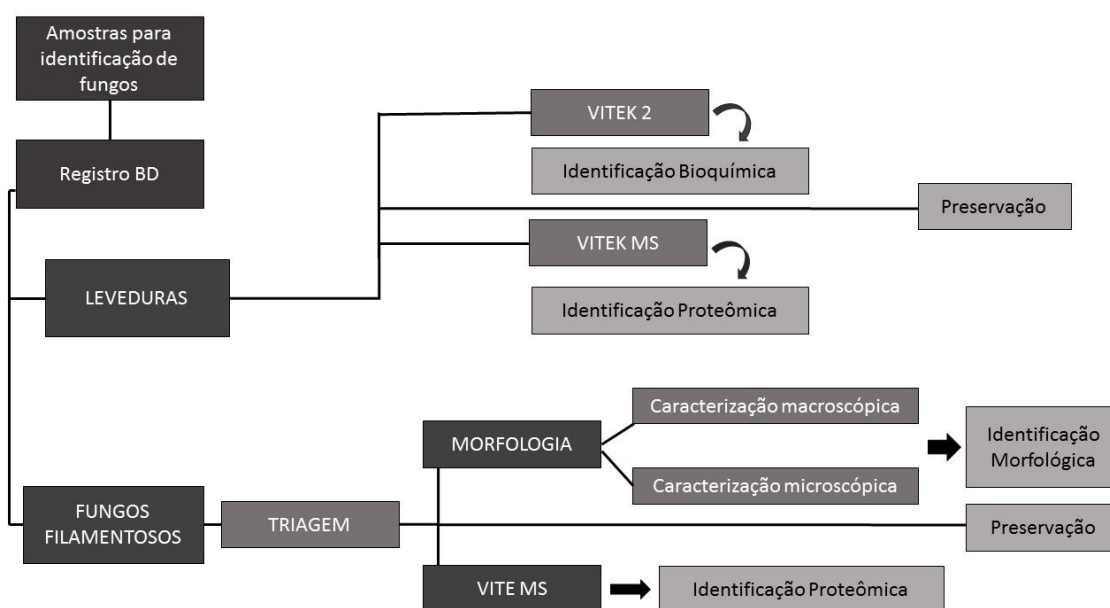
#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Selecionar fungos filamentosos e leveduras isolados pela Seção de Esterilidade, Processos e Insumos no período de fevereiro de 2012 a novembro de 2013;
- 3.2.2 Estruturar um banco de dados com as informações dos fungos isolados;
- 3.2.3 Caracterizar morfológicamente os fungos filamentosos para identificá-los;
- 3.2.4 Caracterizar os perfis proteômicos dos fungos filamentosos e das leveduras por MALDI-TOF/MS para identificá-los;
- 3.2.5 Realizar a identificação bioquímica das leveduras pelo sistema VITEK 2 Compact;
- 3.2.6 Comparar os resultados obtidos pelos métodos fenotípicos citados acima;
- 3.2.7 Avaliar a presença dos isolados identificados no banco de dados SARAMIS;
- 3.2.8 Preservar os isolados fúngicos identificados e estruturar a micoteca;
- 3.2.9 Elaborar documentos (Instruções de trabalhos) relacionados à implementação da prática de identificação fúngica no Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico.

## 4 METODOLOGIA

A metodologia referente às atividades realizadas para a caracterização e preservação dos fungos filamentosos e leveduras, descrita abaixo, foi esquematizada por meio do fluxograma apresentado na Figura 1.

Figura 2 - Fluxograma das atividades realizadas para a caracterização e preservação dos fungos filamentosos e leveduras

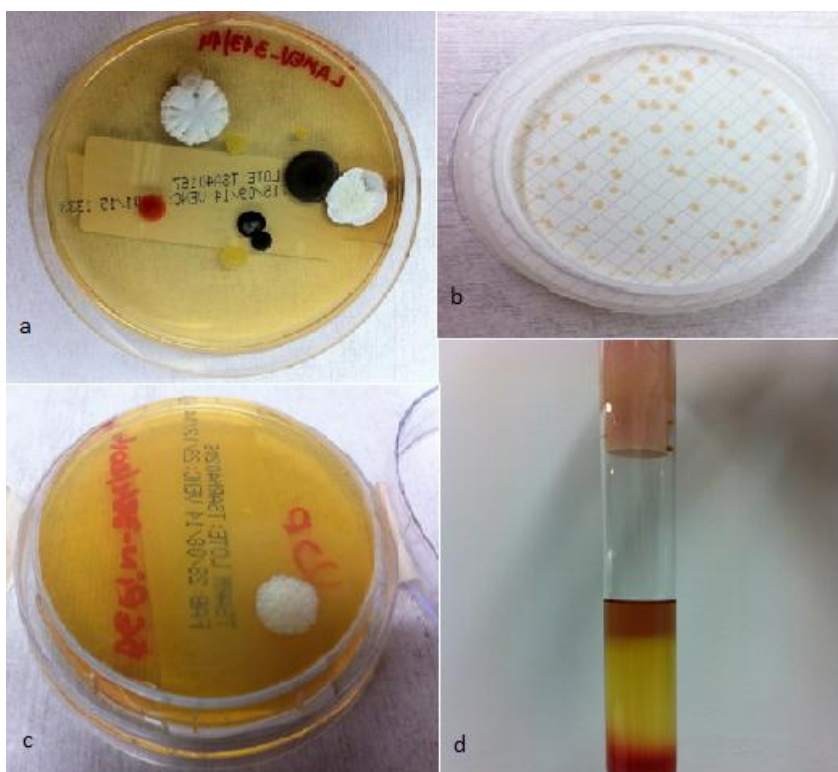


### 4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

As cepas fúngicas utilizadas no presente trabalho foram obtidas a partir das placas de amostragens enviadas à Seção de Esterilidade, Processos e Insumos (SEPIN) para a identificação de contaminantes, no período de fevereiro de 2012 a novembro de 2013. As amostragens são realizadas em placas de Petri ou RODAC (*Replicate Organism Detection and Counting*), e são oriundas dos procedimentos de Monitoramento Ambiental de áreas controladas

e de Monitoramento de Águas, ou frascos oriundos dos testes de Esterilidade (Figura 2). O meio de cultura utilizado nas placas do Monitoramento Ambiental foi o Agar Tripticase de Soja (TSA), enquanto nas placas do Monitoramento de Águas foi usado o Agar Padrão de Contagem (PCA). Os isolados obtidos do teste de Esterilidade utilizando Caldo Caseína foram reisolados em placas de Agar Sangue de Carneiro a 5% (AS). Todos os meios de cultura utilizados foram da marca BioCen e aprovados nos ensaios de Promoção de Crescimento (Bio-Manguinhos, 2014).

Figura 3 - Amostras recebidas pela SEPIN



Legenda: a) placa de monitoramento do ar; b) placa de monitoramento das águas; c) placa de monitoramento de superfície ou operador; d) tubos oriundos do teste de esterilidade. Fonte: Imagem obtida pela própria autora.

A contagem do número de colônias semelhantes observadas em cada placa de amostragem foi realizada e registrada. Sendo que para o isolamento, apenas colônias diferentes, com base em coloração e tamanho, foram

selecionadas, por ser inviável a identificação de todas as colônias coletadas, conforme Figura 3.

Figura 4 - Placa de monitoramento onde são observadas colônias filamentosas semelhantes e a seleção de uma delas como representativa deste grupo



Fonte: Imagem obtida pela própria autora.

#### 4.2 ESTRUTURAÇÃO DE UM BANCO DE DADOS PARA AS INFORMAÇÕES REFERENTES AOS FUNGOS ISOLADOS

Cada colônia isolada recebeu uma numeração sequencial em uma planilha Excel, sendo este número precedido de L (para leveduras) ou F (para fungos filamentosos). Um Banco de Dados foi construído com os dados para garantir a rastreabilidade dos isolados identificados (Quadro 5). Foi registrado também o número de colônias semelhantes observadas no mesmo material e suas características morfológicas (descrição macroscópica da colônia em placas de TSA ou AS).

Quadro 4 – Dados registrados dos isolados fúngicos no Banco de Dados (planilha Excel)

Nº Cepa	Nº REGISTRO LACOM	Data do Processo	Solicitação de Análise	Local de isolamento	Material de isolamento	Produto
---------	-------------------	------------------	------------------------	---------------------	------------------------	---------

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS PELO SISTEMA VITEK 2 COMPACT® E PELO SISTEMA VITEK MS RUO® (BIOMÉRIEUX)

#### 4.3.1 Reisolamento

As leveduras foram reisolados em placas de AS e incubadas em estufa a 30-35 °C por até cinco dias, sendo realizadas leituras diárias para acompanhamento do crescimento das colônias. Após o crescimento, uma colônia isolada de cada placa foi repicada para outra placa de AS e incubada em estufa a 30-35 °C por 48 horas. Após o período de incubação, as cepas foram submetidas a identificação pelos sistemas VITEK 2 Compact (fenotípico, bioquímico) e VITEK MS RUO (fenotípico, proteômico), segundo instruções do fabricante.

#### 4.3.2 Identificação bioquímica pelo sistema VITEK 2 Compact

Para a identificação pelo VITEK 2 Compact, foi utilizado o cartão YST, destinado a identificação de fungos leveduriformes, contendo 46 substratos desidratados para avaliação de perfil bioquímico.

Para tal, foi preparada uma suspensão em três mL de solução salina (Air Life 0,45% Sodium Chloride – CareFusion) em um tubo de ensaio de acrílico a partir de cada isolado, observando a faixa de turvação preconizada pelo fabricante (de 1,8 a 2,2). A turvação da suspensão foi verificada pelo aparelho DensiCheck plus, segundo instrução do fabricante. Cada suspensão foi

associada a um cartão YST e os pares formados (suspensão e cartão) foram introduzidos no aparelho, sendo a leitura dos resultados efetuada após 24 horas.

#### 4.3.3 Identificação proteômica pelo sistema VITEK MS RUO

Na identificação pelo VITEK MS RUO, cada isolado foi analisado em duplicata. A partir de cada cultivo, foi transferido, com auxílio de uma alça bacteriológica descartável e estéril, uma pequena porção do crescimento colonial para a confecção de um esfregaço em um dos poços de uma lâmina descartável, conforme instruções do fabricante. Em cada esfregaço, foi depositado um microlitro da matriz CHCA (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico). Este procedimento foi realizado para todas as amostras, sendo realizado em duplicata. As lâminas preparadas foram introduzidas no aparelho (MALDI-TOF/MS) e a amostra foi submetida a sucessivos disparos de laser, segundo parâmetros pré-estabelecidos pelo fabricante. Os resultados obtidos foram perfis de espectros de massa, que foram comparados com os perfis do banco de dados do SARAMIS, para o fornecimento de um resultado de identificação associado a um nível de confiança. Esse nível de confiança é verificado pelo sistema através do pareamento do espectro analisado com os espectros contidos no banco de dados.

Foram utilizadas linhagens de referência a fim de garantir uma identificação acurada comparando os perfis de referência com os perfis dos isolados autóctones.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

O isolamento e a identificação dos fungos filamentosos foram realizados no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

As cepas dos fungos filamentosos foram isoladas em tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca contendo meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA - DIFCO) inclinado e posteriormente identificado em nível de gênero e em alguns casos em nível de espécie por meio da observação das características macro e microscópicas, em meios de cultura específicos, com base na literatura pertinente (KLICH, 2002; PITT, 2000; ELLIS, 1971; RAPER & FENNEL, 1965).

##### 4.4.1 Triagem inicial

O repique dos tubos de ensaio foi realizado para placas de Petri contendo PDA para observação das características morfológicas, aspectos macroscópicos das colônias (verso e reverso) e observação das culturas em lâmina direta, realizando uma triagem, separando os gêneros mais frequentes.

As estruturas de reprodução foram observadas por meio de microscópio óptico nas objetivas com aumento de 100X, 200X, 400X e 1000X, com a utilização do corante lactofenol azul-algodão (MERCK) sobre lâmina de vidro, para a qual uma pequena quantidade da cultura foi transferida, com o auxílio de uma alça de inoculação previamente esterilizada. Uma lamínula foi colocada com cuidado sobre a preparação, evitando a formação de bolhas de ar.



#### 4.4.2 Preservação dos gêneros mais frequentes

Após a etapa de triagem inicial, as cepas foram preservadas temporariamente em tubos de ensaio contendo PDA sob óleo mineral em temperatura ambiente, para posterior identificação das espécies.

#### 4.4.3 Reisolamento e identificação das espécies

A reativação das cepas foi realizada por uma seqüência de três repiques sucessivos, com intervalos de 07 dias, em tubos de ensaio com meio de cultura PDA. No terceiro repique foram preparadas lâminas para confirmação de viabilidade e pureza dos isolados, conforme descreve Klich (2002).

As etapas subsequentes para identificação dos isolados foram a caracterização macroscópica e microscópica

##### 4.4.3.1 *Caracterização macroscópica*

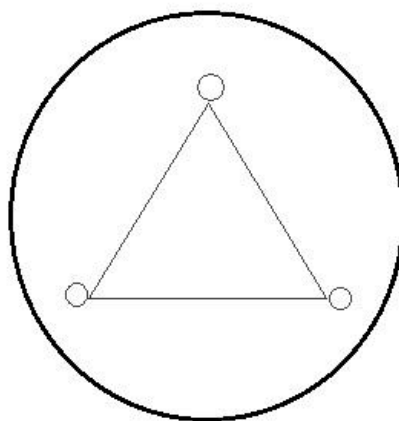
Para a caracterização macroscópica, foram observadas as características da superfície da colônia, incluindo coloração (verso e reverso), taxa de crescimento, presença de pigmentos e/ou exudato, utilizando os meios de cultura específicos para as cepas selecionadas.

As cepas foram submetidas à técnica de ponto de inoculo (Figura 4), utilizando os meios de cultura Extrato de Levedura Czapek Agar (CYA – DIFCO) nas temperaturas de 25 °C e 37 °C, Extrato de Malte Agar (MEA – DIFCO) na temperatura de 25 °C e PDA – DIFCO na temperatura de 25 °C, sendo as placas incubadas por 07 dias em estufa, segundo Klich (2002) e Pitt (2000).

A técnica consiste em inocular um fragmento da cultura em um ponto central do agar com a placa de Petri virada para baixo, evitando que mais de

uma colônia se desenvolva no meio de cultura específico para a cepa selecionada. Após vedar as placas com parafilme, essas foram incubadas na posição invertida, pelo período e temperatura indicados para o gênero em questão. Uma ficha de identificação para cada cepa foi emitida, seguindo os roteiros de observação e caracterização estabelecidos pela literatura, onde as características macroscópicas observadas foram registradas.

Figura 5 –Esquema da técnica de ponto de inóculo, pela qual o isolado é inoculado em três pontos equidistantes para permitir observação morfológica das colônias.



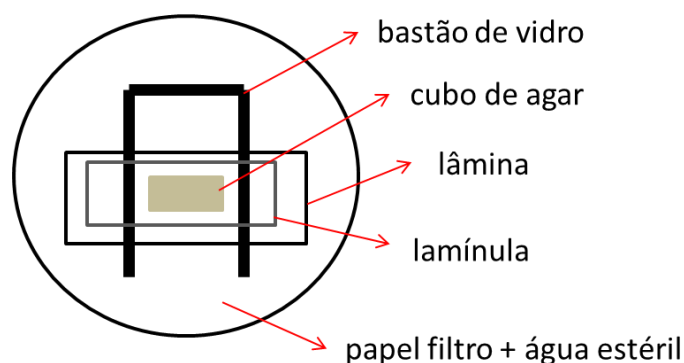
Fonte: Imagem elaborada pela própria autora

#### 4.4.3.2 *Caracterização microscópica*

Com intuito de melhor observação das características microscópicas dos isolados utilizou-se a técnica de micro cultivo em lâmina onde o fungo é inoculado em um pequeno bloco de agar, sobre lâmina de vidro, formando uma câmara úmida (Figura 5). Assim, o fungo cresce em direção a superfície do vidro e as estruturas reprodutivas intactas são transferidas para a lâmina, podendo-se observar com maior riqueza de detalhes o micélio vegetativo e as estruturas de reprodução.

Em uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro, o fundo é forrado com papel de filtro, e coloca-se um bastão de vidro em “U”, duas lâminas e duas lamínulas. Após montagem e esterilização, é cortado um pequeno quadrado do meio de cultura, com aproximadamente  $0,5\text{cm}^2$  e colocado no centro de cada lâmina, apoiada sobre o bastão em “U”. Nos quatro cantos do bloco de agar é inoculada uma pequena porção do material e coberto com a lamínula. Em seguida coloca-se aproximadamente 2mL de água destilada estéril no fundo da placa para garantir a umidade e evitar o ressecamento do meio de cultivo. As placas são incubadas em estufa a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  pelo tempo determinado para cada gênero conforme descreve a literatura (RIDDEL, 1950).

Figura 6 - Placa para técnica de microcultivo em lâmina



Fonte: Imagem elaborada pela própria autora

Durante a incubação a cultura foi observada a cada dois dias, para garantir que os níveis de umidade se fossem mantidos, evitando o ressecamento. No momento do preparo das lâminas, o crescimento foi inativado com um pouco de algodão embebido em uma solução de formaldeído a 10% por uma hora. Com o auxílio de uma pinça estéril, a lamínula foi retirada com cuidado, para não danificar as estruturas, e colocada em uma lâmina limpa com uma gota de corante lactofenol azul-algodão. O bloco do meio de cultura foi removido utilizando uma alça de inoculação previamente esterilizada, com cuidado para que o meio não fosse arrastado sobre a lâmina e

fragmentasse as estruturas. Uma gota do corante foi adicionada na região de crescimento e uma lamínula colocada por cima (RIDDELL, 1950).

As lâminas de cultivo foram observadas ao microscópio óptico, nas objetivas com aumento de 400X e 1000X, seguindo o roteiro de observação e caracterização estabelecidas pelas literaturas de referência. Foram feitas 50 medições das estruturas de reprodução (conidióforo, métula, vesícula, fiálides, conídios) para se chegar a uma média de cada estrutura (KLICH, 2002; PITT, 2000; ELLIS, 1971; RAPER & FENNEL, 1965).

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS PELO SISTEMA VITEK MS RUO (BIOMÉRIEUX)

Para a caracterização dos fungos filamentosos pelo sistema VITEK MS RUO (BioMérieux) foram testados protocolos diferentes, incluindo o protocolo do próprio sistema VITEK MS RUO (BioMérieux) e outro utilizado na Micoteca da Universidade do Minho em Portugal (MUM).

O sistema VITEK MS apresenta protocolo padronizado para análise do gênero *Aspergillus*. Neste protocolo, uma porção da cultura é pré-tratada em um tubo contendo ácido trifluoracético e a matriz utilizada no preparo do *spot* é a CHCA. Na MUM, os isolados de fungos filamentosos são analisados por MALDI-TOF MS utilizando diversos protocolos, inclusive também utilizam outro tipo de matriz (Ácido 2,5 dihidroxibenzóico – DHB), além da CHCA. E os dados são processados e analisados pelo software SARAMIS, assim como neste estudo (comunicação pessoal Cledir Santos). Nesta instituição, um dos protocolos consiste na mistura do isolado com a matriz DHB em um tubo e no subsequente processo mecânico de ruptura de parede celular (maceração). Em seguida, uma alíquota é transferida para o *spot* e então submetida à identificação (comunicação pessoal Cledir Santos).

Para avaliar se o protocolo sugerido pelo fabricante era o que apresentava melhor desempenho, foram testadas variações dos protocolos denominados BioMérieux (protocolo para representantes de *Aspergillus* do

fabricante, com uso de ácido Trifluoracético – TFA) e Maceração (protocolo no qual a amostra é macerada em um tubo), com uso das matrizes CHCA e DHB. Ademais, o uso de pérolas de vidro para facilitar a ruptura da parede celular e consequente liberação do conteúdo citoplasmático também foi avaliado. Dessa forma, foi avaliada inicialmente a matriz utilizada (DHB ou CHCA) mantendo o protocolo BioMérieux, que contempla o uso de TFA e culturas de 48 horas, e o uso de pérolas de vidro. Para realizar esta avaliação, o gênero *Aspergillus* foi escolhido, por ter um protocolo específico. Foram selecionados 10 isolados autóctones da espécie que apresentava o maior número de representantes identificados que foi *A. versicolor*. Ademais, a cepa de referência INCQS 40028 (ATCC 16853) também foi processada junto às autóctones nesta avaliação.

Para excluir a possibilidade do preparo inadequado do *spot*, os isolados foram analisados em quadruplicata para cada variação de protocolo testado.

Com base em uma avaliação prévia, foi escolhido o protocolo BioMérieux (pré-tratamento da cultura do isolado em TFA), com ligeira maceração (uma adaptação do protocolo Maceração) e uso da matriz CHCA.

Todos os 385 isolados identificados pela morfologia foram submetidos à identificação proteômica pelo sistema VITEK MS RUO, utilizando o protocolo de preparo de amostras descrito acima, mesmo sendo este destinado ao gênero *Aspergillus*. O tempo de cultivo dos isolados foi de 48 horas, com exceção dos isolados do gênero *Cladosporium*, que foi de cinco dias.

Posteriormente, foram selecionados 10 isolados autóctones identificados até espécie como *A. versicolor* pela caracterização morfológica e uma cepa de referência de *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853) adquirida na Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz, para comparação do perfil de referência com os perfis dos isolados autóctones. Nessa etapa, foi analisado também o tempo de crescimento dos isolados (realizados em quadruplicata com dois, três, quatro, cinco, seis e sete dias de crescimento em estufa à temperatura de 22,5 °C).

A partir de placas de PDA com a cultura de cada isolado com crescimento a 22,5 °C em estufa, uma pequena porção foi transferida para tubos contendo 50 microlitros (µL) de ácido trifluoracético (TFA), deixando em temperatura ambiente por 30 minutos após agitação. Foram adicionados 450µL de água destilada estéril e distribuídos com auxílio de uma micropipeta

calibrada, o volume de um microlitro ( $\mu\text{L}$ ) para os poços da lâmina modelo Flexi-Mass-DS TO-430 (BioMérieux).

Após secagem do inóculo na lâmina, foi adicionado um microlitro ( $\mu\text{L}$ ) de solução matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (VITEK MS-CHCA, BioMérieux). Na posição G3 e G4 da lâmina foram realizados esfregaços a partir de placas de Agar Sangue de Carneiro a 3% (AS) (BioCen) com cultura de 24h à 35 °C da cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 (cepa utilizada no controle de qualidade da análise e como calibrador do equipamento, seguindo às recomendações do fabricante), também coberta por um  $\mu\text{L}$  de solução matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (VITEK MS-CHCA, BioMérieux).

Após secagem do inóculo e cristalização da matriz, as lâminas foram introduzidas no equipamento VITEK MS (MALDI-TOF/MS, modelo AXIMA, Kratos/Shimadzu), equipado com um laser de nitrogênio que opera a 337 nanômetros (nm) e utilizando o software Launchpad versão 2.9.3, 2011. Os espectros foram adquiridos em modo positivo linear, com uma voltagem de aceleração de + 20 kV, em uma faixa de massas de 2000 a 20000 (m/z). Os resultados obtidos foram analisados pelo software SARAMIS Premium (Database version 4.09 e System version 3.5.1.3, 2010).

#### 4.6 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS E ESTRUTURAÇÃO DA MICOTECA

As cepas fúngicas obtidas no estudo foram preservadas com o intuito de estruturar uma micoteca da SEPIN.

##### 4.6.1 Leveduras

As leveduras foram criopreservadas em criotubos contendo um mL de caldo Infusão Cerebro Coração (BHI, BioCen) com 20% de glicerol (v/v), em

freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , um dos métodos recomendados pelos Guias da WFCC e OECD (WFCC, 2010; OECD, 2007).

#### 4.6.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos foram mantidos em duas formas de preservação distintas, uma de curto prazo em geladeira, e outra em longo prazo  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , um dos métodos recomendados pelos Guias da WFCC e OECD (WFCC, 2010; OCDE, 2007).

##### 4.6.2.1 *Geladeira*

Alguns discos da colônia do fungo filamentoso crescido em PDA foram cortados e transferidos para criotubos um mililitro (mL) de água destilada estéril. Os criotubos foram armazenados à temperatura de geladeira (2 a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

##### 4.6.2.2 *Freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$*

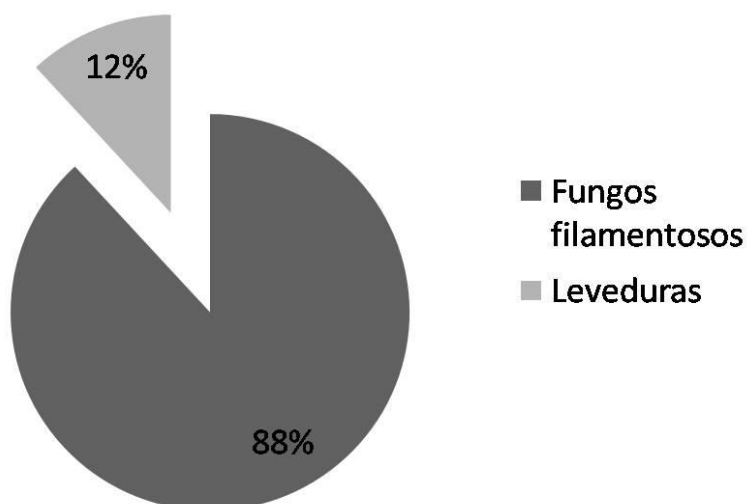
Porções da colônia crescidas em PDA foram suspensas em 10% de glicerol em água destilada estéril e distribuídos em criotubos (um mL), para o armazenamento em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AMOSTRAS E SELEÇÃO DOS ISOLADOS

Durante o período de fevereiro de 2012 a novembro de 2013 foram recebidas 214 placas de amostragem para identificação dos fungos. Destas placas foram selecionadas e registradas no banco de dados (planilha Excel) um total de 453 colônias de fungos filamentosos e 61 leveduras, totalizando 514 cepas registradas e utilizadas no presente trabalho (Figura 6).

Figura 7 - Percentual de fungos filamentosos e leveduras isoladas para identificação no período de 2012/2013



### 5.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DAS LEVEDURAS

Até recentemente, a SEPIN não realizava a identificação dos fungos (fungos filamentosos ou leveduras), sendo o resultado liberado como “Fungo



filamentoso” ou “Levedura” por ausência de metodologias que permitissem a identificação do espécime analisado. Com a aquisição do sistema VITEK 2 Compact, foram introduzidos os cartões referentes à identificação bacteriana (cartões BCL, GP e GN). Entretanto, a compra de cartões para leveduras (cartões YST) não havia sido solicitada, por uma baixa demanda de identificação destes fungos pelo laboratório. Com o intuito de avaliar o grau de concordância entre as metodologias utilizadas, foram obtidos 34 cartões YST (gentilmente cedidos pelo Instituto Vital Brazil) que foram utilizados para esta comparação.

Em virtude do número de cartões, foram escolhidos isolados representantes dos diferentes tipos de colônia observados nas placas de cultivo. Dos 61 isolados representantes das leveduras, 30 foram submetidos à identificação fenotípica pelos dois métodos utilizados: sistema VITEK 2 Compact (bioquímico) e VITEK MS RUO (proteômico).

Além dos isolados da rotina, foram utilizadas quatro cepas de referência disponíveis da Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/Fiocruz: *Candida guilliermondii* INCQS 40037 (ATCC 6260), *Candida orthopsilosis* INCQS 40304 (ATCC 96139), *Rhodotorula mucilaginosa* INCQS 40157 (ATCC 64684) e *Trichosporon inkin* INCQS 40269 (ATCC 18020) para avaliação da acurácia dos resultados apresentados pelos dois métodos de identificação. Os resultados obtidos das análises das 34 leveduras (30 isolados autóctones e quatro cepas de referência) estão representadas no Quadro 5.

Quadro 5 - Comparação dos resultados pelos dois métodos testados com nível de confiança

N° Cepa	Resultado Vitek 2	Nível de Confiança	Resultado Vitek MS	Nível de Confiança
L11	<i>Candida parapsilosis</i>	95%	<i>Candida parapsilosis</i>	99,9%
L12	<i>Trichosporon inkin</i>	88%	NÃO IDENTIFICADO	-
L14	<i>Trichosporon inkin</i>	89%	NÃO IDENTIFICADO	-
L15	<i>Trichosporon inkin</i>	89%	NÃO IDENTIFICADO	-
L16	<i>Candida parapsilosis</i>	94%	NÃO IDENTIFICADO	-
L20	<i>Candida orthopsilosis</i>	94%	<i>Candida orthopsilosis</i>	85%
L23	Low Discrimination* <i>Trichosporon inkin</i> / <i>Cryptococcus neoformans</i>	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L25	NÃO IDENTIFICADO	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L26	<i>Candida parapsilosis</i>	96%	<i>Candida parapsilosis</i>	99,9%
L27	<i>Candida guilliermondii</i>	99%	<i>Pichia guilliermondii</i>	99,9%
L34	Slashline** <i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i> / <i>Cryptococcus laurentii</i>	-	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99,9%
L37	<i>Candida guilliermondii</i>	98%	<i>Pichia guilliermondii</i>	99,9%
L38	NÃO IDENTIFICADO	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L39	<i>Candida pulcherrima</i>	87%	NÃO IDENTIFICADO	-
L42	Slashline** <i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i> / <i>Cryptococcus laurentii</i>	-	<i>Exophiala</i> sp.	99,9%
L45	<i>Trichosporon asahii</i>	97%	<i>Trichosporon asteroides</i>	90,2%
L46	<i>Trichosporon asahii</i>	99%	<i>Trichosporon asteroides</i>	99,5%
L47	Low Discrimination* <i>Candida lipolytica</i> / <i>norvegensis</i>	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L49	<i>Rhodotorula minuta</i>	98%	NÃO IDENTIFICADO	-
L50	Slashline** <i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i> / <i>Cryptococcus laurentii</i>	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L51	Slashline** <i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i> / <i>Cryptococcus laurentii</i>	-	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99,9%
L52	NÃO IDENTIFICADO	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L53	NÃO IDENTIFICADO	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L54	Slashline** <i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i> / <i>Cryptococcus laurentii</i>	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L56	Slashline** <i>Candida sake</i> / <i>famata</i> / <i>lipolytica</i>	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L58	<i>Candida parapsilosis</i>	95%	<i>Candida orthopsilosis</i>	75,1%
L62	Slashline** <i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i> / <i>Cryptococcus laurentii</i>	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L63	NÃO IDENTIFICADO	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L64	NÃO IDENTIFICADO	-	NÃO IDENTIFICADO	-
L65	Slashline** <i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i> / <i>Cryptococcus laurentii</i>	-	NÃO IDENTIFICADO	-

Continuação Quadro 5 - Comparação dos resultados pelos dois métodos testados com nível de confiança

N° Cepa	Resultado Vitek 2	Nível de Confiança	Resultado Vitek MS	Nível de Confiança
<i>Candida guilliermondii</i> INCQS 40037 (ATCC 6260)	<i>Candida guilliermondii</i>	97%	<i>Candida guilliermondii</i>	96,2%
<i>Candida orthopsilosis</i> INCQS 40304 (ATCC 96139)	<i>Candida parapsilosis</i>	94%	<i>Candida orthopsilosis</i>	84,2%
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> INCQS 40157 (ATCC 64684)	Slashline** <i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i> / <i>Cryptococcus</i> <i>laurentii</i>	-	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	82,3%
<i>Trichosporon inkin</i> INCQS 40269 (ATCC 18020)	<i>Trichosporon inkin</i>	93%	<i>Trichosporon inkin</i>	99,9%

Legenda: Low Discrimination\* Baixa discriminação de resultado. Slashline\*\* Testes adicionais para diferenciar as opções de identificação dos micro-organismos.

### 5.2.1 Resultados das cepas de referência (leveduras) submetidas à identificação pelos sistemas VITEK 2 e VITEK MS RUO

Das quatro cepas de referência submetidas aos dois métodos de identificação fenotípica, todas (100%) foram identificadas corretamente pelo sistema VITEK MS RUO (Quadro 5). Dos resultados do sistema VITEK 2 Compact, uma cepa foi equivocadamente identificada em nível de espécie, porém com gênero correto (*Candida orthopsilosis* identificada como *C. parapsilosis*). Ademais, para a cepa *Rhodotorula mucilaginosa*, a identificação pelo sistema VITEK 2 constou como *Slashline* (*Rhodotorula glutinis/mucilaginosa/ Cryptococcus laurentii*), que sugere a realização de provas complementares para a conclusão da identificação.

Para algumas espécies do gênero *Candida*, há relatos na literatura sobre a dificuldade na diferenciação pelos métodos bioquímicos tradicionais e muitas vezes a conclusão da identificação requer uso de métodos moleculares (PANDA *et al.*, 2015; DE CAROLIS *et al.*, 2014).

A comparação dos resultados da identificação bioquímica e proteômica por MALDI-TOF MS na identificação de leveduras foi descrita em alguns trabalhos, porém somente com espécimes clínicos. Kim e colaboradores (2014), relataram um estudo com 28 leveduras isoladas a partir de hemoculturas, que foram identificadas como *C. famata* (N=25), *C. famata/C. guilliermondii* (N=2) e *C. guilliermondii* (N=1) pelo sistema bioquímico VITEK 2 Compact. Posteriormente, todos os isolados foram submetidos à análise proteômica por MALDI-TOF MS e sequenciamento de genes utilizando 28S rRNA e ITS. O resultado do sequenciamento de genes apresentou de 98% a 100% de similaridade com a espécie *C. guilliermondii* para todos os 28 isolados do estudo. Os resultados da identificação por MALDI-TOF MS, comparado aos do sequenciamento de genes, apresentaram maior número de resultados concordantes: 21 isolados (75%) foram identificados como *C. guilliermondii*. O VITEK 2 Compact identificou somente um isolado como pertencente a esta espécie (KIM *et al.*, 2014).

Outros trabalhos corroboram o sucesso do desempenho do sistema VITEK MS quando comparado com o sistema VITEK 2 na identificação de leveduras oriundas da clínica médica (CHAO *et al.*, 2014; CHARNOT-KATSIKAS *et al.*, 2014; IRIART *et al.*, 2012). No presente trabalho, o desempenho do sistema VITEK MS RUO também foi superior na identificação das quatro cepas de referência (100%) em relação ao sistema VITEK 2 Compact, que só identificou corretamente duas cepas.

#### 5.2.2 Resultados dos isolados de leveduras autóctones submetidas à identificação pelos sistemas VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO

Dos 30 isolados autóctones submetidos aos dois sistemas de identificação (Quadro 5), 14 (46,67%) foram identificadas pelo VITEK 2 Compact e 11 (36,67%) pelo VITEK MS RUO. Este resultado, quando

comparado aos obtidos na identificação das quatro cepas de referência, foi inesperado, uma vez que o VITEK MS RUO identificou todas as cepas de referência avaliadas e o VITEK 2 Compact apenas duas (Quadro 6). Este resultado também é discordante daqueles obtidos em outros estudos como mencionado acima. Mesmo quando comparado com outro sistema de identificação por MALDI TOF MS (Bruker Biotyper), o VITEK 2 Compact apresentou menor número de identificações de leveduras (PUTIGNANI *et al.*, 2011; VAN VEEN *et al.*, 2010). Ainda quanto a comparação dos dois métodos, seria interessante a identificação destas leveduras por sequenciamento de genes conservados de importância taxonômica, para que os sistemas fossem avaliados a partir de isolados autóctones de identificação previamente conhecida obtida por método genotípico. Com base na literatura disponível, este é o primeiro relato da comparação entre os dois métodos de identificação fenotípica (bioquímica e proteômica) envolvendo isolados de leveduras oriundos de ensaios de controle de qualidade industrial.

Em relação aos resultados do VITEK 2 Compact, além dos resultados de identificação (onde constavam a espécie e o nível de confiança, sendo este último a qualidade da identificação apresentada), foram obtidos resultados do tipo *Slashline* e *Low Discrimination*. Como já citado anteriormente, um resultado do tipo *Slashline* aponta a necessidade de provas suplementares (não contempladas no cartão de substratos) para a conclusão da identificação. Em geral, resultados deste tipo apresentam duas ou mais opções de espécies com excelente nível de confiança, no entanto o sistema não realiza as provas necessárias para finalizar a identificação. Oito (26,66%) isolados apresentaram resultado do tipo *Slashline* (Quadro 5), sendo sete (23,33%) com a mesma identificação (L34, L42, L50, L51, L54, L62 e L65): com base no perfil bioquímico apresentado, o isolado seria pertencente ao gênero *Rhodotorula* (com duas opções de espécie: *R. glutinis* ou *R. mucilaginosa*) ou ao gênero *Cryptococcus* (sendo da espécie *C. laurentii*). O outro isolado (L56) com resultado *Slashline* apresentou somente um gênero (*Candida*), mas com possibilidade de três espécies (*C. sake*; *C. famata* e *C. lipolytica*). Já o resultado *Low Discrimination* representa baixa discriminação entre as opções do banco de dados (abaixo de 50% de nível de confiança), mas também sugere provas complementares. Dois isolados (L23 e L47) apresentaram

resultado *Low Discrimination* pelo sistema VITEK 2 Compact, sendo 6,67% dos resultados obtidos. Seis isolados (20%) – L25, L38, L52, L53, L63 e L64 não foram identificados por este sistema. Ao todo foram identificados três gêneros pelo sistema VITEK 2 Compact, incluindo *Candida* (oito isolados), *Trichosporon* (cinco isolados) e *Rhodotorula* (um isolado).

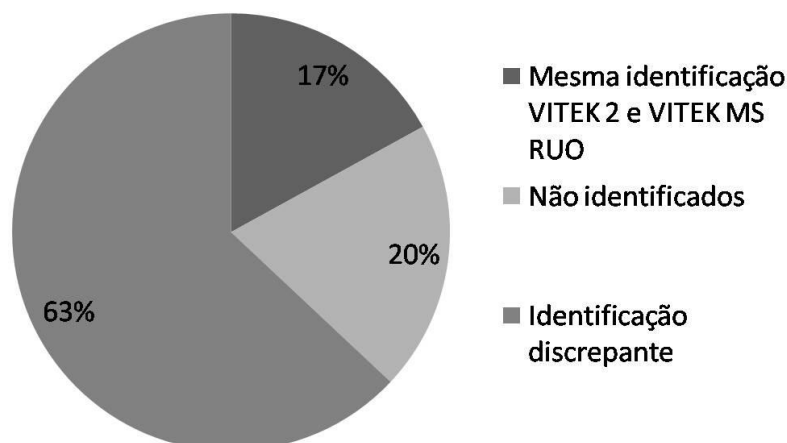
O sistema VITEK MS RUO identificou uma variedade maior de gêneros (Quadro 5): *Candida* (quatro isolados), *Pichia* (dois isolados), *Rhodotorula* (dois isolados), *Trichosporon* (dois isolados) e *Exophiala* (um isolado). O gênero *Pichia* é o estado teleomorfo (forma sexuada) do gênero *Candida* (DESNOS-OLLIVIER *et al.*, 2008; PFALLER *et al.*, 2006). Mesmo considerando os resultados entre estes dois gêneros como sinônimos, ainda assim foram quatro gêneros diferentes identificados pelo VITEK MS RUO, em contraponto com os três identificados pelo VITEK 2 Compact (*Candida*, *Trichosporon* e *Rhodotorula*). Um grande número de isolados (19 isolados, sendo 63,33%) não foi identificado pelo VITEK MS RUO. Como o preparo da amostra a ser analisada por este sistema apresenta grande impacto no resultado (MEDEIROS, 2015; ANAGNOSTEC, 2008), a possibilidade de um preparo inadequado do poço (*spot*) correspondente a cada isolado analisado não pode ser desconsiderada. Entretanto, somente com a repetição da análise dos isolados (em replicata) seria possível avaliar este preparo. No presente trabalho, os 30 isolados de leveduras analisados foram submetidos uma única vez ao VITEK MS RUO. Outra hipótese para a não identificação seria a ausência da variedade proteômica do isolado no banco de dados do SARAMIS (MEDEIROS, 2015).

Na avaliação da concordância de resultados entre os dois métodos testados, apenas cinco isolados (17%) apresentaram concordância de resultados ao nível de espécie e oito isolados (27%) ao nível de gênero. Os desempenhos de ambos os métodos para estes espécimes autóctones isolados em ambientes industriais podem ser considerados muito aquém do esperado, quando comparados aos rendimentos apresentados por outros estudos em espécimes clínicos (GUO *et al.*, 2014; CHAO *et al.*, 2014; CHARNOT-KATSIKAS *et al.*, 2014 ). Em relação ao grau de concordância entre os dois sistemas, Guo e colaboradores (2014), relataram 99,6% entre gênero e 93,37% entre espécies.

Poucos dados são publicados relatando a identificação de leveduras em indústria farmacêutica. A partir de um trabalho realizado com amostras do monitoramento ambiental de áreas controladas de uma unidade de produção farmacêutica no Egito, foram identificadas 21 espécies de bactérias e fungos, utilizando dois métodos bioquímicos. Grande parte dos micro-organismos identificados eram bactérias, sendo que as leveduras representaram somente 1,3% dos micro-organismos identificados (ASHOUR *et al.*, 2011). Este autor evidenciou a presença de isolados do gênero *Candida*. No presente trabalho, este gênero constou como o de maior número de isolados de levedura identificados (Quadro 5), com 10 das 30 leveduras submetidas ao sistema VITEK 2 Compact e seis das 30 identificadas pelo VITEK MS RUO. Como já citado anteriormente, *Pichia guilliermondii* é o estado teleomorfo (forma sexuada) da *Candida guilliermondii*. Dessa forma, todos os resultados envolvendo esses gêneros foram considerados em concordância.

A maioria das cepas avaliadas no presente trabalho apresentou resultados discordantes: 19 (63%) das 30 cepas avaliadas. Estes isolados devem ser futuramente sequenciados para garantir uma identificação fidedigna e para então permitir a posterior análise comparativa das três metodologias. Os seis isolados (20%) não identificados por nenhum dos métodos (Figura 7) também serão submetidos posteriormente à identificação por sequenciamento de genes conservados. Este procedimento permitirá a identificação do espécime analisado e a incorporação desta variedade no banco de dados do SARAMIS, com inserção de espectros de referência autóctones.

Figura 8 - Identificação das leveduras pelos dois sistemas testados



Como já mencionado, diversos trabalhos publicados evidenciam o excelente desempenho do MALDI-TOF MS na identificação de leveduras isoladas de pacientes clínicos. A análise de leveduras clinicamente importantes mostrou que 92,5% (247/250) teve sua identificação confirmada, pelo sequenciamento de genes 26S rRNA, incluindo cepas pertencentes à *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces* spp., *Trichosporon* spp., *Geotrichum* spp., *Pichia* spp. e *Blastoschizomyces* spp. (MARKLEIN *et al.*, 2009). Pinto e colaboradores (2011) também relataram o sucesso na capacidade de identificação por MALDI-TOF MS de leveduras de referência e isolados clínicos. Inclusive os resultados referentes ao grupo *C. parapsilosis* complex - *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, cuja identificação dependia até então de métodos moleculares para separação das espécies, pois é inviável pela bioquímica, obtiveram resultados satisfatórios. Outras espécies de leveduras clinicamente importantes (N=88) foram identificadas com alta confiabilidade (100% identificação correta, comparando com o seqüenciamento de genes, em nível de gênero e espécie (PANDA *et al.*, 2015).

Embora diversos trabalhos demonstrem o sucesso da identificação da grande maioria dos isolados clínicos pelo MALDI-TOF MS, ainda se observa discrepância entre os resultados obtidos por testes bioquímicos e moleculares de alguns grupos específicos, acredita-se que as atualizações dos bancos de



dados são importantes (DE CAROLIS *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2013). Alguns trabalhos indicam que a principal limitação da metodologia é a disponibilidade do espectro de referência no banco de dados (PANDA *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2011). Este é um aspecto importante a ser observado, uma vez que para haver êxito na identificação de um micro-organismo, a diversidade esperada deve estar contemplada no banco de dados utilizado. A falha na identificação de bactérias isoladas em ambiente industrial utilizando o VITEK MS RUO já foi relatada (MEDEIROS, 2015) e a ausência de representatividade das variedades proteômicas dos isolados submetidos ao VITEK MS RUO no banco de dados do SARAMIS foi o determinante para a obtenção de resultados não identificados. No presente estudo, 19 isolados (63,33%) não foram identificados pelo VITEK MS RUO (Quadro 6) e a ausência desta representatividade no banco de dados pode ser uma das causas da não identificação por este sistema.

### 5.2.3 Análise do banco de dados SARAMIS (leveduras)

Foi realizada a avaliação do banco de dados do software SARAMIS Premium (*Spectral Archiving and Microbial Identification System* - BD/SARAMIS) em relação aos gêneros e às espécies identificadas no presente trabalho a partir do VITEK 2 Compact, com o intuito de obter evidências para compreender o motivo do grande número de ausência de identificação destes isolados no sistema VITEK MS RUO.

Nos arquivos do BD/SARAMIS referentes ao gênero *Candida*, foram encontradas 1388 referências (SuperSpectras - SS e Espectros de Referência - ER), divididas em 47 arquivos de espécies e dois arquivos de resultados entre duas espécies. Dentre os gêneros tratados no presente trabalho (*Candida/Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Exophiala*), este foi o que apresentou o maior número de referências no BD/SARAMIS, sendo considerado o melhor representado. As quatro espécies identificadas pelo VITEK 2 Compact (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. pulcherrima*) foram contempladas no BD/SARAMIS. As espécies *C.*

*parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, e *C. pulcherrima* estavam alocadas no arquivo do gênero *Candida* e apresentaram 105, 19 e duas referências, respectivamente. A espécie *C. guilliermondii* não estava alocada no arquivo do gênero *Candida*. Entretanto, o arquivo do gênero *Pichia* constava no BD/SARAMIS (com 76 referências) e apresentava oito pastas de espécies e uma pasta de resultados entre espécies, estando à espécie *P. guilliermondii* presente como uma das pastas. Como estes gêneros são sinônimos, foi considerado que a espécie *C. guilliermondii* estava contemplada e representada no BD/SARAMIS. Dos quatro isolados identificados como *C. parapsilosis* (L11, L16, L26 e L58) pelo VITEK 2 Compact, dois apresentaram resultado similar no VITEK MS RUO (L11 e L26). O isolado L16 não foi identificado pelo VITEK MS RUO e o L58 foi identificado como *C. orthopsilosis* (Quadro 6), apresentando resultado discordante do VITEK 2 Compact. Como citado anteriormente, a falha na diferenciação entre estas duas espécies de *Candida* por métodos bioquímicos foi relatada na literatura (PANDA *et al.*, 2015; DE CAROLIS *et al.*, 2014). Dessa forma, este resultado do VITEK MS RUO merece atenção, pois pode estar demonstrando um poder discriminatório superior quando comparado ao VITEK 2 Compact. Para esta avaliação, será necessária a identificação por sequenciamento de genes conservados deste isolado (L58) e posterior análise em quadruplicatas em ambos os sistemas (VITEK 2 Compact e VITEK MS RUO). O isolado L20 foi identificado como *C. orthopsilosis* em ambos os sistemas e pode ser utilizado também na avaliação supracitada. Dois isolados (L27 e L37) foram identificados como *Candida guilliermondii* pelo VITEK 2 Compact e como *Pichia guilliermondii* pelo VITEK MS RUO, sendo considerados em concordância. Para finalizar a análise dos resultados do gênero *Candida* pelo VITEK 2 Compact, o isolado L39 foi identificado como *C. pulcherrima* por este sistema e não identificado pelo VITEK MS RUO (Quadro 6).

O gênero *Trichosporon* apresentou arquivo com 95 referências, subdivididas em oito pastas de espécies, uma pasta spp (pasta em que estão alocados os exemplares que não tiveram definição taxonômica até espécie) e uma pasta entre duas espécies. Os isolados L12, L14, L15, L45 e L46 foram identificados como pertencentes a este gênero pelo VITEK 2 Compact, sendo os três primeiros identificados como *T. inkin* e L45 e L46 identificados como *T. asahii* (Quadro 6). Na análise do BD/SARAMIS para o gênero *Trichosporon*

foram encontradas 95 referências alocadas em oito pastas de espécies, uma designada spp e duas pastas entre duas espécies. Os isolados L12, L14 e L15 não foram identificados pelo VITEK MS RUO, mesmo este apresentando uma pasta de referências para a espécie *T. inkin*. Esta ausência de identificação pode estar relacionada ao preparo inadequado do poço (spot) ou a ausência desta variedade proteômica no BD/SARAMIS, uma vez que foram observadas somente 27 referências para a referida espécie. Interessante ressaltar que a cepa de referência desta espécie, a *T. inkin* INCQS 40269 (ATCC 18020), analisada no presente trabalho foi identificada pelo VITEK MS RUO. Os isolados L45 e L46 foram identificados pelo VITEK MS RUO como *T. asteroides* (Quadro 6), resultado conflitante com o apresentado pelo VITEK 2 Compact, pelo qual os mesmos foram identificados como *T. asahii*. Para avaliar qual dos dois métodos apresentou a identificação acurada os isolados deveriam ser identificados por outro método (sequenciamento de genes conservados).

O BD/SARAMIS apresentou um arquivo referente ao gênero *Rhodotorula*, com 87 referências alocadas em três pastas de espécies e uma designada spp. O isolado L49 foi identificado pelo VITEK 2 Compact como *R. minuta*, não tendo sido identificado pelo VITEK MS RUO. Apesar de este estar presente no BD/SARAMIS com 18 referências. Os isolados L34, L42, L50, L51, L54, L62 e L65 apresentaram resultado do tipo *Slashline* pelo VITEK 2 Compact, em que os gêneros *Rhodotorula* e *Cryptococcus* foram apontados como possíveis resultados de identificação. Destes, os isolados L34 e L51 foram identificados pelo VITEK MS RUO como *R. mucilaginosa*, com 99,9% de nível de confiança (Quadro 6). Este resultado foi semelhante ao encontrado na cepa de referência de *R. mucilaginosa* INCQS 40157 (ATCC 64684) analisada no presente trabalho, a qual foi identificada pelo VITEK MS RUO e apresentou o mesmo resultado *Slashline* dos sete isolados autóctones supracitados no VITEK 2 Compact. Os isolados L50, L54, L62 e L65 não foram identificados pelo VITEK MS RUO. Como já foi discutido, a ausência de identificação pode ocorrer pelo preparo inadequado dos poços (spots) ou por ausência de representatividade da diversidade proteômica no BD/SARAMIS. A espécie *R. mucilaginosa* está presente no BD/SARAMIS com 37 referências. O isolado L42 foi identificado pelo VITEK MS RUO como pertencente ao gênero

*Exophiala*, em desacordo com o resultado obtido pelo VITEK 2 Compact (que seria entre os gêneros *Rhodotorula* e *Cryptococcus*). Devido a esta discordância, a morfologia da colônia foi verificada, assim como a lâmina foi observada ao microscópio óptico e constatou-se que esta levedura apresenta coloração negra (Figuras 9 e 10), característica do gênero *Exophiala*, visto que os gêneros *Rhodotorula* e *Cryptococcus* apresentam coloração laranja e bege/amarelada, respectivamente (LACAZ et al., 2002; GUARRO et al., 1999). Portanto, novos testes terão que ser realizados, para verificar se não houve contaminação, e quando possível o será também realizado o sequenciamento de genes conservados desse isolado.

Figura 9 - Foto do isolado L42 em agar TSA e PDA com sete dias de incubação.

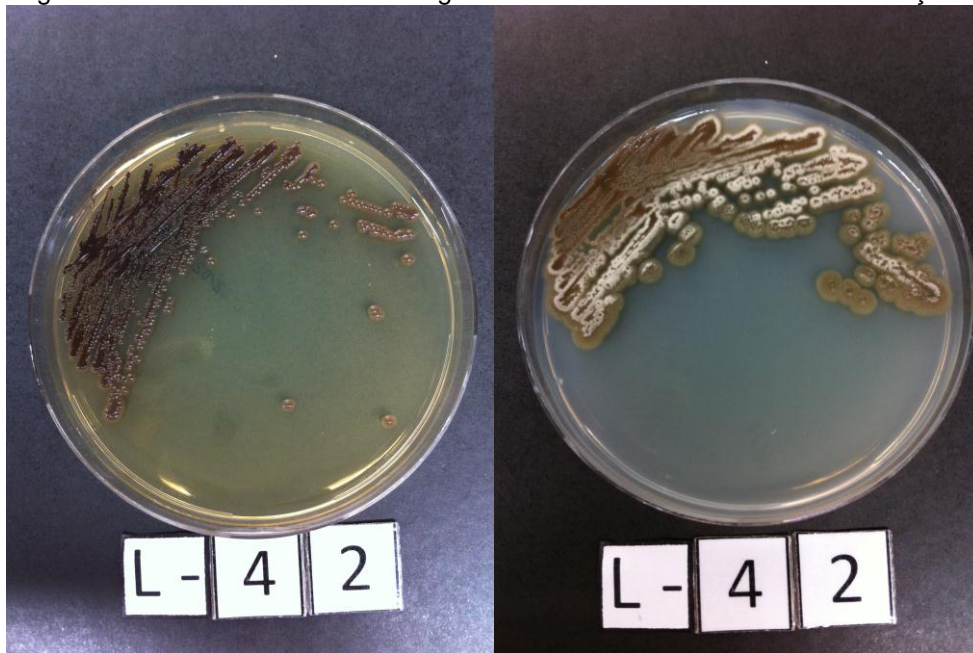
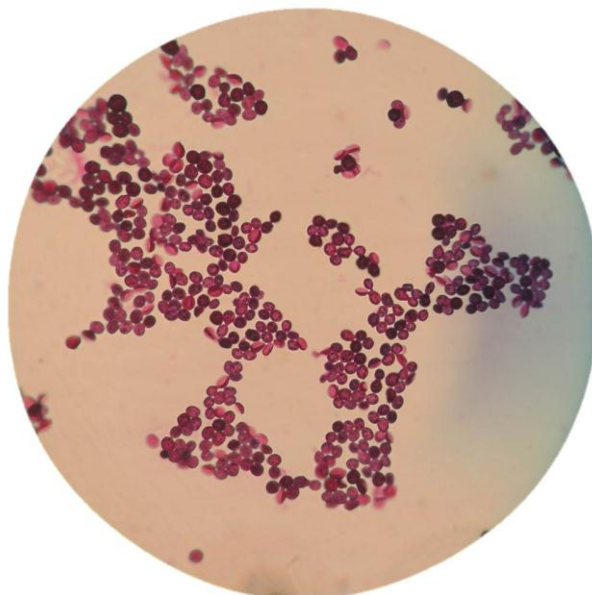


Figura 10 – Imagem referente à observação ao microscópio de esfregaço do isolado L42 submetido à coloração de Gram (40X)



#### 5.2.4 Diversidade e fontes de isolamento de leveduras

Em relação à diversidade de gêneros de leveduras isoladas em áreas produtivas, os dados disponibilizados são muito raros. Pereira (2009) identificou os micro-organismos presentes em áreas classificadas de uma indústria farmacêutica e isolaram oito leveduras. Dentre estas, o gênero *Candida* (quatro isolados) foi evidenciado como a levedura mais frequente, seguido por *Yarrowia* spp. (dois isolados) e *Pichia* sp. (um isolado). Um dos isolados não teve sua identificação concluída (PEREIRA et al., 2009). Além de Pereira et al. (2009), outro estudo também isolou representantes do gênero *Candida* em unidades de produção farmacêutica no Brasil (MAGESTE et al., 2012) e um outro no Egito (ASHOUR et al., 2011). No estudo de Mageste e colaboradores (2012), foram identificados dois gêneros de leveduras (*Candida* e *Rhodotorula*), sendo *Rhodotorula* o gênero de maior número de isolados identificados.

De acordo com as fontes de isolamento, pode-se observar no presente estudo que dos 30 isolados submetidos à identificação, 17 (56,66%) foram oriundos do monitoramento das águas, 10 (33,33%) do monitoramento

ambiental do ar e três (10%) do monitoramento de operadores, representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Fontes de isolamento das leveduras

<b>Fonte de isolamento de leveduras</b>	<b>N° de isolados</b>
<b>Monitoramento das águas</b>	17 (56,66%)
<b>Monitoramento do ar</b>	10 (33,33%)
<b>Monitoramento Humano</b>	3 (10%)
<b>TOTAL</b>	30 (100%)

Mais da metade dos isolados (56,66%) foram obtidos por meio do monitoramento das águas. Não foram encontradas muitas referências sobre as possíveis fontes de isolamento de leveduras na indústria farmacêutica, sendo citados isolamentos a partir de amostras de ar, de superfícies e de operadores (MAGESTE *et al.*, 2012; PEREIRA, 2009). Estudos demonstram a presença de alguns gêneros de leveduras, tais como *Candida*, *Rhodotorula* e *Thricosporon* em amostras de ar de ambientes hospitalares (SETLHARE *et al.*, 2014; MARTINS-DINIZ *et al.*, 2005).

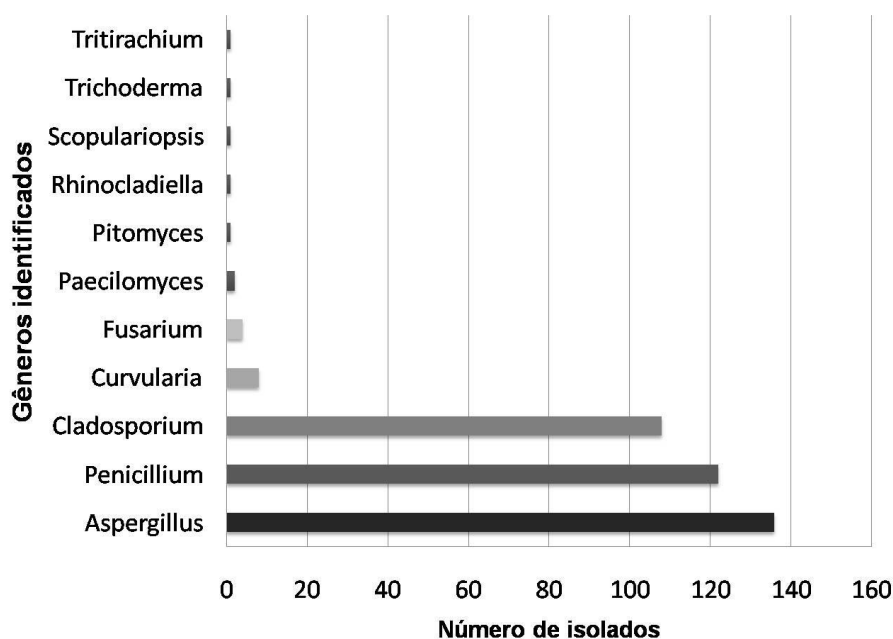
### 5.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

#### 5.3.1 Diversidade ao nível de gênero de fungos filamentosos

O conhecimento da microbiota autóctone dentro dos ambientes de produção, além de uma exigência regulamentária, é uma excelente ferramenta para avaliação do risco biológico associado a processos produtivos e seus produtos. Este conhecimento é possível por meio da construção de um histórico de identificações e da sua análise de tendência do comportamento populacional através do tempo (MEDEIROS, 2015).

A identificação morfológica de fungos filamentosos é um procedimento demorado e complexo, portanto alguns isolados ainda não tiveram sua identificação concluída até a presente data. Dos 453 isolados de fungos filamentosos submetidos à caracterização morfológica, 385 foram identificados ao nível de gênero (Figura 9) e 88 ao nível de espécie. Os 68 isolados ainda não identificados ao nível de gênero aguardam caracterização morfológica. A avaliação da diversidade de fungos filamentosos foi realizada pela análise dos 385 isolados identificados ao nível de gênero (Figura 9). Foram identificados 11 gêneros distintos no presente trabalho.

Figura 11 - Gêneros de fungos filamentosos identificados (2012/2013) dentro de um universo de 385 isolados



O gênero *Aspergillus* constou como o mais frequente entre os espécimes identificados (30%), seguido por *Penicillium* (27%) e *Cladosporium* (24%), representados na Tabela 4. Em estudo realizado por Santos e colaboradores (2012), foi avaliada a diversidade de gêneros de fungos filamentosos nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos durante o período de 2005 a 2007. Foram identificados 44 isolados dos gêneros *Aspergillus* spp. (18

isolados), *Penicillium* spp (15 isolados), *Fusarium* spp. (7 isolados) e *Cladosporium* spp. (4 isolados), sendo o gênero *Aspergillus* o de maior predominância (40,90%). Portanto, este resultado corrobora os resultados do presente estudo. Os quatro gêneros identificados por Santos (2012), também foram evidenciados neste trabalho (Tabela 4).

Tabela 4 - Total de fungos filamentosos estudados (2012/2013)

<b>Nº Cepas</b>	<b>%</b>	<b>Gênero</b>
<b>136</b>	30%	<i>Aspergillus</i>
<b>122</b>	27%	<i>Penicillium</i>
<b>108</b>	23%	<i>Cladosporium</i>
<b>19</b>	4,5%	Outros gêneros
<b>68</b>	15,5%	Não identificados
<b>453</b>	100%	TOTAL

Em um trabalho realizado por Utescher e colaboradores (2007) a partir de isolados fúngicos de amostras do monitoramento ambiental de áreas controladas de produção biofarmacêutica do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), o gênero *Penicillium* foi apontado como o mais frequente, 170 isolados (85%), seguido por *Cladosporium*: 12 isolados (6%), *Aspergillus*: oito isolados (4%). Os isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são comumente encontrados no solo e compõem a microbiota do ar (LACAZ *et al.*, 2002). O Quadro 6 apresenta todos os gêneros identificados no presente estudo (total 11) comparando com os resultados dos trabalhos citados anteriormente (SANTOS, 2012; UTESCHER *et al.*, 2007).

A Tabela 5 apresenta o número de isolados dos outros oito gêneros identificados no presente estudo (Tabela 4), totalizando 19 isolados.



Tabela 5 - Número de isolados representantes dos outros gêneros

<b>Outros Gêneros identificados</b>	<b>Nº de isolados</b>
<i>Curvularia</i>	8
<i>Fusarium</i>	4
<i>Paecilomyces</i>	2
<i>Pitomyces</i>	1
<i>Rhinoctadiella</i>	1
<i>Scopulariopsis</i>	1
<i>Trichoderma</i>	1
<i>Tritirachium</i>	1
<b>TOTAL</b>	<b>19</b>

Poucos estudos foram publicados sobre o monitoramento de áreas controladas em indústria farmacêutica, o que dificulta a discussão do tema. Embora o assunto seja estabelecido e regulamentado, poucos resultados são divulgados.

Os resultados do presente trabalho foram comparados com estudos desenvolvidos em outras áreas controladas como: hospitais, unidades de tratamento médico e indústria alimentícia.

Quadro 6 – Comparação dos resultados obtidos no presente estudo com trabalhos publicados

Gênero	Presente estudo		SANTOS, 2012		UTESCHER <i>et al.</i> , 2007	
	Nº de isolados	%	Nº de isolados	%	Nº de isolados	%
<i>Alternaria</i>	--	--	--	--	5	2,5%
<i>Aspergillus</i>	136	35,32%	18	40,90%	8	4%
<i>Penicillium</i>	122	31,68%	15	34,10%	170	85%
<i>Cladosporium</i>	108	28,05%	04	9,10%	12	6%
<i>Curvularia</i>	08	2,08%	--	--	--	--
<i>Fusarium</i>	04	1,05%	07	15,90%	03	1,5%
<i>Mycela sterilia</i>	--	--	--	--	01	0,5%
<i>Paecilomyces</i>	02	0,52%	--	--	--	--
<i>Pitomyces</i>	01	0,26%	--	--	--	--
<i>Rhinochadiella</i>	01	0,26%	--	--	--	--
<i>Scopulariopsis</i>	01	0,26%	--	--	01	0,5%
<i>Trichoderma</i>	01	0,26%	--	--	--	--
<i>Tritirachium</i>	01	0,26%	--	--	--	--
<b>TOTAL</b>	<b>385</b>	<b>100%</b>	<b>44</b>	<b>100%</b>	<b>200</b>	<b>100%</b>

A contaminação fúngica em centros de pesquisa e laboratórios biomédicos tem causado impactos financeiros e esbarrado em exigências regulatórias. Em um laboratório de cultura de células humana, que apresenta áreas controladas de forma semelhante àsquelas da indústria de medicamentos estéreis (como os imunobiológicos), foi detectada contaminação por *Aspergillus* spp. em áreas controladas e incubadoras (CORNELISON *et al.*, 2012). Em outro artigo publicado foi identificada a presença dos três gêneros mais frequentes no presente estudo em uma unidade de produção de células mesenquimais humana para terapia celular (MARTÍN *et al.*, 2012). Neste último trabalho, o gênero *Aspergillus* (56%) foi o mais frequente, seguido por *Penicillium* (26%) e *Cladosporium* (18%). Estes autores destacaram a importância de um Programa de Monitoramento Ambiental bem estruturado e sugeriram ainda que a origem da contaminação das áreas controladas possa

ter relação com o sistema de ar, com os operadores e/ou a entrada de insumos (MARTÍN *et al.*, 2012).

Estudos publicados em ambientes hospitalares revelam a necessidade de controle dos sistemas de ventilação e ar condicionado pelos altos índices de infecções causadas por fungos de diversas espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (AZIMI *et al.*, 2013; KELKAR *et al.*, 2005; LI & HOU, 2003; FAURE *et al.*, 2002; FOX *et al.*, 1990). Perdelli e colaboradores (2006) identificaram espécies de *Aspergillus* em três sistemas de ar condicionado em hospitais da Itália. Outro estudo foi realizado durante oito anos em centros cirúrgicos e unidades hematológicas da França (FAURE *et al.*, 2002). Os sistemas de ar condicionado e ventilação foram monitorados como possíveis veículos de contaminação dos pacientes. Foram identificados isolados que pertenciam aos gêneros *Penicillium* (28%), *Cladosporium* (15%) e *Aspergillus* (7%), incluindo também isolados identificados como *A. fumigatus* (3,4%), fungo potencialmente patogênico.

A indústria de alimentos tem expressivo interesse no controle da contaminação fúngica nas áreas de produção, pois além da possibilidade de deterioração, alterações das características organolépticas do produto e redução do valor nutricional, existe um problema de saúde público causado pela contaminação por fungos produtores de micotoxinas (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Os gêneros identificados no presente trabalho, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, são representantes consagrados de risco de contaminação de alimentos por micotoxinas (FORSYTHE, 2002).

Assim como foi verificado no presente estudo, o gênero *Aspergillus* foi identificado como contaminante predominante em áreas controladas de indústrias e hospitais (TORMO-MOLINA *et al.*, 2012; UTSCHER *et al.*, 2007; PERDELLI *et al.*, 2006; PANAGOPOULOU *et al.*, 2002; BOUAKLINE *et al.*, 2000). Com relação à fonte de isolamento dos fungos filamentosos no presente estudo, foi observado que 92,2% (418) das cepas foram isoladas a partir de amostras de monitoramento ambiental do ar. Destes isolados, 30% são representantes do gênero *Aspergillus* (Tabela 6), corroborando com grande parte das investigações quanto à qualidade do ar em áreas controladas de indústrias e hospitais (TORMO-MOLINA *et al.*, 2012; UTSCHER *et al.*, 2007; PANAGOPOULOU *et al.*, 2002).

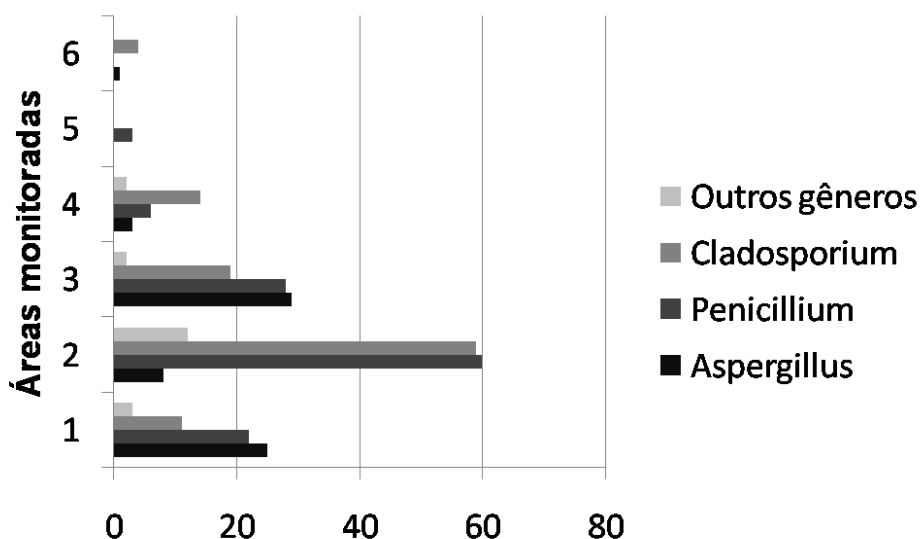
Tabela 6 - Fonte de isolamento de fungos filamentosos

<b>Gêneros</b>	<b>Água</b>	<b>Monitoramento de Superfície</b>	<b>Monitoramento Humano</b>	<b>Monitoramento do Ar</b>	<b>Validação de Área</b>	<b>TOTAL</b>
<i>Aspergillus</i>	1	4	3	126	2	136
<i>Penicillium</i>	Ausente	8	1	113	Ausente	122
<i>Cladosporium</i>	2	4	3	99	Ausente	108
<b>Outros gêneros</b>	Ausente	Ausente	Ausente	18	1	19
<b>Não identificado</b>	1	4	Ausente	61	2	68
<b>TOTAL</b>	<b>4 (1%)</b>	<b>20 (4,4%)</b>	<b>8 (1,8%)</b>	<b>418 (92,2%)</b>	<b>3 (0,6%)</b>	<b>100%</b>

Diversos trabalhos evidenciam a relação direta entre a presença de micro-organismos em áreas controladas e a circulação de operadores, indicando esta como uma importante fonte de contaminação (XAVIER *et al.*, 2013; UTESCHER *et al.*, 2007; ANGHEL & CHETWYND, 2002). Favero e colaboradores (1968) relataram elevados níveis de contaminação em locais com maior circulação de pessoas, em estudo comparando salas limpas de indústria e centros cirúrgicos. No entanto, a contaminação de fungos filamentosos analisada no presente estudo sugere que a maior fonte de contaminação das áreas controladas seja o ar, seguindo as linhas de pesquisa e investigações dos sistemas de ar dos hospitais e indústrias citados anteriormente.

Foram analisadas amostras oriundas do monitoramento ambiental de seis áreas de produção, que apresentavam áreas classificadas (graus de A a D). Estas áreas são separadas fisicamente (seis prédios distintos) e foram denominadas por letras (áreas 1 a 6), com o intuito de mapear a distribuição dos gêneros fúngicos em cada uma delas. Esta distribuição está ilustrada na Figura 10.

Figura 12 - Distribuição dos fungos filamentosos por área de produção



A Tabela 7 apresenta o número de isolados de cada gênero por área de produção.

No período avaliado, a área 2 foi a que apresentou maior número de isolados fúngicos (N=259). Os gêneros *Penicillium* e *Cladosporium* tiveram um número muito próximo de isolados, N=60 e N=62, respectivamente. Também foram obtidos 12 isolados (4,7%) representantes de outros gêneros, o maior número encontrado entre as áreas. Os isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Fusarium* (quatro isolados), *Curvularia* (três isolados), *Paecilomyces* (dois isolados), *Trichoderma*, *Tritirachium* e *Rhinochadiella* (um isolado cada). Esta área teve intensa produção no período estudado, e conseqüentemente um volume maior de amostragem, uma vez que o monitoramento ambiental foi realizado em cada momento em que ocorreu um processo produtivo.

As áreas 5 e 6 estiveram em obras de ampliação e modernização no período estudado por isso o número de amostragens realizadas durante o período do estudo foi inferior, quando comparado com as demais áreas.

Tabela 7 - Gêneros identificados por área de produção

Gênero/Área	1	%	2	%	3	%	4	%	6	%
<i>Aspergillus</i>	25	33 %	78	30 %	28	34 %	04	15 %	01	10 %
<i>Penicillium</i>	23	31 %	62	24 %	29	35 %	05	19 %	03	30 %
<i>Cladosporium</i>	11	15 %	60	24 %	19	23 %	14	54 %	04	40 %
Outros	03	4 %	12	5 %	02	2 %	02	8 %	0	0
NÃO ID	13	17 %	47	18 %	05	6 %	01	4 %	02	20 %
<b>TOTAL</b>	<b>75</b>	<b>100 %</b>	<b>259</b>	<b>100 %</b>	<b>83</b>	<b>100 %</b>	<b>26</b>	<b>100 %</b>	<b>10</b>	<b>100 %</b>

Apesar de o gênero *Aspergillus* ter sido o mais frequente no *ranking* global de identificações (Figura 9), sua predominância foi observada somente nas áreas 1, 2 e 3 (Tabela 7). Essas áreas apresentaram a mesma sequência de gêneros mais frequentes (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, outros gêneros) (Tabela 7), encontrada no *ranking* global (Tabela 4).

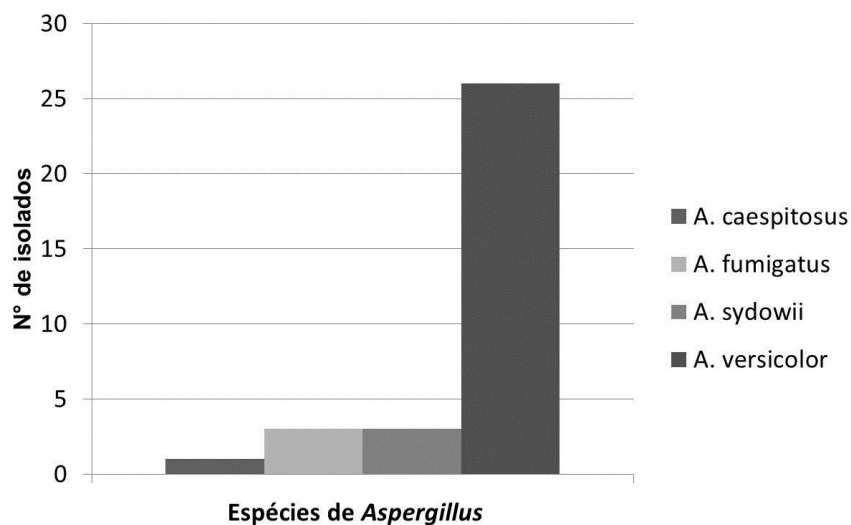
Os isolados de *Cladosporium* spp. foram os mais frequentemente identificados nas áreas 4 e 6 (Tabela 7).

Os três gêneros mais frequentes *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* foram identificados em todas as áreas produtivas (Tabela 7).

### 5.3.2 Diversidade de espécies de fungos filamentosos

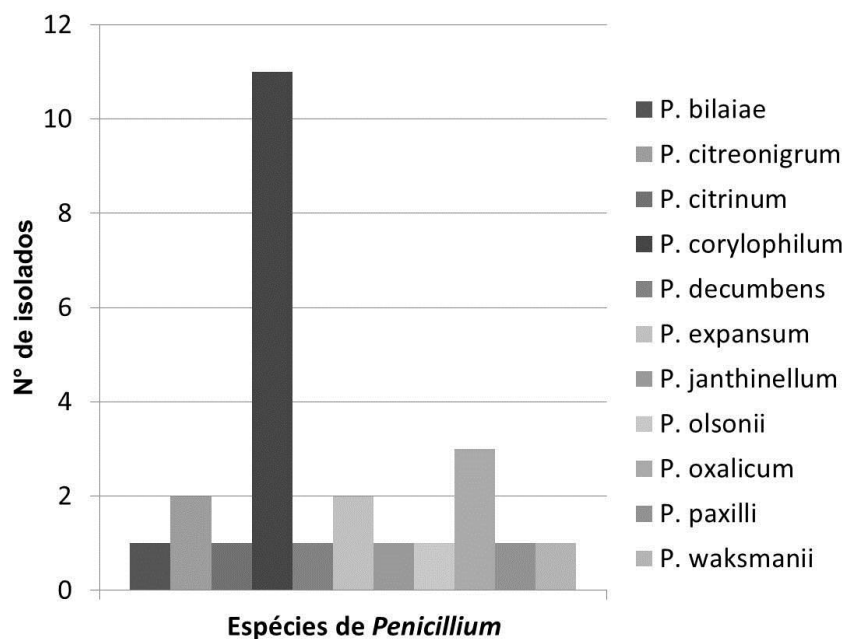
A partir dos resultados apresentados no item 5.3.1, foi constatado que os três principais gêneros identificados foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. Foi possível observar que dentre estes gêneros havia grande variabilidade de espécies.

Dos 136 isolados identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus*, 33 foram identificados ao nível de espécie, incluindo quatro espécies distintas: *A. caespitosus*, *A. fumigatus*, *A. sydowii* e *A. versicolor* (Figura 11).

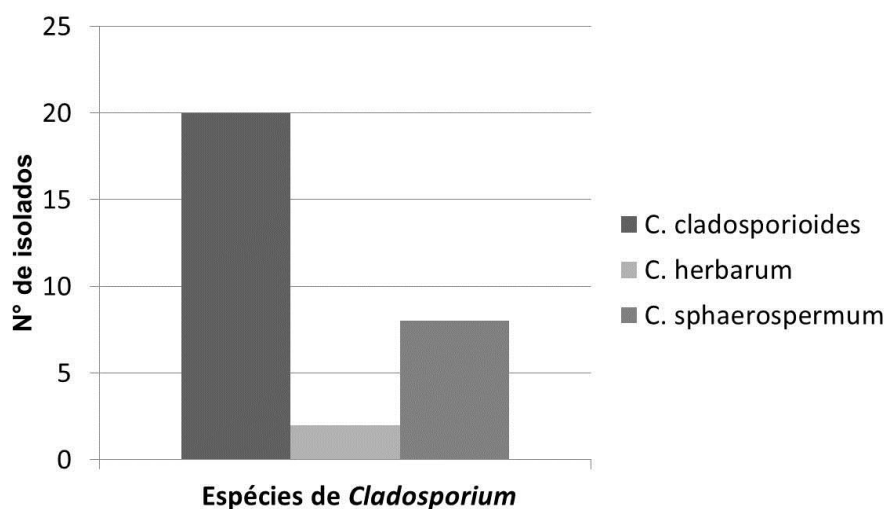
Figura 13 - Espécies do gênero *Aspergillus* identificadas (N=33)

Destas 33 cepas, a espécie *A. versicolor* (26 cepas, 78,79%) foi a mais frequente entre os isolados de *Aspergillus* identificados. As espécies *A. fumigatus* e *A. sydowii* apresentaram três isolados cada. Somente um isolado foi identificado como pertencente à espécie *A. caespitosus*.

Dos 122 isolados identificados como pertencentes ao gênero *Penicillium*, 25 foram identificados em nível de espécie distribuídos em 11 espécies distintas. Dos isolados identificados, este gênero foi o que apresentou a maior diversidade de espécies. A espécie *P. corylophilum* foi a mais frequente, com 11 isolados (44%), sendo seguida por *P. oxalicum*, com três isolados (12%). As espécies *P. expansum* e *P. citreonigrum* apresentaram dois isolados cada (Figura 12).

Figura 14 - Espécies encontradas do gênero *Penicillium*

Dos 108 isolados identificados como *Cladosporium* spp., 30 foram identificados em nível de espécie. Este gênero apresentou três espécies, sendo *C. cladosporioides* (20 cepas, 66,67%) a de maior frequência de isolamento (Figura 13).

Figura 15 - Espécies encontradas do gênero *Cladosporium*



Os estudos sobre contaminantes predominantes em áreas controladas de hospitais e indústria alimentícia se limitam à identificação ao nível de gênero, não se aprofundando até nível de espécie. Portanto, não foi possível discutir estes resultados frente à literatura.

#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS PELO SISTEMA VITEK MS RUO (BIOMÉRIEUX)

Segundo relatos, os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e também várias leveduras oriundas de amostras clínicas foram identificados com sucesso pelo MALDI-TOF MS (BECKER *et al.*, 2014; RANQUE *et al.*, 2014; BILLE *et al.*, 2012; HETTICK *et al.*, 2008b; SEYFARTH *et al.*, 2008). Porém, não existe um protocolo padronizado e versátil disponível para análise dos diferentes grupos de fungos (CHALUPOVÁ *et al.*, 2014), os estudos publicados apresentam protocolos específicos (MARKLEIN *et al.*, 2009; SULC *et al.*, 2009; HETTICK *et al.*, 2008a, 2008b).

Os resultados obtidos na primeira etapa, durante a qual foi realizada a comparação dos protocolos BioMérieux (utilizando matriz CHCA e DHB – com e sem pérolas) e Maceração estão apresentados no Quadro 7.

Todos os resultados obtidos foram introduzidos no BD/SARAMIS e alocados em pastas conforme o resultado apresentado, ou seja, identificados ou não identificados.

Quadro 7 - Comparação de variações dos protocolos BioMérieux e Maceração utilizadas na identificação pelo VITEK MS RUO de 11 isolados de *A. versicolor*

Protocolo <i>A. versicolor</i>	Protocolo BMX (TFA e CHCA)		Protocolo BMX (TFA e DHB)		Protocolo Maceração (DHB)
	Com pérolas	Sem pérolas	Com pérolas	Sem pérolas	--
<b>F24</b>	NID	NID	NID	NID	NID
<b>F60</b>	NID	NID	NID	NID	NID
<b>F134</b>	NID	NID	NID	NID	NID
<b>F805</b>	NID	NID	NID	NID	NID
<b>F823</b>	NID	NID	NID	NID	NID
<b>F848</b>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	NID	NID	NID
<b>F856</b>	NID	NID	NID	NID	NID
<b>F861</b>	NID	NID	NID	NID	NID
<b>F867</b>	NID	NID	NID	NID	NID
<b>F958</b>	NID	NID	NID	NID	NID
<b>INCQS 40028</b>	NID	NID	NID	NID	NID

Legenda: BMX=BioMérieux; TFA= ácido trifluoracético; CHCA= ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico; DHB= ácido 2,5 dihidroxibenzóico; NID= Não identificado.

A cepa *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853) não foi identificada a partir de nenhum dos protocolos testados (Quadro 7).

Dos 11 isolados submetidos ao protocolo BioMérieux utilizando a matriz DHB (com ou sem pérolas) nenhum isolado foi identificado (Quadro 7). Ademais, quase todos os resultados apresentaram *datacount* abaixo de 40, limite utilizado pelo software SARAMIS para comparação e identificação de resultados (dado não apresentado). Somente um isolado - F848 - (9,09%) foi identificado no protocolo BioMérieux com uso da matriz CHCA (Quadro 7). Além disso, os *datacounts* apresentados nos resultados dos outros 10 isolados para este protocolo estavam acima de 40 (dado não apresentado), sendo a maioria dentro da faixa preconizada pelo fabricante (de 100 a 200).

Não houve diferença entre os resultados observados nas variações com e sem pérolas de vidro, em ambos os protocolos (Quadro 7). Dessa forma, o uso destas não foi introduzido no protocolo final, destinado a avaliar todos os 385 isolados identificados morfológicamente no presente trabalho.

Em seguida, os mesmos 11 isolados foram submetidos ao protocolo Maceração (maceração em tubo contendo a matriz DHB), entretanto nenhum deles foi identificado (Quadro 7). O datacount apresentado nos resultados não foram tão baixos quanto os apresentados no protocolo BioMérieux com DHB (dado não apresentado), mas foram inferiores à faixa preconizada pelo fabricante (100 a 200) e aos resultados apresentados no uso do protocolo BioMérieux com CHCA.

A segunda etapa, seguiu com o protocolo escolhido, denominado no presente estudo BioMérieux (pré-tratamento da cultura do isolado em TFA), com ligeira maceração (uma adaptação pela observação dos *datacounts* apresentados para o protocolo Maceração) e uso da matriz CHCA. Os resultados obtidos foram incorporados ao BD/SARAMIS e estão apresentados na Tabela 8.

Dos 385 isolados submetidos ao VITEK MS RUO, somente 15 (3,89%) foram identificados, sendo todos pertencentes ao gênero *Aspergillus* (Tabela 8). Este resultado foi o mais baixo para identificação de fungos filamentosos utilizando a técnica de MALDI-TOF MS, quando comparado às publicações consultadas para o presente estudo (PANDA *et al.*, 2015; BECKER *et al.*, 2014; CHALUPOVÁ *et al.*, 2014; RANQUE *et al.*, 2014; FENSELAU, 2013; BILLE *et al.*, 2012; CROXATTO *et al.*, 2012; IRIART *et al.*, 2012; BIZZINI *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2010; HETTICK *et al.*, 2008). Muitas variáveis podem estar associadas a esta pobre performance, como protocolo utilizado, tempo de cultivo, preparo dos poços (*spots*), variedade do banco de dados, entre outros. Para tentar entender este resultado, foi realizada, inicialmente, a análise do BD/SARAMIS para os gêneros e espécies identificados pela morfologia.

Tabela 8 - Resultados dos 385 isolados submetidos ao VITEK MS

<b>Gênero (nº de isolados)</b>	<b>Nº de isolados identificados</b>
<b><i>Aspergillus</i> (136)</b>	15 (11,03%)
<b><i>Cladosporium</i> (108)</b>	Não identificado
<b><i>Curvularia</i> (8)</b>	Não identificado
<b><i>Fusarium</i> (4)</b>	Não identificado
<b><i>Paecilomyces</i> (2)</b>	Não identificado
<b><i>Penicillium</i> (122)</b>	Não identificado
<b><i>Pitomyces</i> (1)</b>	Não identificado
<b><i>Rhinocladiella</i> (1)</b>	Não identificado
<b><i>Scopulariopsis</i> (1)</b>	Não identificado
<b><i>Trichoderma</i> (1)</b>	Não identificado
<b><i>Tritirachium</i> (1)</b>	Não identificado
<b>TOTAL (385)</b>	--

Os níveis de confiança apresentados pelo software SARAMIS dos 15 isolados representantes do gênero *Aspergillus* identificados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – *Aspergillus* spp. identificados (15 isolados) pelo VITEK MS RUO (N=385)

<b><i>Aspergillus</i> spp. identificados</b>	<b>Nível de confiança VITEK MS RUO</b>
<b>F848 (<i>A. versicolor</i>)</b>	86,8%
<b>F856 (<i>A. versicolor</i>)</b>	85,2%
<b>F24 (<i>A. versicolor</i>)</b>	80,6%
<b>F134 (<i>A. versicolor</i>)</b>	80%
<b>F867 (<i>A. versicolor</i>)</b>	80%
<b>F823 (<i>A. versicolor</i>)</b>	78,4%
<b>F861 (<i>A. versicolor</i>)</b>	77,4%
<b>F966 (<i>A. versicolor</i>)</b>	77,4%
<b>F846 (<i>A. versicolor</i>)</b>	77,3%
<b>F60 (<i>A. versicolor</i>)</b>	75%
<b>F805 (<i>A. versicolor</i>)</b>	75%
<b>F783 (<i>A. fumigatus</i>)</b>	75%
<b>F958 (<i>A. versicolor</i>)</b>	75%
<b>F805 (<i>A. versicolor</i>)</b>	75%
<b>F680 (<i>A. versicolor</i>)</b>	75%

Os gêneros *Curvularia*, *Pitomyces*, *Rhinocladiella* e *Tritirachium* não constavam no BD/SARAMIS. Dessa forma, a ausência de identificação foi facilmente justificada. Para os outros sete gêneros avaliados, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, todavia, foram encontrados arquivos contendo referências (espectros de referência e SuperSpectras), conforme o Quadro 8. As referências para cada gênero foram englobadas na coluna “nº de referências” do Quadro 8. Contudo, como alguns isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* foram identificados até espécie no presente trabalho, as informações relacionadas às espécies identificadas foram discriminadas. Dos gêneros avaliados no presente trabalho, o gênero *Aspergillus* que apresenta um total de 1129 referências (dado não apresentado

no Quadro 8), consta como o gênero mais caracterizado no BD/SARAMIS, quando comparado aos gêneros *Penicillium* (87 referências), *Cladosporium* (23 referências) e aos outros gêneros identificados. No Quadro 8 estão apresentadas as referências das espécies identificadas no presente estudo.

Quadro 8 - Análise do BD/SARAMIS

Identificação morfológica		Análise do BD/SARAMIS	
Gênero	Espécie	Presente no BD?	Nº referências
<b><i>Aspergillus</i></b>	<i>A. caespitosus</i>	Não	0
	<i>A. fumigatus</i>	Sim	150
	<i>A. sydowii</i>	Sim	55
	<i>A. versicolor</i>	Sim	38
<b><i>Cladosporium</i></b>	<i>C. cladosporioides</i>	Sim	10
	<i>C. herbarum</i>	Não	0
	<i>C. sphaerospermum</i>	Sim	4
<b><i>Fusarium</i></b>	Não concluído	Sim (8 espécies, 2 com variação dentro da espécie, 1 spp, 1 entre duas especies)	113
<b><i>Paecilomyces</i></b>	Não concluído	Sim (2 espécies)	24
<b><i>Penicillium</i></b>	<i>P. bilaiae</i>	Não	0
	<i>P. citreonigrum</i>	Não	0
	<i>P. citrinum</i>	Não	0
	<i>P. corylophilum</i>	Não	0
	<i>P. decumbens</i>	Não	0
	<i>P. expansum</i>	Sim	17
	<i>P. janthinellum</i>	Não	0
	<i>P. olsonii</i>	Não	0
	<i>P. oxalicum</i>	Não	0
	<i>P. paxilli</i>	Não	0
	<i>P. waksmanii</i>	Não	0
<b><i>Scopulariopsis</i></b>	Não concluído	Sim (1 espécie)	30
<b><i>Trichoderma</i></b>	Não concluído	Sim (5 espécies, 1 spp)	98

A maioria das espécies identificadas a partir de isolados do gênero *Penicillium* não apresentou representação no BD/SARAMIS, justificando a ausência de identificação (Quadro 8). A espécie *P. expansum* foi a única representante dos isolados identificados que estava presente no BD/SARAMIS e apresentou 17 referências. Entretanto, este número de referências não foi suficiente para identificar os dois isolados autóctones desta espécie analisados (Quadro 8). Situação semelhante foi observada em relação ao gênero *Cladosporium*, pelo fato do BD/SARAMIS não conter a espécie *C. herbarum*. Por outro lado, apresentava referências para *C. sphaerospermum* (quatro referências) e *C. cladosporioides* (10 referências), mas mesmo assim, os 28 isolados autóctones identificados como pertencentes a estas duas espécies não foram identificados pelo VITEK MS RUO. Este último gênero apresentou um número muito pequeno de referências na pasta do referido gênero (23 referências), quando comparado ao gênero *Aspergillus* (1129 referências). Esta observação, aliás, foi recorrente para os demais gêneros identificados morfologicamente, considerando que o número de referências para cada gênero no BD/SARAMIS foi aproximadamente 10 vezes menor que o apresentado pelo gênero *Aspergillus* (Quadro 8).

Em relação aos 15 isolados de *Aspergillus* spp identificados pelo VITEK MS RUO, 14 (93,33%) foram identificados pela morfologia como *A. versicolor* e um (6,67%) como *A. fumigatus* (Tabela 9). Estes resultados foram obtidos utilizando cultivos com dois dias de crescimento, conforme o protocolo original da BioMérieux. Os fungos filamentosos apresentam grande diversidade de expressão fenotípica, como observado em diferentes condições de cultivo e pela produção de diversos metabólitos secundários. Estes, entre outros aspectos (como o tipo de parede celular e conídios), dificultam a extração de proteínas e tornam a reprodutibilidade dos espectros de massa (picos) baixa (DE CAROLIS *et al.*, 2014). Esta variação fenotípica pode ter influenciado os resultados para os 385 isolados no presente trabalho.

Para avaliar a influência dos fatores ambientais (meio de cultivo, tempo de crescimento e temperatura de incubação) no resultado obtido pelo VITEK MS RUO, foram novamente submetidos à identificação por este sistema os 11 isolados de *A. versicolor* (10 autóctones e uma cepa de referência) utilizados na avaliação dos protocolos BioMérieux e Maceração (Tabela 10).

Como a temperatura de incubação das culturas utilizada na identificação de fungos filamentosos isolados a partir de amostras encaminhadas à SEPIN foi fixada na faixa de 20 a 25°C (conforme preconizado pelo PMA de Bio-Manguinhos), esta variável não foi considerada. Para limitar o número de variáveis nesta avaliação, foi definido o ágar PDA utilizado na identificação dos isolados fúngicos da rotina da SEPIN como o único meio de cultivo para análises pelo sistema VITEK MS RUO. O tempo de crescimento, dessa forma, foi a única variável avaliada como influência nos resultados obtidos a partir dos 11 isolados de *A. versicolor*.

Dos seis tempos de crescimento avaliados (dois, três, quatro, cinco, seis e sete dias), apenas o crescimento de quatro dias apresentou resultados de identificação, conforme apresentado na Tabela 10.



Tabela 10 - Amostras processadas pelo VITEK MS RUO em quadruplicata

Nº isolado	Gênero	Espécie	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
<b>F24</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	<i>A. unguis</i> (1 - 80,6%) e SD (3)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>F60</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	<i>A. versicolor</i> (1 - 85,2%), 2 (78,4%) e 1 (75%)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>F134</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>F805</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>F823</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>F848</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	<i>A. versicolor</i> (1 - 94,6%), 1 (86,8%), 1 (80%) e 1 (77,4%)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>F856</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	<i>A. versicolor</i> (1 - 94,6%), 1 (86,8%), 1 (80%) e 1 (77,4%)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>F861</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>F867</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>F958</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)
<b>INCQS 40028</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. versicolor</i>	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)	SD (4)

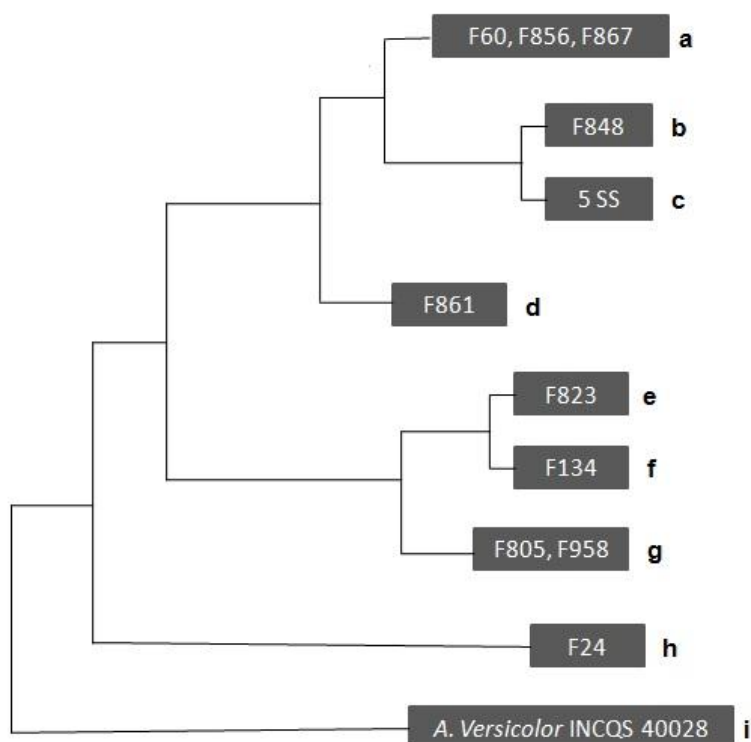
Legenda: SD= Show Details

Como cada um dos 11 isolados foi avaliado em quadruplicata e em seis tempos de cultivo diferentes, cada isolado apresentou 24 resultados, portanto, foram obtidos 264 resultados que foram incorporados ao BD/SARAMIS. Dos 264 resultados obtidos, somente 13 foram alocados na pasta de identificados do BD/SARAMIS. Todos os outros resultados (251) foram alocados na pasta de resultados não identificados. Nestes resultados onde não ocorreu a identificação do isolado, todos apresentaram resultados do tipo *Show Details*, que ocorre quando a porcentagem de pareamento (*matches*) dos espectros (comparação dos espectros de massa entre o resultado obtido e as referências inseridas no BD) não atinge os 70% necessários para considerar o isolado identificado, mas que apresenta similaridade (acima de 40 % de *matches*) com alguma referência inserida no BD (ANAGNOSTEC, 2008).

Em relação aos seis tempos de cultivo avaliados, foi observado resultado de identificação somente a partir de cultivos de quatro dias (Tabela 9). Dos 11 isolados com quatro dias de crescimento, somente quatro foram identificados pelo VITEK MS RUO (Tabela 10). Apesar de todos terem sido identificados morfológicamente como *A. versicolor*, o isolado F24 foi identificado pelo VITEK MS RUO como *A. unguis* em uma das replicatas. Para as outras três replicatas, o resultado foi do tipo *Show Details*.

Foi estruturado um dendrograma, por meio do *software* SARAMIS, com os 264 resultados obtidos e os oito SuperSpectras da espécie *A. versicolor* do BD/SARAMIS, para avaliar a relação de similaridade de perfis de espectros entre os isolados e representantes da espécie. Neste *software*, são considerados como pertencentes à mesma espécie os resultados com similaridade superior a 70% (ANAGNOSTEC, 2008). Foram observados nove grandes clados: a) F60/F856/F867; b) F848; c) cinco SuperSpectra; d) F861; e) F823; f) F134; g) F805/F958; h) F24; e i) *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853). Foram descartados os resultados que visualmente se apresentaram destacados dos nove clados formados (grande distância de similaridade, com menos de 40% de similaridade): três SuperSpectra e dois resultados de um isolado autóctone (F60). A partir do dendrograma estruturado pelo *software* SARAMIS, foi confeccionado um dendrograma adaptado para facilitar a visualização (Figura 13).

Figura 16 - Dendrograma (adaptado) das análises dos isolados de *A. versicolor* apresentado pelo software SARAMIS



Fonte: Imagem elaborada pela própria autora, baseada nos dados fornecidos pelo software SARAMIS

Quase todos os perfis de espectros (70 resultados) dos isolados F60, F856 e F867 apresentaram similaridade superior a 80% entre si, não estando separados os espectros por isolado. A mesma condição foi observada entre os resultados dos isolados F805 e F958 (48 perfis de espectros com similaridade superior a 80%) (Figura 13). Dois resultados do F60 foram considerados outliers (não agrupados e apresentando distância de similaridade, com menos de 40 % de similaridade), e foram descartados.

O clado formado pelos 24 resultados do isolado F848 (clado b) foi o que apresentou maior similaridade com o clado formado pelos cinco SuperSpectra (clado c) representantes da espécie *A. versicolor* (Figura 13). Esta similaridade poderia justificar a identificação de 13 (54,16%) das 24 vezes que este mesmo isolado foi analisado pelo VITEK MS RUO, utilizando a matriz CHCA.

Os 24 resultados obtidos a partir da cepa de *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853) formaram um único clado (clado i), que foi o de maior distância dos demais clados no dendrograma, sendo considerado o de menor

similaridade com os demais resultados. Esta cepa apresenta um fenótipo distinto, a coloração bege rosada, que difere do característico da espécie *A. versicolor*, a coloração em tons de verde, amarelo, marrons e branco, descrito por Klich (2002). Esta variedade fenotípica pode ter contribuído para o seu distanciamento dos outros isolados e dos cinco SS de *A. versicolor* do BD/SARAMIS. Este foi um resultado interessante, uma vez que todos os dez isolados autóctones apresentaram maior similaridade com os cinco SS do BD/SARAMIS que a referida cepa *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853) utilizada, mesmo sendo esta última um representante comprovado da espécie. Este resultado sugeriu a necessidade da inserção desta variante no BD, para que a diversidade desta espécie estivesse mais bem representada. Dessa forma, foi construído um SS (Figura 14) a partir dos resultados do presente trabalho, que foi posteriormente validado e inserido no BD/SARAMIS. A Tabela 11 apresenta os picos de massas e suas respectivas intensidades do SS proposto.

Figura 17 – SuperSpectra *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853)



Tabela 11 – Tabela com as massas e suas respectivas intensidades do SS proposto

	<b>Massa</b>	<b>Intensidade</b>		<b>Massa</b>	<b>Intensidade</b>
<b>1</b>	3057.000000	8.500000	<b>21</b>	5242.400000	8.500000
<b>2</b>	3367.800000	37.400000	<b>22</b>	5381.700000	2.300000
<b>3</b>	3380.800000	10.700000	<b>23</b>	6010.600000	44.300000
<b>4</b>	3673.900000	9.900000	<b>24</b>	6061.700000	5.700000
<b>5</b>	3757.500000	4.600000	<b>25</b>	6114.300000	11.100000
<b>6</b>	3810.600000	6.600000	<b>26</b>	6209.200000	1.200000
<b>7</b>	3837.500000	22.700000	<b>27</b>	6550.500000	28.900000
<b>8</b>	3849.200000	23.400000	<b>28</b>	6725.900000	46.600000
<b>9</b>	3897.700000	4.900000	<b>29</b>	6761.000000	11.100000
<b>10</b>	4040.700000	1.600000	<b>30</b>	6947.100000	15.000000
<b>11</b>	4081.800000	2.700000	<b>31</b>	7347.300000	4.000000
<b>12</b>	4484.200000	2.600000	<b>32</b>	7448.400000	4.300000
<b>13</b>	4543.500000	32.100000	<b>33</b>	7448.400000	4.300000
<b>14</b>	4557.500000	4.200000	<b>34</b>	7675.200000	79.200000
<b>15</b>	4631.000000	3.600000	<b>35</b>	7697.800000	46.200000
<b>16</b>	4746.600000	17.800000	<b>36</b>	7714.500000	12.500000
<b>17</b>	4996.000000	1.700000	<b>37</b>	9114.200000	1.200000
<b>18</b>	5021.200000	11.400000	<b>38</b>	9492.500000	5.200000
<b>19</b>	5062.900000	2.000000	<b>39</b>	10256.200000	3.000000
<b>20</b>	5129.100000	1.600000	<b>40</b>	12017.800000	52.300000

A ausência no BD/SARAMIS de gêneros e de espécies dos isolados identificados no presente trabalho por si só já representa uma justificativa para a expansão deste banco de dados. Ademais, o número de referências contido para as espécies que não apresentaram identificação pelo VITEK MS RUO também pode ser considerado uma justificativa para esta expansão. O reconhecimento posterior dos espectros de referência autóctones incorporados ao BD/SARAMIS por outras repetições da mesma espécie, visualizado na análise do dendrograma confeccionado, (Figura 13) representa um resultado favorável na construção de um *BD in house* complementar, que já foi iniciada a

partir da inserção do SS construído utilizando a cepa de *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853) no presente trabalho.

O número de trabalhos publicados com fungos filamentosos e a inserção de espectros de referência em bancos de dados comerciais de MALDI-TOF/MS ainda são poucos (DE CAROLIS *et al.*, 2014). Entretanto, a construção de bancos de dados *in house* tem contribuído para a diferenciação de isolados clínicos de gêneros como *Aspergillus* e *Penicillium*, assim como tem aumentado a performance de identificação dos isolados desses gêneros submetidos à identificação proteômica por MALDI-TOF MS (SANTOS *et al.*, 2010).

## 5.5 IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PELA MORFOLOGIA NA SEPIN

Todas as metodologias usadas pelo Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos devem estar descritas e organizadas segundo o preconizado pelas BPF na RDC n.17/2010 (BRASIL, 2010). Dessa forma, um dos produtos resultantes do presente trabalho foi à confecção das Instruções de Trabalho (ANEXO A e B) que descrevem o procedimento de identificação de isolados fúngicos a partir de amostras enviadas a SEPIN.

Em decorrência da complexidade necessária para a identificação morfológica em nível de espécie de fungos filamentosos (necessidade de produção de meios de cultura distintos, medição de estruturas microscópicas, tempo de incubação prolongado, numerosas etapas para a identificação de um único micro-organismo, entre outras), foi determinado que a identificação morfológica seria realizada na rotina somente até gênero. Dessa forma, foram elaborados procedimentos (instruções de trabalho) para a confecção de microcultivo em lâmina e de observação de estruturas microscópicas em lâmina direta. A partir da introdução destes documentos no sistema da qualidade de Bio-Manguinhos, a equipe de identificação da SEPIN recebeu treinamento teórico e prático das técnicas implementadas. Sendo assim, a partir de 2013, a informação dos gêneros fúngicos foi introduzida nos laudos de

identificação da SEPIN. Anteriormente, os resultados eram liberados como “fungo filamentoso” ou “levedura”. Portanto, a implementação da identificação morfológica dos gêneros dos fungos filamentosos isolados na rotina da SEPIN foi concluída com êxito. A identificação proteômica dos fungos filamentosos a partir do sistema VITEK MS RUO somente poderá ser implementada após a construção do banco de dados complementar ao BD/SARAMIS, uma vez que este último não identificou 353 isolados autóctones (91,68%) de um total de 385 isolados (Tabela 8). Quanto à identificação das leveduras pelo VITEK MS RUO, este sistema também só será implementado após o recebimento dos insumos para o sequenciamento e posterior comparação das metodologias testadas e escolha daquela que demonstrar melhor desempenho na rotina de identificação da SEPIN.

A introdução da metodologia de identificação de fungos na rotina do laboratório significou uma melhoria na qualidade do resultado gerado pela SEPIN e permitiu a conformidade com o artigo 314 da RDC n.17/2010, que exige a identificação de todos os micro-organismos isolados.



## 6 CONCLUSÕES

- No período de fevereiro de 2012 a novembro de 2013, foram isoladas 453 colônias de fungos filamentosos e 61 leveduras, totalizando 514 isolados fúngicos;
- O sistema VITEK MS RUO apresentou melhor desempenho na identificação das leveduras de referência em comparação com o sistema VITEK 2 Compact;
- Na identificação dos isolados de leveduras autóctones, o sistema VITEK 2 Compact apresentou maior número de identificações, em comparação com o sistema VITEK MS RUO. Mas o sistema VITEK MS RUO, teve maior diversidade de gêneros identificados. Sendo necessária a continuação do estudo e posterior identificação genotípica dos isolados para comparação das três metodologias;
- Os gêneros de leveduras identificados com maior frequência, utilizando o sistema VITEK 2 Compact é *Candida*, seguido pelos gêneros *Trichosporon* e *Rhodotorula*. Já utilizando o sistema VITEK MS RUO, os gêneros mais frequentes foram *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Exophiala*
- A fonte de isolamento que apresentou mais da metade de isolados pertencentes às leveduras foi o monitoramento das águas;
- Os gêneros de fungos filamentosos identificados pela morfologia no período de estudo totalizaram 11 gêneros, entre eles: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Pitomyces*, *Rhinocladiella*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma* e *Tritirachium*;
- O gênero *Aspergillus* foi o mais freqüente com 30% do total dos isolados pertencentes aos fungos filamentosos;
- A fonte de isolamento que apresentou maior número de isolados de fungos filamentosos foram as amostras de monitoramento do ar;
- As áreas que apresentaram maior número de isolados fúngicos foram as áreas 1, 2 e 3;

- O gênero *Penicillium* apresentou maior diversidade de espécies identificadas pela morfologia, totalizando 11 espécies;
- A espécie identificada pela morfologia que apresentou maior número de representantes foi *A. versicolor*, com 26 isolados autóctones;
- A identificação proteômica pelo sistema VITEK MS RUO dos fungos filamentosos apresentou melhor desempenho com o protocolo que utilizou a matriz CHCA, com adaptação do processo mecânico de maceração do isolado;
- Os isolados de *A. versicolor* selecionados para análise pelo VITEK MS RUO, juntamente com a cepa de referência *A. versicolor* INCQS 40028 (ATCC 16853) apresentaram melhores resultados no presente trabalho, no quarto dia de crescimento, diferentemente do indicado pelo protocolo da BioMérieux (com dois dias de crescimento);
- Constatou-se a importância de inserir no BD/SARAMIS os representantes que fazem parte deste banco de dados, mas demonstram-se pouco representados em espectros de referência, assim como os isolados não identificados, para então ampliar a performance de identificação dos espécimes ambientais isolados em Bio-Manguinhos.

## **7 PERSPECTIVAS**

No futuro, os isolados representantes das leveduras terão duas formas de preservação: criopreservação e liofilização.

A técnica de sequenciamento será introduzida na rotina tanto para confirmação da identificação dos isolados testados, como para aqueles que não tiveram sua identificação concluída. Posteriormente será realizada a inserção destas variedades proteômicas no BD/SARAMIS.

## REFERÊNCIAS

ANAGNOSTEC. Operating Instructions – AXIMA@SARAMIS, MALDI-TOF MS based analysis of microbiological samples for identification with AnagnosTec SARAMIS, 67p., 2008.

ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 219-225, 1975.

ALDRIDGE, C. et al. Automated microbiological detection/identification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 406-413, 1977.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, Ch W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. John Willey and Sons. Inc., New York, 868p, 1996.

ANGHEL, V.; CHETWYND, D. G. Creating a low-cost, ultra-clean environment. **Precision Engineering**, v. 26, n. 1, p. 122-127, 2002.

ANVISA. **Home page da ANVISA**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/institucional/index.htm>>. Acessado em 20 de outubro de 2012.

APARECIDO, C. C. et al. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani (água destilada) e liofilização. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 5-8, 2007.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 344-355, 2011.

ASHOUR, M. S.; MANSY, M. S.; EISSA, M. E. Microbiological environmental monitoring in pharmaceutical facility. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 63-74, 2011.

AZIMI, F. et al. Fungal air quality in hospital rooms: a case study in Tehran, Iran. **Journal of Environmental Health Sciences & Engineering**, v.11, p.30, 2013.

BECKER, P. T. et al. Quality control in culture collections: Confirming identity of filamentous fungi by MALDI-TOF MS. **Mycoscience**, 2014a.

BECKER, P. T. et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. **Medical mycology**, v. 52, n. 8, p. 826-834, 2014b.

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1-401, 2012.

BILLE, E. et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood

cultures. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 11, p. 1117-1125, 2012.

BIO MANGUINHOS. **Home page de Bio-Manguinhos**. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/home/quem-somos>>. Acesso em 05 de janeiro de 2015.

BIZZINI, A. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.693–696, 2011.

BIZZINI A., GREUB G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**. v.16, p.1614-1619, 2010.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BOUAKLINE, A. et al. Fungal contamination of food in hematology units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4272-4273, 2000.

BRASIL, **Constituição da República Federativa do Brasil**. 1988.

BRASIL, Ministério da Saúde. Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l8080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm)>. Acesso em: 20 de outubro de 2012.

BRASIL, Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999: Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, v. 1, n. 18, 1999.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de abril de 2010. Seção 1, p.94-110, 2010. Brasil.

BRASIL. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 13700**: áreas limpas – classificação e controle de contaminação, 1996.

BRASIL. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR ISO 14644-1**: Salas limpas e ambientes controlados associados – Parte 1: Classificação da limpeza do ar, 2005.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia da qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica**. 1 ed.,2013.

**Farmacopéia Brasileira**, 5.ed. Brasília: ANVISA, 2010. 1 v. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/index.htm> > Acesso em: 20 outubro de 2012.

CASSIANI, S. H. B.; A segurança do paciente e o paradoxo no uso de medicamentos. **Revista Brasileira de Enfermagem**. Brasília Jan./Feb. vol.58 no.1, 2005.

CASTELLANI A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 42, p. 181-184, 1967.

CHALUPOVÁ, J. et al. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 230-241, 2014.

CHAO, Q. et al. Comparison of the Accuracy of Two Conventional Phenotypic Methods and Two MALDI-TOF MS Systems with That of DNA Sequencing Analysis for Correctly Identifying Clinically Encountered Yeasts. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e109376, 2014.

CHARNOT-KATSIKAS et al. Prospective evaluation of the VITEK MS for the routine identification of bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory: assessment of accuracy of identification and turnaround time. **Journal of Medical Microbiology**. v.63, p. 235–241, 2014.

CHERKAOUI, A. et al. Comparison of two matrixassisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p. 1169–1175, 2010.

CRAWFORD, R.L. Microbial diversity and its relationship to planetary protection. **Applied Environmental Microbiology** v.71, p. 4163–4168, 2005.

CROUS, P.W.; BRAUN, U.; SCHUBERT, K.; GROENEWALD, J.Z. **The genus *Cladospirium* and similar dematiaceous hyphomycetes**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 253 p., 2007.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

CORNELISON, C.T. et al. Recurrent *Aspergillus* contamination in a biomedical research facility: a case study. **Journal Industry Microbiology Biotchnology**, v.39, p.329-335, 2012.

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

<[http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10\\_2009.pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10_2009.pdf)> Acesso em 19 nov. 2014.

DEACON, J. W. **Fungal Biology**. Blackwell Publishing, 4th Edition, 2006.

DEUS, F.J.T. de; SÁ, P.F.G. de. Evolução da normatização de boas práticas de fabricação (BPF) e o seu impacto na qualidade de medicamentos comercializados no Brasil. In: **Mostra de produção científica da pós-graduação lato sensu da PUC Goiás**, 2011. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/FERNANDO%20JUSTINO%20TORRES%20DE%20DEUS.pdf>>. Acesso em 15 de dezembro de 2014.

DE CAROLIS, E. et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 09, p. 1081-1088, 2014.

DE CAROLIS, E. et al. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. **Medical Mycology**, v. 52, n. 2, p. 123-130, 2014.

DESNOS-OLLIVIER, M. et al. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 3237-3242, 2008.

DHIMAN, N. et al. Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.1614-11616, 2011.

DINGLE, T. C.; BUTLER-WU, S. M. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 33, n. 3, p. 589-609, 2013.

Documento Interno (DI) nº 3970. Bio-Manguinhos. **Programa de monitoramento ambiental das áreas limpas de Bio-Manguinhos**. 7ª revisão. Departamento de Garantia da Qualidade do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Rio de Janeiro. Aprovado em 8 de dezembro de 2010.

DRANCOURT, M. et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3623-3630, 2000.

DUGAN, F.M.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U. Check-list of *Cladosporium* names. **Schlechtendalia** 11: 1–103, 2004.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. CMI, Kew. 1971.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. CMI, Kew. 1976.

**EUROPEAN Pharmacopoeia**. 6.ed. Strasbourg: Council of Europe, v. 1, p.155-157, 2008.

FAURE, O. et al. Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units. **Journal of Hospital Infection**, v.50, p.155-160, 2002.

FAVERO, M.S. *et al.* Comparative levels and types of microbial contamination detected in industrial clean rooms. **Applied Microbiology** v.14,p. 539–551, 1966.

FAVERO, M.S. et al. Comparison of microbial contamination levels among hospital operating rooms and industrial clean rooms. **Applied Microbiology**, v.3, p. 480-486, 1968.

FERREIRA L. et al. Identification of fungal clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. **Revista Espanhola de Quimioterapia**. v. 26 (3), p.193-197, 2013.

FENSELAU, C.C. Rapid Characterization of Microorganisms by Mass Spectrometry – What Can Be Learned and How? **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. V.24, p.1161-1166, 2013.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 157-171, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: sterile drug products produced by aseptic processing**, 2004. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070342.pdf>>. Acesso em 17 de outubro de 2012.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: ARTMED. 424p. 2002.

FOX, B. C. et al. Heavy contamination of operating room air by *Penicillium* species: Identification of the source and attempts at decontamination. **American Journal of Infection Control**, v. 18, n. 5, p. 300-306, 1990.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p., 2008

GEBALA, B.; SANDLE, T. Comparison of different fungal agar for the environmental monitoring of pharmaceutical-grade cleanrooms. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 67, n. 6, p. 621-633, 2013.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.



GUO, L. *et al.* Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. **Journal of Thoracic Diseases**, v. 6, n. 5, p. 534, 2014.

HAWKSWORTH, D. L. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. **IMA fungus: The Global Mycological Journal**, v. 2, n. 2, p. 155, 2011.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.

HAYNES, W. C.; WICKERHAM, L. J.; HESSELTINE, C. W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 361, 1955.

HETTICK, J.M. *et al.* Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Analytical Biochemistry**, v. 380, p. 276–281, 2008a.

HETTICK, J.M. *et al.* Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 2555–2560, 2008b.

HOMOLKA, L. Methods of Cryopreservation in Fungi. **Laboratory Protocols in Fungal Biology**. Springer, p. 9-16, 2013.

INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL SCIENCES AND TECHNOLOGIES (EUA). Microorganisms in clean rooms, IEST-RP-CC-023.1, 1998.

INSTRUÇÃO DE TRABALHO (IT) N° 0207. Bio-Manguinhos. **Promoção de Crescimento de Meios de Cultura**. 4ª revisão. Seção de Esterilidade Processos e Insumos do Laboratório de Controle de Qualidade do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Rio de Janeiro. Aprovado em 16 de junho de 2014.

IRIART, X. *et al.* Routine Identification of Medical Fungi by the New Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight System with a New Time-Effective Strategy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p.2107-2110, 2012.

KELKAR, U.; BAL, A.M.; KULKARNI, S. Fungal contamination of air conditioning units in operating theatres in India. **Journal of Hospital Infection**, v.60, p.81-84, 2005.

KIM, S. H. *et al.* Misidentification of *Candida guilliermondii* as *C. famata* among Strains Isolated from Blood Cultures by the VITEK 2 System. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**. 771 pp., 10<sup>o</sup> Ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KLICH, M. A. **Identification of *Aspergillus* Species**. 1 ed.: Amer Society For Microbiology, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.. **Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas**. Ed. Médica Panamericana, 2008.

KRIPPNER, E. Classificação de áreas limpas. **Revista SBCC**, v.44, p.42-45. 2010.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS. J. E. C.; VASCCARI-HEINS, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 2002. 9<sup>a</sup> ed. São Paulo: SARVIER. 1104p.

LAY JR., J.O. MALDI-TOF Mass Spectrometry of Bacteria. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 20, p.172-94, 2001.

LI, C.S.; HOU, P.A. Bioaerosol characteristics in hospital clean rooms. **Sci Total Environmental**, v.305,p.169-176, 2003.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed. 1160p. 2010.

MAGESTE, J. DE O. *et al.* Estudo da microbiota fúngica anemófila de uma indústria farmacêutica de Juiz de Fora–MG. **FACIDER-Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2012.

MARKLEIN G., JOSTEN M., KLANKE U. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. V.47,p.2912–2917, 2009.

MARTÍN, P. G. et al. Isolation and characterization of the environmental bacterial and fungi contamination in a pharmaceutical unit of mesenchymal stem cell for clinical use. **Biologicals**, v. 40, n. 5, p. 330-337, 2012.

MARTINEZ, J.A.B. Em busca da qualidade total. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 1, 2007.

MARTINS-DINIZ, J.; N. *et al.* Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 398-405, 2005.

MEDEIROS, L. M. **Caracterização de isolados bacterianos envolvidos na produção de imunobiológicos, reativos e biofármacos e desenvolvimento de um sistema integrado de identificação de micro-organismos e de rastreamento de fontes de contaminação**.2015. 250 f. Tese (Doutorado em

Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2015.

MILLER, M. J. et al. Evaluation of the BioVigilant IMD-A, a novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time environmental monitoring of viable and nonviable particles. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 63, n. 3, p. 258-282, 2009.

NAGARKAR, P.P.; RAVETKAR, S.D.; WATVE, M.G. Oligotrophic bacteria as tools to monitor aseptic pharmaceutical production units. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1371-1374, 2001.

NETO, J.A.P. Alguns aspectos da nova RDC 17 de BPF e suas implicações. **Revista SBCC**, v.47, p.20-27. 2010.

OECD. **Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres**. Organisation for Economic Co-Operation and Development, França, 2007.

ONADIPE, A.O. Microbiological Considerations for Biotechnological Products. In: DENYER, S.P.; BAIRD, R.M. **Guide to Microbiological Control in Pharmaceutical and Medical Devices**. 2 ed., 2007. p. 91-95.

PANAGOPOULOU, P. *et al.* Filamentous fungi in a tertiary care hospital: environmental surveillance and susceptibility to antifungal drugs. **Infectology Control Hospital Ep**, v.28, p.60-67, 2007.

PANAGOPOULOU, P. *et al.* Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. **Journal of Hospital Infectology**, v.52, p.185-191, 2002.

PANDA, A. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 109, p. 93-105, 2015.

PERDELLI, F. *et al.* A problem of hospital hygiene: The presence of Aspergilli in hospital wards with different air-conditioning features. **American Journal of Infection Control**, v.34, p.264-268, 2006.

PEREIRA, C. C. Identificação da microbiota presente em áreas classificadas de produção de uma indústria farmacêutica. **Curso de Especialização em Microbiologia**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 67 p. 2009.

PFALLER, M. A. *et al.* *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3551-3556, 2006.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2010.

PINTO, A. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25712, 2011.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, 197 p. 2000.  
PITT, J.I.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam: 9–79, 2000.

PUTIGNANI, L. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 3, p. 620-629, 2011.

QIAN, J. *et al.* MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 3, p. 439-449, 2008.

RAMSTORP, M. Novo método para estudos experimentais em salas limpas. **Revista SBCC**. Disponível em <[http://www.sbcc.com.br/revistas\\_pdfs/ed%2027/27NovosMetodos.pdf](http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2027/27NovosMetodos.pdf)> Data de acesso 22 de outubro de 2014.

RAMSTORP, M. **Introduction to Contamination Control and Cleanroom Technology**. 2008. Weinheim, Alemanha: WILEY-VCH. 179p.

RANQUE, S. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. **Mycoses**, v. 57, n. 3, p. 135-140, 2014.

RAPER, K. B; FENNEL, D. I. **The genus *Aspergillus***. 1 ed, Baltimore: Williams & Wikins, 1965. 686 p.

REFAI, M.; EL-YAZID, H. A.; TAWAKKOL, W. Monograph on The genus *Penicillium*. Disponível em <[http://www.researchgate.net/profile/Mohamed\\_Refai3/publication/273695076\\_Monograph\\_on\\_the\\_genus\\_Penicillium/links/5509028c0cf27e990e0d7e77.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Mohamed_Refai3/publication/273695076_Monograph_on_the_genus_Penicillium/links/5509028c0cf27e990e0d7e77.pdf)> Data de acesso 16 de maio de 2015.

REP, M. *et al.* Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. **Plant Physiology**, v. 130, n. 2, p. 904-917, 2002.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, 42, p.265-70, 1950.

SAMSON, R. A.; et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SANDLE, T. A review of cleanroom microflora: types, trends, and patterns. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 65, n. 4, p. 392-403, 2011.

SANTOS, P.S.G. **Principais gêneros de fungos filamentosos provenientes das áreas controladas da produção de imunobiológicos no período de 2005 a 2007**. 2012. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, v.49, p.543–51, 2009.

SELWAL, K. K.; SELWAL, M. K.; GANDHI, D. N. Effect of freeze drying process on some properties of *Streptococcus thermophilus* isolated from dairy products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1500-1505, 2011.

SETLHARE, G. *et al.* Identification of airborne microbiota in selected areas in a health-care setting in South Africa. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

SEYFARTH, F. *et al.* The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 965-971, 2008.

SIMÕES, M.F. *et al.* Polyphasic Identification and Preservation of fungal Diversity: Concepts and Applications. In: MALIK, A. *et al.* **Management of Microbial Resources in the Environment**. DOI 10.1007/978-94-007-5931-2\_5. 2013

SHERABA, N.S.; YASSIN, A.S.; AMIN, M.A. High-throughput molecular identification of *Staphylococcus* spp isolated from a clean room. **BMC Research Notes**, 3:278, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO.  
**Recomendação Normativa 005/97**: testes em áreas limpas, 1997.

SOLA, M. C. *et al.* Manutenção de Microrganismos: Conservação e Viabilidade. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. v.8, N.14; p. 1398-1418, 2012.

SULC, M. ET AL. Biomarkers of *Aspergillus* spores: Strain typing and protein identification. **International Journal of Mass Spectrometry**. n. 280. P.162-168, 2009.

TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151-153, 1988.

TEKIPPE, E. M.E.; BURNHAM, C.-AD. Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 12, p. 2163-2171, 2014.

TORMO-MOLINA, R. *et al.* Monitoring the occurrence of indoor fungi in a hospital. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.29, p.227–234, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 934, 2012.

UNITED STATES.General Services Administration. **Federal Standard 209E**: Airborne particulate cleanliness classes for clean rooms and clean zones,1992. UNITED STATES Pharmacopeia 24. Informational chapter 1116: Microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments, 1999.

UNITED STATES Pharmacopeia 32. National Formulary 27. Chapter 1116: Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments. USA: 2009.

UTESCHER, C.L.A. et al. Microbial monitoring of clean rooms in development of vaccines. **Brazilian Journal Microbiology**, v.38, n.4, 2007.

Van VEEN, SQ; CLASS, E.C.; KUIJPER E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal Clinical Microbiology**, v. 48, p. 900–907, 2010.

VENKATESWARAN, K. *et al.* Molecular microbial diversity of a spacecraft assembly facility. **System Applied Microbiology**, v. 24,p. 311–320, 2001.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

WAINWRIGHT, M.; ALI, T.A.; BARAKAH, F. A review of the role of oligotrophic micro-organisms in biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradation**,v.31,p.1–13, 1993.

WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, v. 163, n. 3863, p. 150-160, 1969.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS – WFCC. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms, 3 ed. 2010. Disponível em: ><http://www.wfcc.info/guidelines/>> Acesso em: 23 nov. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Environmental monitoring of clean rooms in vaccine manufacturing facilities: points to consider for manufacturers of human vaccines. Draft Document: Eighth draft. Geneva, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 20 out. 2012.

XAVIER, M. P. et al. Importância do monitoramento ambiental em áreas classificadas. **Biofar: Revista de Biologia e Farmácia**. v. 9, p. 1-12, 2013.