

**ANÁLISE POR MALDI-TOF MS E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DE
FUNGOS ISOLADOS EM UMA INSTALAÇÃO FARMACÊUTICA**

**MALDI-TOF MS ANALYSIS AND SEQUENCING OF THE ITS REGION OF
FUNGI ISOLATED FROM A PHARMACEUTICAL FACILITY**

Maria Luiza Souza Galvão Dacio
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0009-0004-8833-276X>
maria.galvao@bio.fiocruz.br

Marcelo Luiz Lima Brandão
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0000-0003-1121-7312>
marcelo.brandao@bio.fiocruz.br

Pamella Souza Silva
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0009-0012-6812-8707>
pamella.silva@bio.fiocruz.br

Luciana Veloso da Costa*
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0000-0003-1873-4056>
luciana.costa@bio.fiocruz.br

Joyce Modesto de Andrade
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0009-0002-7066-0824>
joyce@bio.fiocruz.br

Andressa Sbano da Silva Ferreira
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-3165-0482>
andressa.ferreira@bio.fiocruz.br

Talita Bernardo Valadão
Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-5877-8048>
talita.valadao@bio.fiocruz.br

*Autor por correspondência

ARTIGO CIENTÍFICO
Submetido em: 20.06.2026
Aprovado em: 15.07.2026

RESUMO

A identificação rápida e confiável de microrganismos isolados em ambientes farmacêuticos é essencial para a investigação de contaminações, a avaliação de risco e o fortalecimento da estratégia de controle de contaminação. Em laboratórios de controle de qualidade, a identificação em nível de espécie contribui diretamente para a segurança do produto, a rastreabilidade microbiológica contínua e a conformidade regulatória. A espectrometria de massas por dessorção e ionização a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF MS) tem sido incorporada à rotina por combinar rapidez, facilidade das condições de preparo da amostra e qualidade espectral. Neste estudo, 20 isolados fúngicos obtidos de uma instalação farmacêutica foram analisados por MALDI-TOF MS e sequenciamento da região ITS, que foram comparadas ao banco de dados Mycobank. A maior parte das linhagens analisadas por MALDI-TOF MS não foi identificada (10%) ou foi identificada com baixa confiabilidade (60%), enquanto o sequenciamento da região ITS identificou 57,1% das linhagens pelo menos ao nível de gênero. Os principais gêneros identificados foram *Penicillium* (35%) e *Rhodotorula* (15%). Conclui-se que a abordagem se mostrou satisfatória para a identificação de fungos isolados ambientais farmacêuticos, embora outros métodos sejam necessários para que se obtenha resultados ao menor nível taxonômico possível.

Palavras-Chave: Controle de qualidade. Identificação polifásica. MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

The rapid and reliable identification of microorganisms isolated in pharmaceutical environments is essential for investigating contamination, conducting risk assessments, and strengthening microbiological control strategies. In quality control laboratories, species-level identification directly contributes to product safety, continuous microbiological traceability, and regulatory compliance. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been incorporated into routine practice by combining speed, ease of sample preparation, and spectral quality. In this study, 20 fungal isolates obtained from a pharmaceutical facility were analyzed by MALDI-TOF MS and ITS region sequencing, and the sequences were compared to the Mycobank database. Most of the strains analyzed by MALDI-TOF MS were not identified (10%) or were identified with low reliability (60%), whereas by ITS sequencing, 57.1% of the strains were identified at least to the genus level. The main genera identified were *Penicillium* (35%) and *Rhodotorula* (15%). It is concluded that the approach proved satisfactory for the identification of fungal isolates from pharmaceutical environmental, although other methods are necessary to obtain results at the lowest possible taxonomic level.

Keywords: Quality Control. Polyphasic Identification. MALDI-TOF MS.

1 INTRODUÇÃO

Na indústria farmacêutica, a fabricação de medicamentos deve seguir as normas regulatórias referentes às Boas Práticas de Fabricação (BPF), que determinam que os processos sejam validados e documentados, de modo a assegurar a sua rastreabilidade. As BPF são fundamentais para que as operações farmacêuticas sejam conduzidas sob condições

controladas, com monitoramento adequado e resposta rápida diante de desvios de processo (Brasil, 2022; EMA, 2022; WHO, 2011).

Nesse contexto, o controle microbiológico desempenha papel central na garantia da qualidade e da segurança dos produtos, pois a presença de microrganismos pode comprometer a confiabilidade do processo, a qualidade final do produto e a conformidade regulatória (Brasil, 2022). Nessa perspectiva, a identificação dos microrganismos isolados durante o monitoramento ambiental e o controle microbiológico de rotina não deve ser vista apenas como uma exigência formal, mas como uma ferramenta estratégica que permite compreender o perfil microbiológico dos ambientes produtivos, reconhecer possíveis fontes de contaminação e direcionar medidas corretivas e preventivas de forma mais precisa (Li *et al.*, 2026; Mattoso *et al.*, 2025; Oliveira *et al.*, 2025; Ramos *et al.*, 2024; USP, 2026).

De forma complementar, a Agência Sanitária dos Estados Unidos da América (EUA) Food and Drug Administration (FDA) enfatiza que, em casos de contaminação, a identificação deve ocorrer preferencialmente em nível de espécie, auxiliando no rastreamento da origem provável do microrganismo e na avaliação do risco associado à qualidade do produto (FDA, 2020). Isso contribui para diferenciar eventos isolados de ocorrências recorrentes, apoiando a investigação microbiológica e a tomada de decisão em áreas produtivas.

A identificação microbiana deve estar integrada aos programas de monitoramento ambiental, aos ensaios de contagem microbiana e à pesquisa de microrganismos especificados, permitindo uma avaliação contínua do estado de controle microbiológico dos processos farmacêuticos (European Pharmacopoeia, 2023; Li *et al.*, 2026; Mattoso *et al.*, 2025; Oliveira *et al.*, 2025; Ramos *et al.*, 2024;). Assim, o monitoramento microbiológico não deve ser compreendido apenas como uma etapa documental, mas como uma ferramenta de acompanhamento do processo, capaz de indicar alterações no perfil microbiano das áreas produtivas, fragilidades operacionais e possíveis rotas de entrada ou permanência de contaminantes (Kremer; Patel, 2019).

No contexto europeu, as diretrizes da Farmacopeia Europeia para produtos farmacêuticos abrangem ensaios de contagem microbiana, detecção de microrganismos específicos e monitoramento ambiental, além de reconhecerem a importância da adoção de métodos rápidos alternativos, desde que devidamente validados (EDQMH, 2024). O Anexo 1 europeu das normas de BPF para produtores de medicamentos estéreis (EMA, 2022) também reforça a necessidade de uma estratégia de controle de contaminação estruturada, articulando medidas de prevenção, monitoramento, investigação e revisão periódica das práticas adotadas. Embora esse documento seja direcionado principalmente à fabricação de produtos estéreis, seus

princípios também podem orientar outros ambientes controlados nos quais a redução da carga microbiana seja relevante para a qualidade final do produto (EMA, 2022; USP, 2026).

Nos últimos anos, a identificação microbiana em ambientes de produção farmacêutica tem avançado com o uso combinado de métodos fenotípicos, espectrometria de massas e técnicas moleculares (Li *et al.*, 2026; Song *et al.*, 2024). Essa integração é particularmente útil em rotinas com grande volume de isolados, nas quais a rapidez da resposta interfere diretamente na investigação de desvios, na avaliação de risco e na definição de medidas de controle (Caldeira *et al.*, 2024; Song *et al.*, 2024; Vasconcellos *et al.*, 2026).

A identificação de fungos filamentosos, durante muitos anos, foi realizada por meio de métodos convencionais, que se baseiam predominantemente, na análise das características microscópicas, macroscópicas e morfológicas das colônias, incluindo aspectos como textura, coloração, estruturas reprodutivas e organização das hifas. Esse processo requer micologistas experientes, capazes de reconhecer e interpretar diferenças morfológicas frequentemente sutis entre os táxons, além de conhecimento aprofundado das chaves taxonômicas utilizadas para a classificação e identificação desses microrganismos. Adicionalmente, fatores como as condições de cultivo, o meio de cultura empregado e o estágio de desenvolvimento da colônia podem influenciar a expressão das características morfológicas, tornando a identificação um processo complexo, demorado e dependente da expertise do analista (Moreira *et al.*, 2022; Vijayakumar *et al.*, 2012).

Esse desafio é particularmente relevante em ambientes de produção farmacêutica, onde fungos filamentosos e leveduras podem ser introduzidos por diferentes fontes, como operadores, água, ar, superfícies, matérias-primas, equipamentos e materiais de processo, ou persistir mesmo após procedimentos de limpeza e desinfecção (Moreira *et al.*, 2022; 2023; Ramos *et al.*, 2024). A elevada capacidade de dispersão, adaptação e sobrevivência desses microrganismos, associada, no caso das leveduras, à formação de biofilmes, reforça a importância de sua identificação para a compreensão das fontes de contaminação e para a implementação de estratégias de controle microbiológico mais eficazes (EMA, 2022; Kurtzman; Fell; Boekhout, 2011; Sandle, 2021; Sutton, 2010). Diante desse contexto, métodos automatizados e rápidos têm sido desenvolvidos para atender a esta demanda (Leite *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2022).

A espectrometria de massas por dessorção e ionização a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF MS) consolidou-se como uma alternativa amplamente utilizada na rotina microbiológica por reunir rapidez, alto rendimento analítico, facilidade operacional e custo competitivo após a implantação da plataforma. Em comparação com métodos fenotípicos

convencionais, geralmente mais demorados e dependentes da interpretação morfológica ou bioquímica, o MALDI-TOF MS permite respostas mais ágeis, padronizadas e reprodutíveis para o controle microbiológico industrial (Caldeira *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2022a,b; Nunes Ramos *et al.*, 2025).

Apesar dessas vantagens, a identificação de fungos ambientais ainda representa um desafio analítico. O desempenho do MALDI-TOF MS depende da qualidade do espectro gerado, do preparo da amostra e da representatividade das espécies na biblioteca utilizada (Normand *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2023a; 2023b). A diversidade de fungos recuperados em ambientes farmacêuticos nem sempre está adequadamente representada nas bibliotecas comerciais de identificação, frequentemente constituídas por isolados clínicos ou cepas de referência, o que pode resultar em baixos escores e ausência de identificação (Agustini *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2023b; Song *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2021). Essa limitação intrínseca do método torna necessária a associação com metodologias genotípicas para que sejam obtidos resultados de identificação, pelo menos, ao nível de gênero (Leite *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2023b).

Quando uma identificação confiável não é obtida por MALDI-TOF MS, o sequenciamento de regiões ribossômicas espaçadoras transcritas internas (ITS) pode ser utilizado como etapa complementar para fungos e leveduras. Esse marcador é amplamente empregado em micologia e permite comparar os isolados com sequências disponíveis em bases públicas. A interpretação desses resultados a partir da nomenclatura atualizada disponível em bancos taxonômicos especializados contribui para reduzir erros de identificação e evitar o uso de nomes desatualizados ou pouco precisos (NCBI, 2025, 2026; Vu *et al.*, 2019).

Na Indústria Farmacêutica, o uso combinado de MALDI-TOF MS e sequenciamento de porções ribossômicas, como ITS, e o domínio D1/D2 do LSU rDNA já tem sido utilizado para melhorar a identificação de fungos ambientais, especialmente quando apresentam difícil diferenciação por métodos convencionais (Moreira *et al.*, 2022; 2023). Essa abordagem aumenta a confiabilidade dos resultados e favorece uma interpretação mais segura dos achados microbiológicos, contribuindo para um controle ambiental mais consistente.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi identificar fungos e leveduras provenientes de ambientes de produção farmacêutica, utilizando o MALDI-TOF MS como método inicial de rotina e o sequenciamento da região ITS como metodologia complementar. Essa estratégia buscou aumentar a confiabilidade da identificação, apoiar a investigação de possíveis fontes de contaminação e contribuir para a futura ampliação de bibliotecas espectrais locais com isolados ambientais relevantes para a rotina industrial farmacêutica.

2. METODOLOGIA

2.1 LINHAGENS FÚNGICAS

Foram analisadas 20 linhagens fúngicas, sendo 13 fungos filamentosos e sete leveduriformes, isoladas entre 2022 e 2025 de uma instalação farmacêutica produtora de medicamentos estéreis localizada no Rio de Janeiro, Brasil.

2.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS POR MALDI-TOF MS

As linhagens fúngicas e leveduriformes foram semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (Millipore, Darmstadt, Alemanha) e incubadas a $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 1 a 3 dias. Para as linhagens de leveduras, foi realizado esfregaço com o auxílio do palito de madeira em um poço da placa do MALDI Biotyper[®]. Em seguida, foi aplicado 1,0 μL de solução de ácido fórmico 70%, e após secagem, 1,0 μL da solução matriz HCCA (Bruker Corporation, Massachusetts, EUA). Para as linhagens de fungos filamentosos, foi adicionado 1 μL de ácido fórmico 70% (Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) no poço da placa do MALDI Biotyper[®]. Após tocar no ácido fórmico depositado com a ponta do palito, foi feita a fricção nas extremidades da colônia do fungo, de maneira que não foram retirados fragmentos das colônias fúngicas e/ou meio de cultura, somente as hifas. Em seguida, o palito foi novamente introduzido no ácido fórmico e realizado o esfregaço. Após secagem, foi adicionado 1 μL da matriz HCCA. Todas as linhagens foram analisadas em duplicata. Em um dos poços da placa, foi adicionado 1 μL do padrão de picos de *Escherichia coli* Bacterial Test Standard (BTS - Bruker Corporation, Massachusetts, EUA). Após secagem, aplicou-se 1 μL da matriz HCCA, e após cristalização, a placa foi inserida no equipamento para calibração com o BTS e análise das linhagens.

As linhagens não identificadas foram analisadas novamente, em duplicata, com a utilização de protocolo de extração envolvendo etanol, ácido fórmico 70% e acetonitrila, conforme recomendações do fabricante.

Os espectros de massa gerados foram analisados pelo programa MBT Compass HT v. 5.1.100 e comparados com as bibliotecas disponíveis no equipamento: duas bibliotecas comerciais MBT Compass Library Revision K, 2022 (4.320 *Main Spectrum Profiles* (MSPs)) e MBT Filamentous Fungi Library Revision E, 2022 (779 MSPs), e uma biblioteca local contendo 50 MSPs referentes a espécies bacterianas e dois MSPs referentes a espécies de fungos leveduriformes (*Rhodospiridiobolus azoricus*/*R. fluvialis* e *Rhodotorula mucilaginosa*).

A interpretação dos resultados das linhagens leveduriformes foi realizada de acordo com as seguintes faixas de escore: 0.00-1.69 – não identificado; 1.70-1.99 - baixa confiança para identificação da espécie; e 2.00-3.00 - alta confiança para identificação da espécie. A interpretação dos resultados de linhagens de fungos filamentosos foi realizada utilizando o Módulo de Fungos Filamentosos de acordo com os seguintes escores obtidos: 0.00-1.59 – não identificado; 1.60-1.79 - baixa confiança para identificação da espécie; e 1.80-3.00 - alta confiança para identificação da espécie (Bruker, 2023).

2.3 IDENTIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

As linhagens não identificadas por MALDI-TOF MS foram semeadas em SDA e incubadas a $22,5 \pm 25^{\circ}\text{C}$ por 1 a 5 dias. A extração de DNA foi realizada utilizando o reagente PrepMan® Ultra (Applied Biosystems, Waltham, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e com o auxílio de pérolas de vidro conforme descrito na literatura para otimização da lise celular em leveduras e fungos filamentosos (Cassagne *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). Para a extração dos fungos filamentosos, foi realizada incubação em termobloco (Kasvi, Pinhais, PR, Brasil) a 65°C por 1 h. O DNA extraído foi previamente diluído em água livre de nucleases (Invitrogen, Waltham, EUA) até a concentração de $8,33\text{ ng}/\mu\text{L}$ (Moreira *et al.*, 2023b).

Na reação de PCR, foram utilizados os primers universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTATTGATATGC-3'). As reações foram preparadas em volume final de $25\text{ }\mu\text{L}$, contendo $1\text{ }\mu\text{L}$ de cada primer ($10\text{ pmol}/\mu\text{L}$), $1\text{ }\mu\text{L}$ de dNTPs ($2,5\text{ mM}$), $0,25\text{ }\mu\text{L}$ de GoTaq® G2 Taq polimerase ((Promega Corporation, Madison, WI, USA)), $5\text{ }\mu\text{L}$ de tampão GoTaq® 5X e $5\text{ }\mu\text{L}$ de DNA molde (total de $41,65\text{ ng}$). A amplificação foi realizada em termociclador Veriti Pro (Applied Biosystems, Waltham, EUA), sob as seguintes condições: 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 1 min, 48°C por 1 min e 72°C por 1 min; e 72°C por 5 mins, esperando-se obter fragmentos ~ 500 pares de base (pb) para a região ITS.

A purificação dos *amplicons* foi realizada com o sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Para o sequenciamento da região ITS, as reações de sequenciamento foram compostas por $5,5\text{ }\mu\text{L}$ do produto purificado, $1\text{ }\mu\text{L}$ do reagente BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Waltham, EUA), $2\text{ }\mu\text{L}$ do primer ITS1 ou ITS4 ($1,6\text{ pmol}$) e $1,5\text{ }\mu\text{L}$ de tampão de sequenciamento 5X, totalizando $10\text{ }\mu\text{L}$. A termociclagem foi realizada sob as seguintes condições: 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50

°C por 5 s, e 60°C por 4 min. A purificação dos produtos de sequenciamento foi conduzida utilizando placas de limpeza MicroSEQ™ ID (Applied Biosystems, Waltham, EUA), conforme as orientações do fabricante. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de formamida HiDi (Merck, Darmstadt, Alemanha) a cada poço da placa de 96 poços contendo 10 µL dos produtos de sequenciamento purificados. As amostras foram analisadas no Analisador Genético Série 3500 (Applied Biosystems, Waltham, EUA). As sequências obtidas foram processadas por meio do software DNASTAR Lasergene SeqMan v. 7.0.0, e as sequências consenso foram comparadas com bancos de dados públicos, como o GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o MycoBank (<https://www.mycobank.org/>). Todas as sequências geradas foram posteriormente depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Foram adotados como critérios de identificação os seguintes percentuais de identidade: $\geq 99,6\%$ para espécie, $\geq 94,3\%$ para gênero e $\geq 88,5\%$ para família (Vu *et al.*, 2019). Quando havia mais de uma possibilidade de espécie do mesmo gênero com identidade $\geq 99,6\%$, o resultado foi interpretado como identificado ao nível de gênero. O resultado foi considerado inconclusivo, quando havia espécies de gêneros diferentes com identidade $\geq 99,6\%$, ou quando a espécie mais próxima da linhagem estudada apresentou identidade $\leq 99,6\%$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 LINHAGENS FÚNGICAS SELECIONADAS

A Tabela 1 apresenta os diversos tipos de amostra de onde as linhagens fúngicas foram isoladas. As linhagens leveduriformes foram codificadas com a letra L, e as linhagens de fungos filamentosos com a letra F.

Tabela 1 – Origem e ano de isolamento das linhagens fúngicas analisadas.

Linhagem	Origem do isolamento	Ano
L01/22	Água purificada	2022
L02/24	Teste de esterilidade	2024
L06/24	Água purificada	2024
L14/24	Monitoramento de operador	2024
L15/24	Monitoramento de operador	2024
L17/24	Meio de cultura (ensaio de biocarga)	2024
L05/25	Meio de cultura (ensaio de biocarga)	2025
F12/19	Monitoramento ativo do ar	2019
F13/19	Monitoramento ativo do ar	2019
F18/20-1	Monitoramento ativo do ar	2020
F18/20-3	Monitoramento ativo do ar	2020
F26/20	Monitoramento ativo do ar	2020
F30/20	Monitoramento ativo do ar	2020
F31/21	Monitoramento de frasco por <i>swab</i>	2021
F19/23	Monitoramento ativo do ar	2023
F233/24-1	Monitoramento de operador	2024
F78/25-1	Monitoramento ativo do ar	2025
F78/25-2	Monitoramento ativo do ar	2025
F152/25-1	Monitoramento ativo do ar	2025
F152/25-2	Monitoramento ativo do ar	2025

3.2 RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS POR MALDI-TOF MS E SEQUENCIAMENTO DA PORÇÃO ITS

Os resultados da identificação estão apresentados na Tabela 2. Das 20 linhagens analisadas, apenas seis (30,0%) foram identificadas com alta confiança pelo MALDI Biotyper[®], sendo duas leveduras e quatro fungos filamentosos. As duas leveduras foram identificadas como *Rhodotorula mucilaginosa*. Dentre os fungos filamentosos, dois foram identificados como *Penicillium chrysogenum* e dois como diferentes espécies do gênero *Aspergillus*: *A. versicolor* e *A. unguis*. A identificação desses gêneros possui relevância em ambientes industriais e farmacêuticos, uma vez que são frequentemente associados à contaminação ambiental e de áreas limpas (Leite *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2022; 2023; Soares *et al.*, 2024). Além disso, espécies pertencentes a esses gêneros apresentam elevada capacidade de dispersão aérea por meio de conídios, favorecendo sua persistência em ambientes monitorados (Normand *et al.*, 2017).

Tabela 2 – Resultados de identificação das linhagens fúngicas no MALDI Biotyper® e sequenciamento da região ITS.

Linhagem	Identificação por MALDI-TOF MS (escore)	N.º de acesso das sequências ITS no NCBI	Resultados de identificação por sequenciamento da região ITS (% de identidade) após comparação com a base de dados Mycobank	Gênero identificado (MALDI-TOF MS ou sequenciamento de ITS)
L01/22	Não identificado (1.52)	PZ523021	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (99,81)/ <i>R. evergladiensis</i> (99,81)	<i>Rhodotorula</i>
L02/24	Não identificado (1.43)	PZ529500	<i>Candida spenceri</i> (97,56)*	<i>Candida</i>
L06/24	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (1.82)	Indisponível	<i>Pezizaceae</i> sp. (100,00)/ <i>Terfezia arenaria</i> (100,00)/ <i>Tirmania nivea</i> (100,00)	Inconclusivo
L14/24	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2.18)	Não realizado	Não realizado	<i>Rhodotorula</i>
L15/24	Não identificado (1.47)	PZ529018	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (89,97)**	Inconclusivo
L17/24	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2.00)	Não realizado	Não realizado	<i>Rhodotorula</i>
L05/25	Não identificado (1.29)	PZ529210	<i>Candida atlantica</i> (88,89)**	Inconclusivo
F12/19	<i>Penicillium chrysogenum</i> (1.96)	Não realizado	Não realizado	<i>Penicillium</i>
F13/19	Ausência de picos (0.0)	PZ517637	<i>Penicillium corylophilum</i> (100,00)/ <i>P. adametzioides</i> (99,81)/ <i>P. glabrum</i> (99,81)/ <i>P. humuli</i> (99,81)/ <i>P. velutinum</i> (99,62)/ <i>P. rubefaciens</i> (99,62)	<i>Penicillium</i>
F18/20-1	<i>Aspergillus montivivensis</i> (1.7)	PZ519642	<i>Penicillium corylophilum</i> (100,00)/ <i>P. humuli</i> (99,83)/ <i>P. glabrum</i> (99,83)/ <i>P. albidum</i> (99,83)/ <i>P. consobrinum</i> (99,66)/ <i>P. fagi</i> (99,66).	<i>Penicillium</i>
F18/20-3	Não identificado (1.22)	PZ519833	<i>Penicillium corylophilum</i> (100,00)/ <i>P. albidum</i> (100,00)/ <i>P. chloroleucon</i> (100,00)/ <i>P. chrysogenum</i> (100,00)/ <i>P. fagi</i> (100,00)/ <i>P. velutinum</i> (99,81)/ <i>P. rubefaciens</i> (99,80)	<i>Penicillium</i>
F26/20	<i>Aspergillus versicolor</i> (1.91)	Não realizado	Não realizado	<i>Aspergillus</i>
F30/20	<i>Penicillium chrysogenum</i> (1.96)	Não realizado	Não realizado	<i>Penicillium</i>
F31/21	<i>Aspergillus unguis</i> (2.25)	Não realizado	Não realizado	<i>Aspergillus</i>
F19/23	Não identificado (1.48)	PZ530072	<i>Penicillium corylophilum</i> (99,80)/ <i>P. corylophilum</i> (99,63)/ <i>P. fagi</i> (99,63)/ <i>P. chrysogenum</i> (99,62)	<i>Penicillium</i>
F233/24-1	Não identificado (1.28)	PZ527701	<i>Penicillium rubens</i> (100,00)/ <i>P. fimorum</i> (100,00)/ <i>P. chrysogenum</i> (100,00)/ <i>P. dipodomyicola</i> (100,00)/ <i>P. oxalicum</i> (100,00)/ <i>Exserohilum rostratum</i> (100,00)/ <i>P. tardochrysogenum</i> (99,83)/ <i>P. goetzii</i> (99,83)/ <i>P. desertorum</i> (99,82)/ <i>P. dipodomyis</i> (99,65)	Inconclusivo
F78/25-1	Não identificado (1.25)	PZ523034	<i>Sarocladium glaucum</i> (100,00)	<i>Sarocladium</i>
F78/25-2	Não identificado (1.25)	PZ516963	<i>Penicillium rubens</i> (100,00)/ <i>P. chrysogenum</i> (99,83)/ <i>P. tardochrysogenum</i> (99,83)/ <i>P. goetzii</i> (99,83)/ <i>P. desertorum</i> (99,83)/ <i>P. chrysogenum</i> (99,65)/ <i>P. dipodomyis</i> (99,65)/ <i>P. notatum</i> (99,65)	<i>Penicillium</i>

DACIO, M.L.S.G.; SILVA, P.S.; ANDRADE, J.M. de; VALADÃO, T.B.; BRANDÃO, M.L.L.; COSTA, L.V. da; FERREIRA, A.S. da S.
 “Análise por MALDI-TOF MS e sequenciamento da região ITS de fungos isolados de uma indústria farmacêutica”
Revista Científica do UBM, v. 28, n. 55, 2 sem. 2026, p.188-206, e-ISSN 2764-5185

F152/25-1	Não identificado (1.22)	PZ527870	<i>P. melanoconidium</i> (100,00)/ <i>P. goetzii</i> (99,81)/ <i>P. rubens</i> (99,81)/ <i>P. chrysogenum</i> (99,81)/ <i>Trichoderma harzianum</i> (99,62)/ <i>Exserohilum rostratum</i> (99,62)	Inconclusivo
F152/25-2	Não identificado (1.22)	PZ527893	<i>Penicillium rubens</i> (99,65)/ <i>P. goetzii</i> (99,65)/ <i>P. chrysogenum</i> (99,65)/ <i>P. oxalicum</i> (99,65)/ <i>P. dipodomyicola</i> (99,65)/ <i>Aspergillus fumigatus</i> (99,65)/ <i>Exserohilum rostratum</i> (99,65)	Inconclusivo

Legenda: NCBI – National Center for Biotechnology Information. Indisponível – as sequências foram depositadas, mas o número de acesso ainda não foi disponibilizado. * - percentual de identidade abaixo do ponto de corte para identificação ao nível de espécie (99,6%). ** - percentual de identidade abaixo do ponto de corte para identificação ao nível de gênero (94,3%).

A maior parte das linhagens (70,0%) não foi identificada ou foi identificada com baixa confiança, evidenciando limitações do método para a identificação de fungos de origem ambiental. A acurácia do MALDI-TOF MS para identificação de fungos filamentosos pode ser reduzida devido a variabilidade fenotípica desse grupo de microrganismos, diferenças no estágio de crescimento, composição da parede celular fúngica e, principalmente, limitações das bibliotecas espectrais comerciais disponíveis (Moreira *et al.*, 2023a). Portanto, os resultados deste estudo indicam que a identificação de leveduras e fungos filamentosos isolados de ambientes de produção farmacêutica exige uma abordagem polifásica, ao invés da aplicação isolada de um único método. Embora o MALDI-TOF MS ofereça vantagens importantes para a rotina microbiológica farmacêutica, sua capacidade de identificação pode ser limitada quando os isolados ambientais não estão adequadamente representados nas bibliotecas de referência (Caldeira *et al.*, 2024; Moreira *et al.*, 2023a; Song *et al.*, 2024).

No contexto regulatório, esses achados são relevantes porque a identificação microbiana integra a Estratégia de Controle de Contaminação (CCS). O Anexo 1 da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) destaca que a CCS deve ser documentada, aplicada e revisada continuamente, considerando o conhecimento sobre a microbiota do ambiente produtivo (EMA, 2022). Assim, identificar corretamente um fungo não significa apenas nomear o isolado, mas gerar informação útil para investigar recorrências, apontar possíveis fontes de contaminação, avaliar a eficácia da sanitização e apoiar as análises de risco.

A literatura recente também sustenta o uso do MALDI-TOF MS como primeira linha de identificação na rotina industrial farmacêutica. Song *et al.* (2024) e Li *et al.* (2026), em estudos de caso envolvendo instalações de fabricação estéril, demonstraram que uma estratégia combinando MALDI-TOF MS e métodos moleculares pode apoiar a investigação microbiológica e o rastreamento de contaminantes. De modo semelhante, Caldeira *et al.* (2024) destacaram que o MALDI-TOF MS apresenta vantagens importantes para microrganismos de origem farmacêutica, apesar de muitos isolados de ambientes produtivos não serem identificados quando a biblioteca não contempla adequadamente a diversidade local. A expansão da base de dados associada a equipamentos de MALDI-TOF MS com linhagens representativas da microbiota real da instalação farmacêutica é uma abordagem que tem demonstrado eficácia na melhora do desempenho da técnica (Becker *et al.* 2014; Costa *et al.*, 2022b, 2024; Moreira *et al.*, 2023a).

Das 14 linhagens submetidas ao sequenciamento da porção ITS (Tabela 2), apenas uma (7,1%) foi identificada ao nível de espécie (F78/25-1), como *Sarocladium glaucum*; sete (50,0%) foram identificadas ao nível de gênero (L01/22, L02/24, F13/19, F18/20-1, F18/20-3,

F19/23, F78/25-2) e para seis (42,9%) linhagens o resultado foi considerado inconclusivo (L06/24, L15/24, L05/25, F233/24, F152/25-1, F152/25-2). Cinco linhagens fúngicas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Penicillium* (F13/19, F18/20-1, F18/20-3, F19/23, e F78/25-2), uma como *Rhodotorula* (L01/22) e uma como *Candida* (L02/14). Para as linhagens L06/24, F233/24, F152/25 (1 e 2), os resultados foram inconclusivos, uma vez que as possíveis identificações corresponderam a espécies de diferentes gêneros, como *Pezizaceae*, *Terfezia* e *Tirmania* para a linhagem leveduriforme (L06/24) e *Penicillium*, *Aspergillus* e *Exserohilum* para F233/24, F152/25-1, F152/25-2. Além disso, duas linhagens apresentaram identificações com percentual de identidade abaixo do ponto de corte para identificação ao nível de espécie ($\geq 99,6\%$), sendo L15/24 (*Rhodotorula mucilaginosa*, 89,97%) e L05/25 (*Candida atlantica*, 88,99%). Esses resultados indicam que o ITS direciona a identificação, mas apresenta resolução limitada para a delimitação de espécies em grupos taxonomicamente próximos, especialmente dentro do gênero *Penicillium* (Vu *et al.*, 2019; Visagie *et al.*, 2014), sendo necessário buscar outros marcadores, ou até mesmo o sequenciamento do genoma completo (SGC) para atingir a identificação ao nível de espécie (Visagie *et al.*, 2014; Houbraken *et al.*, 2020).

Entre os marcadores adicionais recomendados, a β -tubulina, frequentemente representada pelo gene *BenA*, codifica uma proteína estrutural dos microtúbulos e apresenta maior variabilidade do que o ITS em diversos grupos de *Penicillium*, sendo considerada um marcador secundário importante para separar espécies próximas dentro desse gênero. A calmodulina, codificada pelo gene *CaM*, e o *RPB2*, que codifica a segunda maior subunidade da RNA polimerase II, também são empregados para auxiliar na delimitação de espécies (Houbraken *et al.*, 2020; Samson *et al.*, 2014; Visagie *et al.*, 2014). A abordagem multilocus aumenta a acurácia da identificação porque compara regiões independentes do genoma e reduz o risco de atribuir uma espécie incorreta ao isolado analisado (Houbraken *et al.*, 2020; Samson *et al.*, 2014; Visagie *et al.*, 2014).

Diante do exposto, a ausência da análise de marcadores moleculares adicionais à região ITS constitui uma limitação do presente estudo, assim como a não realização da caracterização macro e micromorfológica das colônias e de suas estruturas reprodutivas. Embora a identificação convencional de fungos filamentosos, baseada na avaliação dessas características fenotípicas, apresente limitações para sua aplicação na rotina da indústria farmacêutica, em razão do tempo necessário para sua execução e da dependência de profissionais especializados, ela permanece como um componente essencial da abordagem taxonômica desses microrganismos e um importante complemento aos métodos moleculares para a obtenção de identificações mais robustas e confiáveis.

A linhagem F78/25-1 foi identificada ao nível de espécie, como *Sarocladium glaucum*, com 100,00% de similaridade. O gênero *Sarocladium* inclui fungos ambientais associados a solo, água, plantas e ambientes internos, podendo ser recuperado em programas de monitoramento microbiológico. Em ambiente farmacêutico, esse achado é relevante por evidenciar a diversidade de fungos filamentosos presentes em áreas produtivas ou monitoradas, reforçando a importância da identificação molecular para melhor compreensão da microbiota ambiental (Moreira *et al.*, 2023b; Sandle, 2021; Sutton, 2010).

Considerando os resultados obtidos por ambas as metodologias, os gêneros mais encontrados foram *Penicillium*, dentre as linhagens de fungos filamentosos, e *Rhodotorula*, dentre as linhagens leveduriformes, o que corrobora os resultados obtidos por outros autores, quanto a linhagens fúngicas isoladas de áreas limpas farmacêuticas (Soares; Amorim-Neto; Cogo-Müller, 2024; Leite *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2023b; Sandle, 2021). No entanto, a identificação ao menor nível taxonômico de espécies desses gêneros ainda representa um desafio, sendo necessária uma abordagem polifásica para atingir esse objetivo, envolvendo uma análise *multilocus*, ou até mesmo, o SGC.

No contexto do controle de qualidade farmacêutico, a identificação dessas linhagens contribui para a investigação de tendências, rastreabilidade de contaminantes e avaliação de possíveis fontes de entrada ou permanência de fungos no ambiente. A predominância de *Penicillium* entre as linhagens estudadas reforça a importância do monitoramento de fungos filamentosos em áreas controladas, especialmente por sua capacidade de dispersão aérea e persistência ambiental. Assim, o sequenciamento da região ITS, mesmo com limitações para a diferenciação de espécies próximas, mostrou-se uma ferramenta relevante para apoiar a identificação preliminar de isolados fúngicos e fortalecer a estratégia de controle microbiológico no ambiente farmacêutico (EMA, 2022; Moreira *et al.*, 2023b; Sandle, 2021).

O Anexo 1 das Diretrizes de BPF da EMA estabelece que os microrganismos isolados do monitoramento ambiental de áreas limpas classificadas como graus A e B, destinadas às operações de envase asséptico de produtos estéreis e consideradas as de maior criticidade, devem ser identificados até o nível de espécie. O documento também recomenda a identificação, nesse mesmo nível taxonômico, de bactérias produtoras de esporos e fungos isolados de áreas classificadas como graus C e D, onde são realizadas etapas de preparo de soluções e a lavagem de materiais, por se tratar de microrganismos com maior resistência aos processos de limpeza e desinfecção e, conseqüentemente, mais difíceis de serem eliminados (EMA, 2022). Nesse contexto, a disponibilidade de métodos rápidos e confiáveis para a identificação de fungos ao nível de espécie é fundamental para subsidiar investigações de causa

raiz de eventos de contaminação, apoiar a implementação de medidas corretivas e contribuir para a seleção e validação de desinfetantes eficazes no controle desses microrganismos (Costa *et al.*, 2026).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O MALDI Biotyper® mostrou-se útil como ferramenta inicial de triagem para identificação de fungos e leveduras ambientais de origem farmacêutica. Porém, identificou somente 30,0% dos isolados analisados com alta confiança. Esses resultados reforçam a necessidade de métodos complementares para a identificação de isolados ambientais pouco representados em bibliotecas comerciais associadas a MALDI-TOF MS.

O sequenciamento da região ITS permitiu a identificação, no mínimo, ao nível de gênero de 57,1% das linhagens, apresentando resultado inconclusivo para 42,9%, evidenciando a necessidade de buscar marcadores adicionais, como *BenA*, *CaM* ou *RPB2*, ou até mesmo o SGC, para se obter a classificação taxonômica ao nível de espécie.

Assim, a combinação entre MALDI-TOF MS e o sequenciamento da região ITS mostrou-se uma estratégia relevante para a identificação preliminar de fungos isolados em ambientes de produção farmacêutica. Apesar do ITS ser considerado o marcador universal para a identificação de fungos, não garante a resolução em nível de espécie, especialmente em grupos complexos como *Penicillium*. Esse fato evidencia a necessidade de estudos futuros envolvendo análises multilocus e/ou o SGC associados à avaliação das características macro e micromorfológicas das linhagens, ou seja, uma abordagem polifásica para atingir uma resolução taxonômica mais robusta e, consequentemente, expandir as bibliotecas espectrais locais, contribuindo para as investigações internas e análises de risco decorrentes de desvios de processo, fortalecendo assim as estratégias de controle microbiológico na Indústria Farmacêutica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coleção de Fungos do Ambiente e Saúde da Fiocruz/INCQS pelo isolamento, preservação e análise das linhagens fúngicas utilizadas neste estudo. Os autores agradecem à Plataforma de Sequenciamento por Eletroforese Capilar- Metodologia Sanger - RPT01A - Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ. Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz do qual Joyce M. Andrade é aluna de Mestrado Profissional.

Maria Luiza S. G. Dacio e Pamella S. Silva agradecem ao suporte do CNPq em forma de Bolsa referente ao Programa PIBIC/Fiocruz (Inscrição número 15262) e IC/Maré (Inscrição número 14422), respectivamente. Marcelo L. L. Brandão agradece ao suporte do CNPq em forma de Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ-C) (Processo: 304877/2024-7) e a FAPERJ em forma de Bolsa de Jovem Cientista do Nosso Estado (Processo: E-26/204.245/2025-BOLSA N.º de Matrícula: 2005.03225.2). Andressa S. S. Ferreira agradece ao suporte da Fiocruz em forma de Bolsa referente ao Programa de Pós-Doutorado Junior (Inscrição número 134).

REFERÊNCIAS

AGUSTINI, B. C. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, n. 12, p. 5645-5654, 2014. DOI: 10.1007/s00253-014-5686-7.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** v. 215, n. 3, p: 403-410, 1990. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

BECKER, P T. *et al.* Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. **Med. Mycol.**, v. 52, n. 8, p. 826-834, 2014. DOI: 10.1093/mmy/myu064.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 658, de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 31 mar. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa>. Acesso em: 10 jul. 2026.

BRUKER DALTONICS. **MALDI Biotyper® Compass User Manual**. Bruker Daltonics, Bremen, 2023.

CALDEIRA, N. G. S. *et al.* Characterization by MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing of aerobic endospore-forming bacteria isolated from pharmaceutical facility in Rio de Janeiro, Brazil. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 724, 2024. DOI: 10.3390/microorganisms12040724.

CASSAGNE, C. *et al.* Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. **Mycoses**, v. 59, n. 11, p. 678-690, 2016. DOI: 10.1111/myc.12506.

SOARES, G.; AMORIM-NETO, D. P.; COGO-MÜLLER, K. Culturable microbiological profile of a non-sterile drugs pharmaceutical production environment. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 60, e23664, 2024. DOI: 10.1590/s2175-97902024e23664.

COSTA, A. S. *et al.* Standardization of an Effective Disinfection Methodology Against Microorganisms Isolated from a Pharmaceutical Industry Facility as a Contamination Control Strategy. **Standards**, v. 6, n. 2, p. 22, 2026. DOI: 10.3390/standards6020022.

COSTA, L. V. *et al.* Assessment of VITEK® 2, MALDI-TOF MS and full gene 16S rRNA sequencing for aerobic endospore-forming bacteria isolated from a pharmaceutical facility. **J. Microbiol. Methods**, v. 194, p. 106419, 2022a. DOI: 10.1016/j.mimet.2022.106419.

COSTA, L. V. *et al.* MALDI-TOF MS database expansion for identification of *Bacillus* and related genera isolated from a pharmaceutical facility. **J. Microbiol. Methods**, v. 203, p. 106625, 2022b. DOI: 10.1016/j.mimet.2022.106625.

COSTA, L. V. *et al.* *Bacillus lumedeiriae* sp. nov., a Gram-Positive, Spore-Forming Rod Isolated from a Pharmaceutical Facility Production Environment and Added to the MALDI Biotyper® Database. **Microorganisms**, v. 12, n. 12, p. 2507, 2024. DOI: 10.3390/microorganisms12122507.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **The Rules Governing Medicinal Products in the European Union**. Volume 4: EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products. *European Commission*, Brussels, 2022. Disponível em: <https://health.ec.europa.eu/>. Acesso em: 29 maio 2026.

EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE (EDQM). European Pharmacopoeia. **European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare**, Strasbourg, 2024.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Microbiological examination of non-sterile products and related microbiological quality chapters. **European Pharmacopoeia**, Strasbourg, 2023.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Pharmaceutical Microbiology Manual. **Food and Drug Administration**, Silver Spring, 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/>. Acesso em: 29 maio 2026.

HOUBRAKEN, J. *et al.* Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera - Eurotiales: an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Stud. Mycol.**, v. 95, p. 5-169, 2020. DOI: 10.1016/j.simyco.2020.05.002.

KREMER, T.; PATEL R. Correlation between Environmental Monitoring and Product Bioburden. **Biomed. Instrum. Technol.**, v. 53, n. s2, p. 32-37, 2019. DOI: 10.2345/0899-8205-53.s2.32.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5. ed. Elsevier, Amsterdam, 2011.

LEITE, L. N. *et al.* Molecular identification and characterization of filamentous fungi and yeasts isolated in a pharmaceutical industry environment. **J. Appl. Pharm. Sci.**, v. 10, n. 7, p. 027-036, 2020. DOI: 10.7324/JAPS.2020.10704.

LI, Q. *et al.* Leveraging whole-genome sequencing for microbial contamination tracking and risk assessment in pharmaceutical manufacturing. **Front. Microbiol.**, v. 17, p. 1807989, 2026. DOI: 10.3389/fmicb.2026.1807989.

MATTOSO, J. M. V. *et al.* Quantitative and Qualitative Evaluation of Microorganism Profile Identified in Bioburden Analysis in a Biopharmaceutical Facility in Brazil: Criteria for Classification and Management of Results. **PDA. J. Pharm. Sci. Technol.**, v. 79, n. 2, p. 125-156, 2025. DOI : 10.5731/pdajpst.2023.012883.

MOREIRA, F. M. *et al.* Identificação de Fungos Filamentosos em Indústrias Farmacêuticas: Uma revisão integrativa da literatura. **Revista Científica do UBM**, v. 24, n. 46, p. 124-144, 2022. DOI: 10.52397/rcubm.v0in.46.1245.

MOREIRA, F. M. **Identificação de fungos filamentosos em uma unidade farmacêutica por sequenciamento genético das regiões ITS e D2 do DNA ribossomal e por MALDI-TOF/MS.** 2023. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Rio de Janeiro, 2023a.

MOREIRA, F. M. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF MS, sequencing of D2 LSU rRNA and internal transcribed spacer regions (ITS) for the identification of filamentous fungi isolated from a pharmaceutical facility. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 234, p. 115531, 2023b. DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115531.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool — BLAST. **National Center for Biotechnology Information**, Bethesda, 2025. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 29 maio 2026.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). GenBank Overview. **National Center for Biotechnology Information**, Bethesda, 2026. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 29 maio 2026.

NORMAND, A-C. *et al.* Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. **BMC Microbiol.**, v. 17, p. 76, 2017. DOI: 10.1186/s12866-017-0987-0.

NUNES RAMOS, J. *et al.* Challenges in the Identification of Environmental Bacterial Isolates from a Pharmaceutical Industry Facility by 16S rRNA Gene Sequences. **DNA**, v. 5, n. 3, p. 33, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/dna5030033>.

OLIVEIRA, A. A. *et al.* Desenvolvimento de uma metodologia de avaliação de criticidade de bactérias isoladas de águas em uma indústria farmacêutica produtora de imunobiológicos. p. 56. *In: RESUMOS DA XII JORNADA CIENTÍFICA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE: 08 a 12 de setembro de 2025.* Rio de Janeiro: INCQS, 2025. 101 p. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/LIVRO_2025.1_JE.pdf. Acesso em: 29 maio 2026.

RAMOS, V. B. A. *et al.* Desenvolvimento de classificação da criticidade de bactérias em monitoramento ambiental de indústria farmacêutica de imunobiológicos. *In: SIMPÓSIO DE BIOSSEGURANÇA E BIOPROTEÇÃO, 1.; SEMANA DA QUALIDADE DE BIO-MANGUINHOS, 11., 2024, Rio de Janeiro. Anais [...].* Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2025. 85 p. Disponível: <https://arca.fiocruz.br/handle/icict/76118>. Acesso em: 29 maio 2026.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Stud. Mycol.**, v. 78, p. 141-173, 2014. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.

SANDLE, T. Study of fungi isolated from pharmaceutical cleanrooms and review of likely origins. **Eur. J. Parenter. Pharm. Sci.**, v. 26, n. 2, p. 1-10, 2021. Disponível em: <https://www.ejpps.online/post/vol26-2-study-of-fungi-isolated-from-pharmaceutical-cleanrooms>. Acesso em: 29 maio 2026.

SAYERS, E. W. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2025. **Nucleic Acids Res.**, v. 53, n. D1, p. D20-D29, 2025. DOI: 10.1093/nar/gkae979.

SILVA, D. V. *et al.* Polyphasic characterization of bacteria from pharmaceutical industries and establishment of a subcollection in the Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) from Fiocruz. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE MEDICAMENTOS, 1., 2026, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Fiocruz/Bio-Manguinhos, 2026.

SOARES, G. *et al.* Culturable microbiological profile of a non-sterile drugs pharmaceutical production environment. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 60, p. e23664, 2024. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902024e23664>.

SONG, M. *et al.* A comprehensive technology strategy for microbiological identification in a pharmaceutical facility: a case study. **Front. Microbiol.**, v. 15, p. 1327175, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1327175.

SUTTON, S. The environmental monitoring program in a GMP environment. **J. GXP Compliance**, v. 14, n. 3, p. 22-30, 2010.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). General chapter <1223>. **Validation of Alternative Microbiological Methods**. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, 2026. DOI: 10.31003/USPNF_M99943_03_01.

VASCONCELLOS, L. *et al.* Phenotypical and molecular characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from a pharmaceutical facility. **Processes**, v. 14, n. 2, p. 231, 2026. DOI: 10.3390/pr14020231.

VISAGIE, C. M. *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Stud. Mycol.**, v. 78, p. 343-371, 2014. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.09.001

VU, D. *et al.* Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. **Stud. Mycol.**, v. 92, p. 135-154, 2019. DOI: 10.1016/j.simyco.2018.05.001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles**. Geneva: World Health Organization, 2011. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/>. Acesso em: 28 maio 2026.

ZHANG, Y. *et al.* Developing two rapid protein extraction methods for identification of pathogenic and environmental fungi using MALDI-TOF MS. **Front. Cel. Infect. Microbiol.**, v. 11, p. 687240, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.687240