

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Curso de Graduação em Farmácia

ANE FRANCYNE COSTA

NOVAS ABORDAGENS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE MICOSES:

O sistema MALDI-TOF MS

Florianópolis

2015

ANE FRANCYNE COSTA

NOVAS ABORDAGENS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE MICOSES:

O sistema MALDI-TOF MS

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia, apresentado ao Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para conclusão da Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II

Orientador: Prof. Jairo Ivo dos Santos

Florianópolis

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família por apoiar a minha escolha de ingressar em um curso tão desafiador e gratificante como é o curso de Graduação em Farmácia.

A minha mãe Márcia Costa e a meu pai Dauri Aristote Costa por me incentivar a sempre perseguir meus sonhos, e por colaborar em todos os aspectos para a concretização da minha formação acadêmica. A minha avó Maria Lair Costa e a meu irmão André Felipe Costa e Costa por acreditar no meu potencial e me aconselhar em todos os momentos necessários.

Agradeço especialmente aos professores do curso de Graduação em Farmácia por exigir minha dedicação ao estudo aprofundado das disciplinas ofertadas e por auxiliar na escolha do meu futuro como profissional farmacêutica.

Aos amigos que fiz durante a Graduação pelos momentos de dedicação conjunta aos estudos bem como pelos momentos de descontração que tornaram esses cinco anos muito mais agradáveis. Estes certamente terão futuros brilhantes como farmacêuticos.

Ao Laboratório Médico Santa Luzia que permitiu minha visita à rotina laboratorial do equipamento cujo qual abordarei no meu trabalho.

Por fim, agradeço ao professor Jairo Ivo dos Santos por aceitar orientar meu Trabalho de Conclusão de Curso e por ser sempre prestativo no decorrer de sua elaboração.

A todos,

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Avanços na medicina nos últimos anos permitiram que houvesse um grande aumento na sobrevivência de pacientes imunocomprometidos. Entretanto, isso levou também a um aumento significativo nas infecções fúngicas oportunistas sistêmicas, com quadros clínicos de alta morbidade e mortalidade. Isso pode ser atribuído ao número limitado de terapias eficazes e ao aumento da resistência a agentes antifúngicos nos últimos anos devido a tratamentos inadequados. Outro fator que contribuiu fortemente para o mau prognóstico dos pacientes é a dificuldade de se realizar diagnóstico precoce, que pode ser atribuída à falta de métodos diagnósticos suficientemente sensíveis e específicos. O diagnóstico laboratorial de micoses, atualmente, baseia-se na observação de elementos fúngicos retirados diretamente de amostras biológicas, na análise macroscópica e microscópica da colônia isolada, na detecção de resposta sorológica ao patógeno ou de algum marcador de sua presença e em provas bioquímicas. Além disso, avanços na biologia molecular permitem a análise da sequência gênica de fungos fenotipicamente parecidos. Essas técnicas, no entanto, apresentam algumas limitações, como o tempo de identificação, que pode levar de dias a semanas, produção insuficiente de anticorpos em pacientes imunocomprometidos, reações cruzadas com outras micoses nos testes sorológicos e falta de padronização e custo elevado nas técnicas de biologia molecular. Esses fatores podem levar a intervenção medicamentosa tardia ou equivocada, o que resulta em menor probabilidade de cura para o paciente. A análise de macromoléculas por Espectrometria de Massa por Tempo de Voo - Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) surgiu no final dos anos 1980, como uma alternativa para automatizar e acelerar o diagnóstico no laboratório de microbiologia clínica. Utilizando o sistema MALDI-TOF MS, um microrganismo desconhecido pode ser identificado por comparação de seu espectro de massa com um banco de dados de espectros de referência (BDER). O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura sobre a aplicabilidade e limitações do sistema MALDI-TOF MS no diagnóstico de infecções fúngicas. A metodologia consistiu em realizar uma revisão da literatura do tipo integrativa, com análise sistemática das publicações relacionadas ao tema. A pesquisa bibliográfica foi realizada em livros, artigos científicos e monografias por meio de consulta às bases de dados MEDLINE (PubMed), ScienceDirect e Scielo. Conclui-se que o sistema MALDI-TOF MS já está sendo adotado em laboratórios de análises clínicas em todo o mundo, inclusive para o diagnóstico laboratorial de micoses, no qual leveduras e fungos filamentosos podem ser identificados, proporcionando resultados rápidos e precisos. Além disso, existe a possibilidade de se aplicar o sistema para determinar a suscetibilidade das amostras fúngicas aos antifúngicos. O custo por análise para o laboratório utilizando o sistema MALDI-TOF MS é reduzido, no entanto, o custo de aquisição do equipamento e gastos com manutenções podem limitar o seu uso na rotina laboratorial. Previsões futuras para aperfeiçoamento do sistema incluem redução do custo de aquisição do equipamento, melhoria nos BDER, construção de uma biblioteca pública de espectros de referência, e uso do método em análise direta de amostras biológicas.

Palavras-chave: MALDI-TOF MS, fungos filamentosos, leveduras, diagnóstico laboratorial, micoses.

ABSTRACT

Medical advances in recent years allowed a large increase in the survival rate of immunocompromised patients. However, this also led to a significant increase in systemic opportunistic fungal infections, with clinical conditions of high morbidity and mortality. This can be attributed to the limited number of effective therapies and increased resistance to antifungal agents in recent years due to inadequate treatment. Another reason that strongly contributes for the poor prognosis of the patients is the difficulty to carry out early diagnosis, which can be attributed to the lack of sufficiently sensitive and specific diagnostic methods. Today, laboratory diagnosis of mycoses is based on the finding of fungal elements taken directly from biological samples, on macroscopic and microscopic analysis of the isolated colony, antibody response to the pathogen, detection of a marker of their presence and biochemical tests. Furthermore, advances in molecular biology allow the analysis of gene sequence of phenotypically similar fungi. These techniques, however, have some limitations, such as time of identification, which can take days or even weeks to accomplish, insufficient production of antibodies in immunocompromised patients, cross-reactions with other mycoses in serological tests, and lack of standardization and high cost of molecular biology techniques. These factors may lead to delayed or wrong drug intervention, which results in a lower chance for the cure of the patient. The macromolecules analysis by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) emerged in the late 1980's as an alternative to automate and accelerate the diagnosis in the clinical microbiology laboratory. Using the MALDI-TOF MS system an unknown microorganism can be identified by comparing their generated mass spectra with a database of reference spectra (BDER). The aim of this study was to conduct a literature review on the applicability and limitations of the MALDI-TOF MS system in the diagnosis of fungal infections. The methodology consisted in carrying out a literature review of the integrative type, with systematic analysis of the publications related to the topic. Literature research was performed in books, scientific articles and monographs by searching the MEDLINE (PubMed), ScienceDirect and Scielo databases. We conclude that the MALDI-TOF MS system is already being adopted in clinical laboratories throughout the world, including those used for the diagnosis of mycoses, in which yeasts and filamentous fungi can be identified, providing fast and accurate results. Moreover, there is the possibility of application of the system to determine susceptibility to antifungal agents. The cost per analysis to the laboratory using the MALDI-TOF MS system is reduced, however, the cost of the equipment and the maintenance may limit its use in routine laboratory. Future improvements for the system include reduction of the acquisition cost of the equipment, improved BDER, construction of a public library of reference spectra, and direct analysis of biological samples.

Keywords: MALDI-TOF MS, filamentous fungi, yeasts, laboratory diagnosis, mycosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo esquemático de funcionamento do MALDI-TOF MS.

Figura 2 – Equipamento que utiliza a tecnologia MALDI TOF MS – VITEK MS (bioMérieux).

Figura 3 – Isolados de bactérias e leveduras sendo retirados da cultura primária.

Figura 4 – Aplicação do isolado, extração com ácido fórmico, secagem e aplicação da matriz na placa de MALDI TOF MS.

Figura 5 – Placa de MALDI TOF MS sendo colocada no suporte e posteriormente no equipamento para análise.

Quadro 1 – Principais infecções micóticas que acometem os seres humanos no Brasil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matrizes comumente utilizadas no MALDI-TOF MS.

LISTA DE SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDER – Banco de Dados de Espectros de Referência

BHI – Infusão de Cérebro e Coração

CHCA - Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Da – Dalton

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Imunoensaio enzimático

FDA – *Food and Drug Administration*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

kDa - Quilodalton

LS – *logscore*

MALDI-TOF MS – Espectrometria de Massa por Ionização/Dessorção à Laser Assistida por Matriz - Tempo de Voo

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

MS – Espectro de Massa / Espectrometria de Massa

M/Z – Relação Massa Carga

OMPs – proteínas da membrana externa

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UV – Ultravioleta

VRE – *Enterococcus* resistentes à vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	10
2.1 GERAL.....	10
2.2 ESPECÍFICOS	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 HISTÓRICO	11
3.2 DIAGNÓSTICO ATUAL DE MICOSSES.....	13
3.3 MALDI-TOF MS	20
3.3.1 Princípio do método	20
3.3.2 Aplicações	25
3.3.3 Diagnóstico de micoses	29
3.3.3.1 <i>Leveduras</i>	29
3.3.3.2 <i>Fungos filamentosos</i>	35
3.3.4 Comparação com outros métodos diagnósticos de micoses	40
3.3.5 Custo-benefício de implementação	43
3.3.6 Teste de sensibilidade a antifúngicos	45
3.3.7 Visita a um laboratório clínico que utiliza o MALDI TOF MS	47
3.3.8 Aplicações futuras	51
4 METODOLOGIA	52
5 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

Micologia é a ciência que estuda os fungos, que são seres vivos heterótrofos que possuem distribuição mundial. Eles contam com representantes macroscópicos, como os cogumelos, e com representantes microscópicos, como as leveduras e os fungos filamentosos (BENCHIMOL E SÁ; 2004).

Ao longo do tempo, mais de 100.000 espécies de fungos foram reconhecidas e descritas. No entanto, menos de 500 destas espécies têm sido associadas com doenças em humanos, e não mais do que 100 são capazes de causar infecção em indivíduos saudáveis. O restante só é capaz de provocar doença em indivíduos debilitados ou imunocomprometidos (KAUFFMAN; 2011). Por outro lado, micoses sistêmicas são uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre pacientes imunocomprometidos, principalmente naqueles com distúrbios onco-hematológicos, câncer, receptores de transplante de medula óssea ou órgãos sólidos, e pacientes em terapia com agentes imunossupressores (DIGNANI; 2014). Entre 1996 e 2006, as micoses sistêmicas foram a décima causa mais comum de morte entre doenças infecciosas e parasitárias no Brasil. Além disso, dados mostraram que a paracoccidioidomicose foi a principal causa de morte entre as micoses sistêmicas, seguida por criptococose, candidíase, histoplasmose, aspergilose e zigomicose (PRADO *et al.*; 2009).

Essa alta taxa de mortalidade decorre, em parte, do número limitado de terapias eficazes que estão disponíveis no mercado ou está relacionada à limitação de dose devido à toxicidade do tratamento medicamentoso. Além disso, devido a tratamentos inadequados, a resistência a agentes antifúngicos vem crescendo nos últimos anos (PFALLER; 2012). Outro fator que contribui para o mau prognóstico desses pacientes é a dificuldade de diagnóstico, principalmente devido à falta de testes suficientemente sensíveis (ALEXANDER; 2002; GUIMARÃES *et al.*; 2006).

O diagnóstico de infecções fúngicas depende de uma combinação de observações clínicas e laboratoriais. Ainda que algumas lesões superficiais ou subcutâneas possam auxiliar no processo diagnóstico, muitas vezes o diagnóstico laboratorial é necessário quando diferentes microrganismos podem causar quadros clínicos similares ou ainda quando a aparência das lesões se torna atípica devido a tratamentos prévios. No caso de micoses sistêmicas, a apresentação clínica muitas vezes

não é específica e pode ser causada por um grande número de patógenos diferentes. Nestes casos, o diagnóstico definitivo é baseado quase que inteiramente nos resultados da investigação laboratorial (KAUFFMAN; 2011).

Atualmente, a identificação de fungos baseia-se na observação microscópica de elementos fúngicos retirados diretamente da amostra biológica; na análise macroscópica e microscópica de colônias cultivadas em meio micológico; na detecção de resposta sorológica ao patógeno ou de algum marcador de sua presença, como produção de anticorpos ou detecção de um constituinte da membrana fúngica; provas bioquímicas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de açúcares; ou ainda na evidência histopatológica de invasão (ALEXANDER; 2002; ANVISA; 2013; KAUFFMAN; 2011). Infelizmente, essas técnicas apresentam algumas limitações, como a dificuldade de isolamento do patógeno a partir de culturas de sangue devido a sua falta de sensibilidade (ELLEPOLA E MORRISON; 2005). Além disso, uma vez isolado, a identificação pode levar de dias a semanas, dependendo da taxa de crescimento do fungo. Pacientes imunocomprometidos podem não produzir níveis suficientes de anticorpos durante infecções agudas e testes que utilizam antígenos para o diagnóstico de infecções fúngicas ainda são escassos e podem apresentar reações cruzadas com diferentes tipos de micoses (KONCAN *et al.*; 2015; TORTORANO *et al.*; 2012). Por fim, evidência histopatológica de invasão requer amostra tecidual que, dependendo do tecido, pode ser um processo invasivo.

Recentemente, espécies fenotipicamente indistinguíveis de microrganismos puderam ser identificadas pela análise da sequência de seu DNA por meio de diferentes técnicas de biologia molecular (BALAJEE *et al.*; 2007). A análise por PCR (reação em cadeia da polimerase) é confiável e já está bem estabelecida, porém sua utilização é trabalhosa e o seu custo relativamente elevado. Há, portanto, uma necessidade para o progresso em direção a métodos mais rápidos e baratos, porém precisos, para a identificação de agentes etiológicos de doenças infecciosas.

Como uma alternativa a estes métodos de identificação utilizados atualmente, o rápido, eficaz e preciso (CASSAGNE *et al.*; 2013; NENOFF *et al.*; 2013; TAN *et al.*; 2012) método de Espectrometria de Massa por Tempo de Voo - Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (inglês: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry*), MALDI-TOF MS, tem sido amplamente utilizado nos

últimos anos para a identificação de bactérias e fungos (BILLE *et al.*; 2012; POSTERARO *et al.*; 2013). O princípio geral do MALDI-TOF MS gira em torno da rápida fotovolatilização e ionização de uma amostra biológica embebida em um ácido orgânico (matriz) após bombardeamento por um laser de radiação ultravioleta (UV), seguido pela análise da relação massa/carga (m/z) do espectro de massa (MS) gerado da amostra ionizada após seu percurso num tubo de voo. Essa técnica analisa o conteúdo proteico de células tratadas ou intactas de microrganismos sob a forma de um espectro que é considerado como uma impressão digital específica de um microrganismo. Um microrganismo desconhecido é identificado por comparação de seu espectro gerado com um banco de dados de espectros de referência (BDER).

O sistema MALDI-TOF MS já está sendo adotado em laboratórios de análises clínicas em todo o mundo (PATEL; 2013). No entanto, a sua aplicação no diagnóstico de micoses, a sua comparação com métodos tradicionais de diagnóstico laboratorial de micoses, a relação custo-benefício e a sua utilidade para determinar a suscetibilidade de fungos patogênicos a agentes antifúngicos ainda não foi completamente avaliada. Dessa maneira, esse Trabalho de Conclusão de Curso tem por objetivo fazer uma revisão da literatura sobre a aplicabilidade e limitações do sistema MALDI-TOF MS no laboratório de micologia clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Estudo de revisão da literatura do sistema MALDI-TOF MS aplicado ao diagnóstico laboratorial de micoses.

2.2 ESPECÍFICOS

- Descrição da metodologia utilizada pelo sistema MALDI-TOF MS;
- Aplicações do sistema MALDI-TOF MS em demais áreas do conhecimento, além da micologia;
- Descrição detalhada da aplicação do sistema MALDI-TOF MS para o diagnóstico laboratorial de micoses;
- Comparação do sistema MALDI-TOF MS com outras técnicas utilizadas atualmente para o diagnóstico laboratorial de micoses;
- Avaliação do custo – benefício de implementação do sistema MALDI-TOF MS na rotina laboratorial de diagnóstico de micoses;
- Avaliação da aplicabilidade do sistema MALDI-TOF MS para a determinação de suscetibilidade de fungos patogênicos a agentes antifúngicos;
- Descrição de uma visita a um laboratório de análises clínicas que utiliza o sistema MALDI-TOF MS, em sua rotina laboratorial;
- Avaliação das aplicações futuras para o uso do sistema MALDI-TOF MS, no diagnóstico de micoses;
- Descrição das limitações de implementação do sistema MALDI-TOF MS na rotina de laboratórios clínicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HISTÓRICO

Possivelmente, o registro mais antigo de uma micose está no *Atharva-veda*, um texto sagrado do hinduísmo (2000-1000 a.C.). A descrição é de um micetoma do pé que foi diferenciado da elefantíase. Já a micologia médica como um ramo distinto da medicina pode ser datada entre os anos de 1824 e 1844, período em que David Gruby publicou, em Paris, uma série artigos curtos, porém de destaque, no qual ele demonstrou de maneira convincente que quatro tipos de lesões cutâneas eram de origem micótica. Os estudos dessas lesões continuaram e ganharam grande impulso pelas pesquisas do dermatologista francês Raymond Sabouraud, que teve início nos anos 1890 e culminou com a publicação de sua importante monografia, *Les Teignes* em 1910 (WILKINSON; 1988).

Os fungos causadores de micoses subcutâneas e profundas começaram a ser observados ainda no século XIX. O médico polonês Rudolf Virchow, no ano de 1856, relatou a primeira relação traçada entre a clínica médica humana e um fungo causador de micose profunda, em um paciente com aspergilose pulmonar (SIDRIM E ROCHA; 2004).

No Brasil, a micologia desenvolveu-se, principalmente, devido à exploração de pesquisadores Europeus, no final do século XVIII, que demonstraram interesse pela flora e fauna de outros continentes, principalmente das Américas. Durante esse período, uma grande quantidade de material biológico foi coletada e, posteriormente, conservada nos locais de origem desses pesquisadores. No século XIX, durante o reinado de Dom Pedro II, técnicos estrangeiros foram convidados a atuar, no país, devido à falta de escolas e profissionais brasileiros especializados. Com o passar do tempo, os primeiros estudiosos brasileiros foram formados (BENCHIMOL E SÁ; 2004; FIDALGO; 1968) e durante os anos de 1896 e 1946, o padre Johannes Rick, considerado o pai da micologia brasileira, organizou uma coleção com 12 mil a 15 mil exsiccatas de fungos, no Colégio de Anchieta, em Porto Alegre (RS) (LACAZ *et al.*; 2002) preservando os espécimes no próprio país para fins de documentação da diversidade biológica.

A micologia médica brasileira, por sua vez, teve grande impulso com os estudos de Adolpho Lutz, no início do século XX. Em 1908, ele publicou um artigo

descrevendo detalhadamente uma micose pseudococcídica localizada na boca (LUTZ; 1908), onde ele contribuiu para o conhecimento de um novo tipo de blastomicose causada por um parasita que ainda não era classificada como fungo. Quatro anos depois o mesmo fungo foi isolado e classificado como *Zymonema brasiliensis* (SPLENDORE; 1912), posteriormente denominado *Paracoccidioides brasiliensis* por Floriano Paulo de Almeida (BENCHIMOL E SÁ; 2004). A descoberta da blastomicose sul-americana por Adolpho Lutz, atualmente conhecida como paracoccidioidomicose, foi considerada uma das mais importantes contribuições para a micologia médica (LACAZ; 1983; LACAZ *et al.*; 2002). Outra importante contribuição de Lutz foi a primeira descrição do *Sporothrix schenckii*, no Brasil (LUTZ E SPLENDORE; 1907).

Técnicas imunológicas para o diagnóstico micológico foram desenvolvidas somente após 1940, com estudos da coccidioidomicose e histoplasmose, porém, foi somente por volta de 1950, que surgiu o interesse em micoses causadas por fungos oportunistas, devido ao aumento da população imunocomprometida, seja pelo uso de medicamentos que causam um desequilíbrio no sistema imunológico como corticosteroides e citostáticos, ou pelo aumento no número de pessoas acometidas por doenças que defasam o sistema imunológico, como a AIDS (OLIVEIRA; 2014).

Metodologias que utilizam biologia molecular começaram a ser estudadas, em meados da década de 1970, e culminaram nas publicações de Sanger e Maxam-Gilbert, em 1977, as quais descreveram um método para o sequenciamento do DNA (MAXAM E GILBERT; 1977; SANGER *et al.*; 1977). Metodologias de amplificação genômica, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram aplicadas inicialmente no diagnóstico da anemia falciforme (SAIKI *et al.*; 1985). Desde então, a biologia molecular vem sendo aplicada no diagnóstico laboratorial de diversas doenças, incluindo micoses (KOURKOUMPETIS *et al.*; 2012).

Os primeiros relatos demonstrando análise com sucesso por meio da Espectrometria de Massa por Tempo de Voo - Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI MS) são do final dos anos 1980 (KARAS *et al.*; 1987; KARAS E HILLENKAMP; 1988; TANAKA *et al.*; 1988). Franz Hillenkamp, Michael Karas e Koichi Tanaka são creditados em conjunto por terem introduzido o MALDI à espectrometria de massa, e Tanaka foi um dos contemplados com o prêmio Nobel de Química, em 2002, por suas contribuições nessa área, por demonstrar que, com a combinação adequada do

comprimento de onda do laser e da matriz, uma proteína pode ser ionizada. Ele foi capaz de ionizar biomoléculas tão grandes quanto a proteína carboxipeptidase A de 34,472 Da (TANAKA *et al.*; 1988).

Em 2013, o sistema MALDI-TOF MS da empresa multinacional de biotecnologia bioMérieux, o VITEK® MS, recebeu a aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) para ser comercializado, nos Estados Unidos da América, como o primeiro sistema de espectrometria de massa para identificação automatizada de bactérias e fungos patogênicos (FDA; 2013).

3.2 DIAGNÓSTICO ATUAL DE MICOSES

Avanços na medicina que permitem a sobrevivência de pacientes imunodeprimidos, como os portadores de HIV/AIDS, pacientes que fazem uso de antimicrobianos e corticoides de maneira prolongada, pacientes transplantados de órgãos sólidos ou de medula óssea e que fazem uso de medicamentos imunossupressores, aumentaram significativamente o trabalho no laboratório de micologia clínica. Isso acontece porque esses pacientes imunocomprometidos estão sujeitos a infecções oportunistas causadas por fungos considerados anteriormente somente como contaminantes ambientais e que, portanto, tinham pouca importância clínica (ASCIOGLU *et al.*; 2002; DURDEN E ELEWSKI; 1997; LIONAKIS E KONTOYIANNIS; 2003; SILVA; 2010).

Agentes como espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e zigomicetos são agora conhecidos por causarem doença disseminada, tais como endocardites, infecções pulmonares, ceratites, entre outras, em pacientes imunocomprometidos (ANVISA; 2013). Dessa maneira, o micologista clínico deve se preocupar em identificar não somente os fungos considerados patógenos clássicos, mas também outros fungos que, em condições ideais de imunodepressão, podem levar a quadros infecciosos graves. O quadro 1 mostra as principais micoses que acometem os seres humanos, no Brasil, separando as infecções em micoses clássicas (infecções que acometem tanto pacientes imunocomprometidos como imunocompetentes) e oportunistas (dificilmente causam doença em pacientes imunocompetentes).

Quadro 1 – Principais infecções micóticas que acometem os seres humanos no Brasil.

MICOSES	
CLÁSSICAS	OPORTUNISTAS
Superficiais - Pitiríase versicolor Cutâneas - Dermatofitoses Subcutâneas - Cromomicose - Esporotricose Profundas - Paracoccidioidomicose - Histoplasmoses	Superficiais - Candidíases - Dermatomicoses Invasivas - Candidemia - Criptococose - Aspergilose - Fusariose - Zigomicoses - Outras hialohifomicoses - Feohifomicoses

Fonte: Adaptado de Anvisa (2013).

Atualmente, no Brasil, o diagnóstico laboratorial de micoses baseia-se no exame direto da amostra infectada através de análise microscópica, no isolamento do fungo após crescimento em meios de cultura apropriados para que as características morfológicas da colônia possam ser avaliadas, em provas imunológicas de reação antígeno-anticorpo e também por meio de provas bioquímicas como as de assimilação de açúcares (KAUFFMAN; 2011; OLIVEIRA; 2014).

O exame direto pode ser realizado em qualquer material infectado como pelos, cabelos, unhas, exsudatos diversos, escarro, urina, fezes, sangue, líquido, medula óssea, fragmentos de tecidos, entre outros (OLIVEIRA; 2014). O exame microscópico pode ser realizado a fresco, sem fixação, entre lâmina e lamínula e, em materiais mais densos como pelos, unha, tecido de biópsias e exsudatos espessos, a amostra biológica pode ser clarificada com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) ou ‘potassa’ entre 10-40%. Em amostras de líquido, urina, secreções ou exsudatos, o exame microscópico é realizado com tinta-da-China (tinta nanquim ou solução aquosa de nigrosina) para visualização de leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus*, que se tornam mais evidentes contra o fundo negro proporcionado pela tinta. O material também pode ser

fixado na lâmina e corado pelo método de Gram com o objetivo de diferenciar elementos fúngicos (todos os fungos são Gram-positivos) de artefatos existentes na urina, secreções e fezes. Coloração panótica (Giemsa, Leishman ou Wright) também pode ser utilizada para pesquisa de *Histoplasma capsulatum* em diversas amostras biológicas como medula óssea, sangue, aspirados e secreção cutânea (ANVISA; 2013).

O exame micológico direto é considerado o meio mais rápido e de menor custo para o diagnóstico de infecções fúngicas, porém, o exame direto é menos sensível e específico do que a cultura, ao passo que, o isolamento em cultura permite a identificação da maioria dos fungos patogênicos (MURRAY *et al.*; 2012). A maioria dos fungos não é exigente em suas necessidades nutricionais e cresce em meios utilizados para o isolamento de bactérias. No entanto, como o crescimento nestes meios pode ser lento e o desenvolvimento das estruturas utilizadas na identificação dos fungos pode ser pobre, a maioria dos laboratórios usam vários meios de cultura e diferentes condições de incubação para alcançar resultados satisfatórios (KAUFFMAN; 2011).

A escolha do meio de cultura pode ser baseada no tipo de amostra e agente etiológico, conforme a suspeita clínica ou ainda de acordo com os aspectos observados no exame microscópico direto (ANVISA; 2013). Recomenda-se que a semeadura seja realizada em dois tubos, que devem ser incubados à temperatura de 25 – 30 °C, e quando houver suspeita de fungo dimórfico um dos tubos deve ser incubado à temperatura de 35 – 37 °C para proporcionar o crescimento da fase leveduriforme (SIDRIM E ROCHA; 2004).

Os meios não seletivos permitem o crescimento de fungos patogênicos e de crescimento rápido (menor que sete dias) e podem ser utilizados para isolamento a partir de qualquer tipo de amostra. O meio mais utilizado com essa finalidade é o ágar Sabouraud dextrose, por ser barato e permitir o crescimento de quase todos os fungos, com exceção de organismos mais exigentes, tais como a fase leveduriforme do *Histoplasma capsulatum* e aqueles que não crescem em nenhum tipo de meio acelular como *Pneumocystis jiroveci*, *Lacazia loboi* e *Rhinosporidium seeberi* (KAUFFMAN; 2011; SIDRIM E ROCHA; 2004). Além disso, para impedir o crescimento de bactérias que podem prejudicar o isolamento do fungo, geralmente utiliza-se um antibiótico nos meios de cultura, como o cloranfenicol, que é resistente a autoclavação (ANVISA; 2013).

Existem ainda meios que indicam a presença de certos grupos de fungos ou determinados gêneros, como é o caso de meios presuntivos contendo compostos fenólicos (ágar contendo sementes de niger ou *Guizotia abyssinica* para *Cryptococcus* sp.) ou ágar especial para dermatófitos (*Dermatophyte Test Medium*) (DENNING *et al.*; 1990; SCHERER E KINMON; 2000). A identificação presuntiva de espécies de *Candida* spp. pode ser feita por meio de crescimento em meios onde as colônias adquirem diferentes colorações de acordo com a absorção diferencial de compostos cromogênicos por reação enzimática e colorimétrica (*Candida Medium*, *ChromAgar*, *Biggy Agar*, etc) (ANVISA; 2013; OUANES *et al.*; 2013). Outros meios recomendados são o ágar batata, para isolamento ou subcultivo de dermatófitos e meios enriquecidos com ágar BHI (Infusão de Cérebro e Coração) para fungos dimórficos de crescimento lento (maior que 15 dias) (ANVISA; 2013).

A identificação de fungos filamentosos é feita por meio da observação da morfologia da colônia e aspectos microscópicos. Na análise da colônia deve ser observada a cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio, entre outras características. A velocidade de crescimento que pode ser rápida (menor que sete dias), intermediária (entre 8 a 14 dias) ou lenta (mais de 15 dias) pode ser utilizada para a identificação presuntiva do fungo. As características micromorfológicas são melhor visualizadas em lâminas preparadas com a técnica de microcultivo, que permite a observação das estruturas microscópicas, como hifas hialinas ou demácias, septadas ou cenocíticas, forma, disposição e formação dos esporos que são, na maioria das vezes, suficientes para identificação do gênero, mas nem sempre das espécies. Também pode ser necessário o uso de provas bioquímicas para identificação de fungos filamentosos (ANVISA; 2013).

A identificação de leveduras atualmente baseia-se na micromorfologia e provas bioquímicas, uma vez que a macromorfologia de leveduras não apresenta muita diversidade e, portanto, nem sempre é um parâmetro suficiente para identificação. A pesquisa de cápsula, característica do gênero *Cryptococcus*, é feita com uma gota de tinta-da-China. As provas fisiológicas mais comuns e simples para a identificação de *Candida albicans* e *Candida* spp. são a indução do tubo germinativo e filamentação após cultivo em lâmina. A observação de hifas hialinas, ramificadas e sem fragmentação é sugestiva do gênero *Candida* e se, além disso, for observado o desenvolvimento de

clamidósporos terminais, além do tubo germinativo, a sugestão diagnóstica é de *C. albicans* ou *C. dubliniensis*. Um teste simples que pode distinguir essas duas espécies é a incubação a 45°C, uma vez que a *C. albicans* cresce bem, enquanto que a *C. dubliniensis* cresce pobremente nessa temperatura (GALES *et al.*; 1999). A presença de hifas hialinas ramificadas que podem se fragmentar em esporos, denominados arthroconídios, indica presença de espécies dos gêneros *Geotrichum* e *Trichosporon*. O restante dos gêneros e a classificação em espécies, porém, necessita de provas bioquímicas para a sua identificação como a prova de assimilação de carbono e nitrogênio ou auxanograma e a fermentação de açúcares ou zimograma (ANVISA; 2013).

Uma alternativa para obter um diagnóstico mais rápido de infecções fúngicas são os testes sorológicos. A maioria dos testes baseia-se na detecção de anticorpos contra fungos patogênicos específicos, porém os testes que detectam antígenos fúngicos estão sendo cada vez mais utilizados no laboratório clínico (KAUFFMAN; 2011). Alguns desses testes têm valor diagnóstico, como para a histoplasmose (WHEAT; 2003). No entanto, na maioria dos casos, os resultados devem ser interpretados com cautela e considerados juntamente com os resultados de outras investigações clínicas e laboratoriais, principalmente devido à alta taxa de reações cruzadas com outras micoses (KAUFFMAN; 2011).

Testes que detectam anticorpos podem ser úteis no diagnóstico de infecções fúngicas em pessoas imunocompetentes. Nesses indivíduos, a exposição ao patógeno leva ao desenvolvimento de uma resposta humoral num período de algumas semanas. Esses testes são particularmente úteis quando realizados no decorrer da doença, para detectar possíveis variações nos títulos de anticorpos (GUIMARÃES *et al.*; 2006; PATIL *et al.*; 2012). Por outro lado, em pessoas imunocomprometidas, muitas das quais não apresentam uma resposta humoral detectável à infecção, a detecção de anticorpos é menos útil e nesses casos a detecção de antígenos fúngicos é mais interessante (BARNES; 2008).

A aglutinação em látex é um método simples que pode ser usado para detecção de antígenos e anticorpos. Ela é útil principalmente no auxílio do diagnóstico da criptococose, onde é feita a pesquisa de antígenos capsulares (RIVET-DANON *et al.*; 2015; WANG *et al.*; 2015) a partir de amostras como líquido e lavado bronco-alveolar. Outra metodologia utilizada para pesquisa de anticorpos ou antígenos é a imunodifusão

em gel de agarose, ela pode ser utilizada no auxílio do diagnóstico de micoses como a paracoccidiodomicose (DEL NEGRO *et al.*; 1991), aspergilose (AZEVEDO *et al.*; 2015) e histoplasmose (GUIMARÃES *et al.*; 2006). Testes imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos ou antígenos, como o ELISA, também são úteis no auxílio do diagnóstico de micoses (ALVARADO *et al.*; 2015; CONNOLLY *et al.*; 2007).

A galactomanana é um componente polissacarídico da parede celular que é liberado de hifas em crescimento e foi originalmente identificada em espécies de *Aspergillus* como um potencial marcador de diagnóstico da aspergilose invasiva (REISS E LEHMANN; 1979). Desde então, a galactomanana tem sido amplamente utilizada para diagnosticar aspergilose pulmonar invasiva por meio de imunoenaios enzimáticos (HERBRECHT *et al.*; 2002; HUSAIN *et al.*; 2004; MARR *et al.*; 2004).

Outras opções para o diagnóstico imunológico de micoses incluem a contraimunoeletroforese (uma voltagem é aplicada através de um gel de agarose tamponado, os anticorpos carregados positivamente e os antígenos negativamente movem-se um em direção ao outro, precipitando-se ao se encontrarem), ELISA magnético (variante do ELISA), *Western Blot* (as proteínas do microrganismo são separadas por eletroforese em gel e são, subsequentemente, transferidas para uma membrana de nitrocelulose onde se realiza um ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos), hemaglutinação passiva (incuba-se diferentes diluições de soro e hemácias de carneiro previamente sensibilizadas com antígeno e forma-se uma malha de modo que as hemácias ficam em suspensão se a amostra possui anticorpos específicos), entre outros (SIDRIM E ROCHA; 2004).

A candidíase sistêmica é uma doença com alta morbidade e mortalidade (OSTROSKY-ZEICHNER E PAPPAS; 2006; PAPPAS; 2006) e que atinge com maior frequência a população hospitalizada. Hemoculturas são pouco sensíveis para candidíase invasiva. Técnicas mais recentes de hemocultura elevaram a média da sensibilidade para em torno de 70% (BERENQUER *et al.*; 1993), porém ainda existe um número significativo de pacientes que apresentam candidemia com hemocultura negativa. Por causa das dificuldades em estabelecer um diagnóstico e a utilidade limitada da hemocultura, técnicas que não necessitam de cultura tem grande valor potencial. Entre os testes diagnósticos que são aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), a detecção de 1,3- β -d-Glucana pelo ensaio de Fungitell® é

provavelmente a mais confiável, com sensibilidade e especificidade de 77% e 83%, respectivamente (DEL BONO *et al.*; 2011). O método de hibridização fluorescente *in situ* com uma sonda de ácido nucleico peptídico distingue *Candida albicans* de outras espécies de *Candida*. Esse ensaio é mais rápido do que o do tubo germinativo, porém é consideravelmente mais caro e fornece apenas um pequeno aumento na sensibilidade (WILSON *et al.*; 2005).

Novos procedimentos diagnósticos baseados na detecção de DNA fúngico em amostras biológicas estão sendo desenvolvidos e têm o potencial de melhorar o diagnóstico de micoses invasivas, porém ainda não são utilizados rotineiramente na maioria dos laboratórios clínicos (KAUFFMAN; 2011; WHITE *et al.*; 2006). Recentemente, uma revisão sistemática foi realizada para comparar o desempenho do diagnóstico de aspergilose por PCR e por testes imunoenzimáticos para identificação de galactomanana e β -D-Glucana, atingindo resultados de sensibilidade e especificidade equivalentes entre as técnicas utilizadas (WHITE *et al.*; 2015). Da mesma maneira que para a aspergilose, outro estudo visou avaliar e validar a aplicação clínica da PCR para o diagnóstico da paracoccidiodomicose, resultando em 100% de diagnósticos corretos (GAVIRIA *et al.*; 2015).

Os métodos de biologia molecular, como a PCR, ainda não estão totalmente padronizados e incluem variações nos procedimentos como a natureza da amostra (sangue total incluindo células intactas, soro ou plasma) (RIMEK *et al.*; 1998), volume da amostra, procedimentos de extração do DNA (enzimáticos ou lise mecânica das células fúngicas), escolha do gene alvo e uso de controles apropriados (MENGOLI *et al.*; 2009). Esses fatores acarretam sérios obstáculos para tornar a biologia molecular mais popular em laboratórios clínicos. Todavia, a PCR está ganhando popularidade com as plataformas automatizadas e com métodos de extração e alvos genéticos comercialmente disponíveis. Dessa maneira, assim que a técnica se torne completamente padronizada, será possível fazer comparações interlaboratoriais mais fidedignas.

3.3 MALDI-TOF MS

3.3.1 Princípio do método

Para realizar uma análise por espectrometria de massa (MS) pelo método de Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI) como um mecanismo de ionização suave, uma solução saturada de um ácido orgânico de baixa massa molecular, chamado de matriz, é adicionada a uma placa de análise juntamente com a amostra (figura 1).

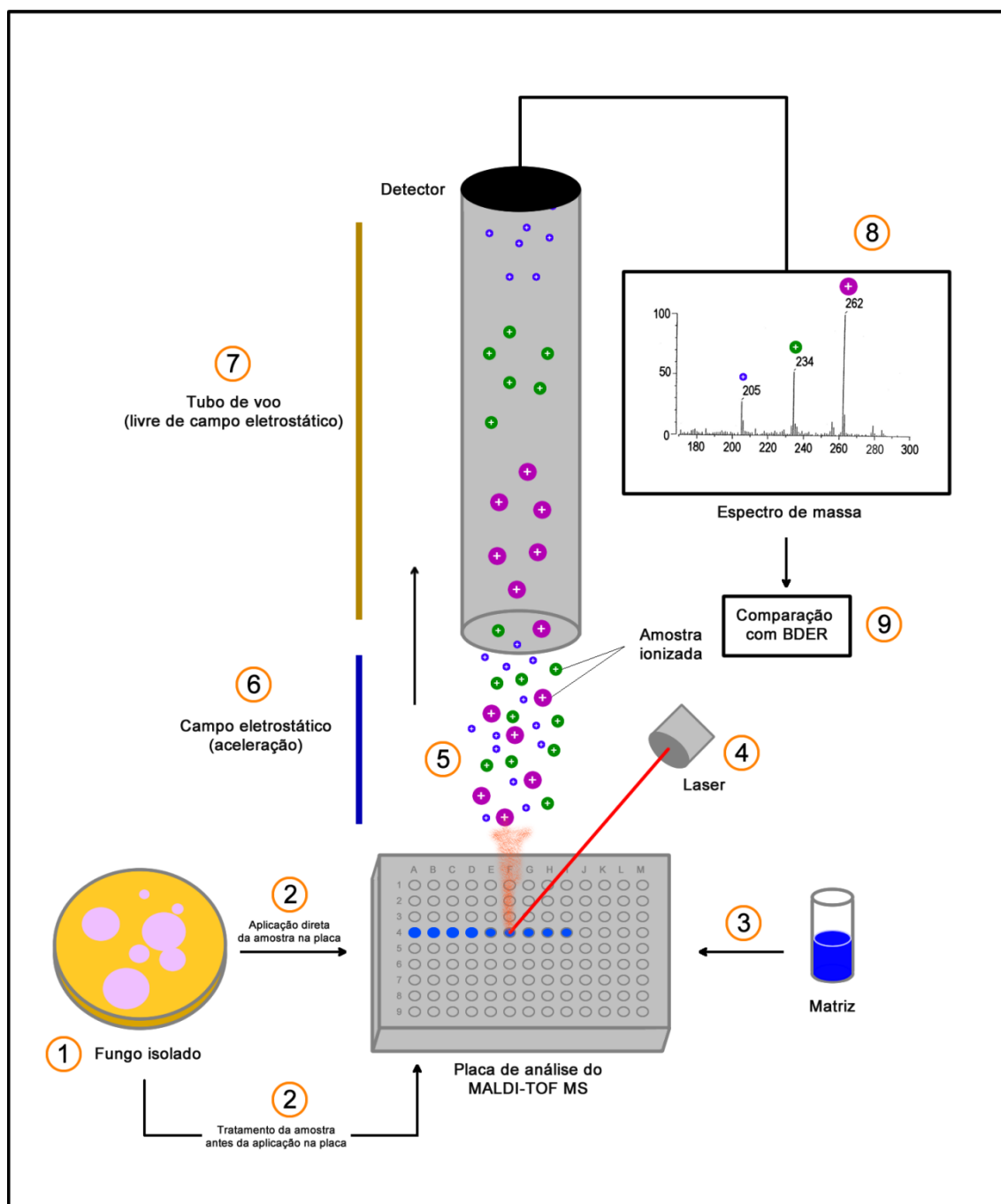
Após a secagem, a amostra e a matriz se cristalizam e formam um depósito sólido de amostra embebido em matriz. A matriz é essencial para o sucesso da ionização da amostra clínica, uma vez que ela atua tanto como suporte, por meio do qual a ionização pode acontecer, quanto como o fornecedor de prótons para a ionização do material clínico.

O cristal de amostra e matriz presente na superfície da placa é irradiado por um feixe de laser UV (geralmente um feixe de laser de N₂ com um comprimento de onda de 337 nm são utilizados em instrumentos comerciais). A irradiação ocorre durante um curto período de tempo, a fim de evitar danos ou degradação da amostra incorporada a matriz, que pode ser provocado pelo excesso de aquecimento.

O feixe de laser é focado num pequeno ponto na superfície da forma cristalizada da matriz e amostra (geralmente 0,05 a 0,2 mm de diâmetro), e um atenuador de feixe é empregado na lente do laser para ajustar a irradiação. Essa atenuação do laser pode ser ajustada individualmente para cada análise, dependendo do tipo de amostra, mas geralmente, é padronizada pelo fabricante para aplicações de rotina. A interação entre os fótons do laser e moléculas da matriz após a irradiação leva a sublimação da matriz numa fase gasosa, seguida pela ionização da amostra.

Após o bombardeamento do laser e a formação de moléculas ionizadas de amostra, ocorre a análise. Estes íons formados com carga 1⁺ com mínima fragmentação são acelerados no vácuo por meio de um campo elétrico para dentro de um tubo de tempo de voo (TOF). O tempo que cada íon leva para atingir o detector depende de sua massa e carga. Os menores íons chegam primeiro ao detector.

Figura 1 – Modelo esquemático de funcionamento do MALDI-TOF MS.



Fonte: Elaborado pela autora (2015).

Notas: O fungo é isolado (1) a partir de meio de cultura e aplicado diretamente ou após tratamento (2) sobre a placa de análise. As amostras são então cobertas com a matriz (3). Após a secagem as amostras são bombardeadas por um laser (4). Este bombardeamento resulta na sublimação e ionização do conteúdo da amostra (5). Os íons formados são acelerados em um campo eletrostático (6) e são posteriormente separados com base na sua razão massa/carga através do tempo de voo das proteínas ionizadas (7). Um espectro de massas é gerado (8) e o perfil é comparado com um banco de dados de espectros de referência (BDER) para a identificação do fungo (9).

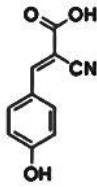
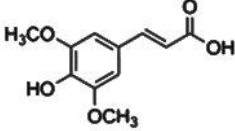
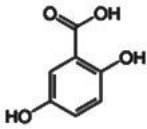
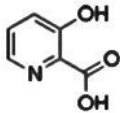
Após a detecção, uma representação espectral desses íons é gerada e analisada por um software, gerando um perfil de MS. Este perfil é subsequentemente comparado com um Banco de Dados de Espectros de Referência (BDER) e combinado a espectros idênticos ou ao espectro mais relacionado contido na base de dados, culminando assim na identificação do microrganismo contido na amostra (CLARK *et al.*; 2013; DINGLE E BUTLER-WU; 2013).

Historicamente, os processos de ionização eram limitados a analitos termoestáveis e de baixo peso molecular. Como a maioria dos compostos de interesse biológico são muito polares e têm pesos moleculares elevados, a volatilização fica comprometida, consequentemente a aplicabilidade da espectrometria de massas em amostras biológicas ficou restrita por muitos anos (GLISH E VACHET; 2003). Por essa razão, a ionização suave das proteínas tornou-se essencial para a identificação de microrganismos, atualmente, pois permite a análise de macromoléculas, incluindo proteínas ribossomais, com tamanhos de até 100 kDa (KARAS E HILLENKAMP; 1988; LAY; 2001; TANAKA *et al.*; 1988).

O conhecimento das vias de formação de íons pode contribuir para a seleção racional da matriz, uma vez que dificuldades de análise geralmente podem ser atribuídas a não incorporação do analito na fase sólida da matriz e a formação inadequada de cristais (MARVIN *et al.*; 2003). Os derivados do ácido benzoico, ácido cinâmico e outros compostos aromáticos relacionados são geralmente reconhecidos como boas matrizes para análise de proteínas (HILLENKAMP *et al.*; 1991) e também para oligossacarídeos (STAHL *et al.*; 1994). A tabela 1 apresenta um resumo das matrizes mais comumente utilizadas, suas estruturas e as moléculas de amostra para as quais melhor atuam como suporte.

A escolha da matriz é crucial para o sucesso do experimento, suas principais utilidades são: auxiliar no rompimento das células e extrair proteínas; separar as moléculas de proteínas que estão aderidas; absorver a energia do laser e provocar a dessorção das moléculas (extração da placa sólida onde estão aderidas para o estado gasoso); e doar íons H^+ para as moléculas da amostra, que se tornam íons de carga positiva (ALMEIDA JÚNIOR; 2014).

Tabela 1 – Matrizes comumente utilizadas no MALDI-TOF MS

Matriz	Estrutura	Amostra
CHCA Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico		Peptídeos
Ácido sinapínico (AS) Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico		Peptídeos, polímeros
Ácido gentísico (DHB) Ácido 2,5-dihidroxibenzoico		Peptídeos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, sacarídeos
Ácido 3-hidroxicolinólico (HPA) Ácido 3-hidroxi-2-piridinocarboxílico		Ácidos nucleicos

Fonte: Adaptado de Marvin *et al* (2003).

O exato mecanismo de ionização ainda não está bem esclarecido, porém tentativas hipotéticas de explicar esse fenômeno incluem um mecanismo de duas etapas de eventos de ionização primária e secundária. A primeira etapa desse mecanismo envolve a produção de um radical catiônico na matriz após irradiação do laser. De maneira simplificada, os fótons oriundos do laser bombardeiam a mistura matriz-amostra tornando a molécula da matriz excitada, seguida pela remoção de um elétron da matriz, gerando, dessa forma, um radical com carga positiva.

A energia de um fóton é diretamente proporcional a sua frequência de radiação (EISBERG E RESNICK; 1974), neste caso, para que a formação do radical possa acontecer, dois fótons são necessários, pois os níveis de radiação do laser são muito baixos para permitir a absorção adicional durante o período de interação entre a partícula energética ionizante do laser e a molécula da matriz, que está na escala de sub-femtosegundos (KNOCHENMUSS *et al.*; 1996; TUREČEK; 2013). Existe, no entanto, uma ressalva nesse mecanismo. Os potenciais de ionização para a matriz são muito elevados para a absorção de dois fótons, por conseguinte, uma teoria alternativa de duas etapas para geração do radical da matriz, chamado de teoria de agrupamento de energia, foi proposta. No modelo do agrupamento de energia, duas ou mais moléculas de matriz no

estado excitado produzem um radical catiônico. Essa reação é possível porque as moléculas da matriz estão densamente compactadas em estreita proximidade quando estão secas na placa de análise. Isso é exemplificado pela presença de *clusters* ou agregados de matriz na fase gasosa (KARBACH E KNOCHENMUSS; 1998).

Segundo a teoria do agrupamento de energia, quando o fóton é captado por uma molécula da matriz, esta passa para um estado excitado e transfere o fóton para uma segunda molécula da matriz, e assim, sucessivamente, havendo com isso, a formação de três produtos: um radical catiônico da matriz (com carga positiva), uma molécula da matriz que volta ao seu estado fundamental e um elétron livre.

A segunda etapa dessa teoria de ionização envolve a transferência de prótons da matriz para as moléculas da amostra clínica, resultando na ionização da amostra. Além disso, íons adicionais da amostra são formados por reações secundárias entre interações de matriz-matriz e matriz-amostra (CLARK *et al.*; 2013).

Existem, no entanto, demais teorias que tentam explicar o mecanismo de ionização primária e secundária da amostra pelo MALDI (KNOCHENMUSS; 2006), que não devem ser descartadas, pois ainda não existem dados suficientes que possam restringir o mecanismo de maneira significativa.

Uma vez ionizadas, as proteínas da amostra são analisadas pelo analisador de massa, para revelar informações características sobre a composição da amostra por meio da relação massa-carga (m/z) dos íons. Esta relação é uma medida eletrodinâmica de quão rapidamente íons da amostra carregados positivamente movem-se através do tubo de tempo de voo (TOF) para alcançar o detector. Ao ser gerado, o espectro é comparado ao BDER, o que leva a identificação microbiana (CLARK *et al.*; 2013).

A análise por tempo de voo (TOF) parte do princípio de que se um campo eletrostático é aplicado sobre a amostra ionizada, o íon com carga positiva gerado no processo anterior é acelerado, conferindo-lhe, dessa forma, certa quantidade de energia cinética. Os íons então movem-se para uma região livre de campo elétrico, onde a única força que afeta o movimento iônico é a energia cinética adquirida na etapa de aceleração. A velocidade da molécula ionizada da amostra pode, dessa maneira, ser calculada, uma vez que a voltagem aplicada e a distância percorrida no tubo de voo são

as mesmas e o tempo de voo é contabilizado (CLARK *et al.*; 2013; DRAHOS E VEKEY; 2001; VÉKEY; 1996).

O tempo de voo é diretamente proporcional a razão m/z . Íons maiores levarão mais tempo para alcançar o detector, ao passo que íons menores levarão menos tempo. Como as composições das proteínas diferem entre as espécies (e mesmo entre cepas e subespécies), espectros diferentes são gerados, permitindo a discriminação entre organismos intimamente relacionados (ALBRETHSEN; 2007; CLARK *et al.*; 2013).

Os sistemas MALDI-TOF MS mais utilizados atualmente são o sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), o Andromas (Andromas, Paris, França) o Saramis (AnagnosTec, Potsdam, Alemanha) que foi vendido em 2010 para a bioMérieux para ser incorporado no sistema VITEK MS e o VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), no entanto, outros sistemas estão disponíveis no mercado (LING *et al.*; 2014; WATROUS E DORRESTEIN; 2011).

O software MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) expressa os resultados em valores de *logscore* (LS) entre 0 e 3. Valores de LS superiores a 2,0 são classificados como suficientes para identificação segura de gênero e espécie, valores entre 1,7 e 2,0 são classificados como suficientes para identificação segura do gênero, e valores inferiores a 1,7 são considerados insuficientes. Por outro lado, os resultados produzidos pelo VITEK MS (bioMérieux) são divididos em categorias. Quando o MS obtido da análise da amostra possui boa correlação com espectros de referência o resultado é classificado como 'boa identificação' (compatibilidade entre 60 a 99,9% com um microrganismo específico), já quando a correlação é menor o resultado obtido é de 'baixa discriminação' (compatibilidade entre 60 a 99,9% com mais de um microrganismo). Por fim, quando o valor de compatibilidade é menor que 60% o resultado é inválido (ALMEIDA JÚNIOR; 2014; SBPC/ML; 2015).

3.3.2 Aplicações

O uso mais comum do MALDI-TOF MS em laboratórios de microbiologia clínica é na identificação de bactérias a partir de colônias que cresceram em meios de cultura sólidos. A técnica tem sido utilizada para identificação de bacilos Gram-negativos (FORD E BURNHAM; 2013), cocos Gram-positivos (DUBOIS *et al.*; 2010), e alguns bacilos Gram-positivos (HOTTA *et al.*; 2011).

Em 2009, foi relatado pela primeira vez que o MALDI-TOF MS foi capaz de identificar de forma eficiente bactérias diretamente de sangue coletado em frascos de cultura, com resultados obtidos em menos de duas horas após os frascos se mostrarem positivos para crescimento, com uma taxa de sucesso de 97,5% (LA SCOLA E RAOULT; 2009). Esses resultados mostram-se promissores para aplicação futura do MALDI-TOF MS na rotina de laboratórios de microbiologia clínica para o diagnóstico de infecções que debilitam o paciente rapidamente como, por exemplo, a sepse, uma vez que a escolha da terapia antimicrobiana correta para o organismo identificado é crucial para o sucesso do tratamento. Um estudo comparando o MALDI-TOF MS aos métodos microbiológicos tradicionais de diagnóstico em pacientes imunossuprimidos demonstrou que a identificação do microrganismo pelo MALDI-TOF MS levou 27,4 horas, em comparação com 46,6 horas pelos métodos tradicionais de cultura e provas bioquímicas (EGLI *et al.*; 2015).

De maneira parecida, a identificação correta e oportuna das diferentes espécies do gênero *Mycobacterium* é fundamental para garantir que pacientes infectados recebam o tratamento adequado o mais cedo possível para assegurar a cura do paciente e reduzir as chances de transmissão da doença. Um estudo descreveu um procedimento que produziu de forma reprodutível espectros de alta qualidade para esse grupo de microrganismos, o que resultou na identificação bem-sucedida de 90 espécies (87%) de 104 isolados de micobactérias usando um BDER *in house*, com 13 destes isolados identificados apenas em nível de gênero. Embora o MALDI-TOF MS tenha sido capaz de identificar os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, ele não os separou por espécie (SALEEB *et al.*; 2011). Isso demonstra que, embora o MALDI-TOF MS apresente boa sensibilidade, ele ainda apresenta falhas na identificação de alguns microrganismos, provavelmente devido a imaturidade do banco de dados.

A determinação de mecanismos de resistência ao tratamento antimicrobiano é vital para a escolha das terapias adequadas. Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), e cepas que possuem β -lactamases são exemplos de resistência bacteriana com maior significado clínico. Griffin e colaboradores (2012) distinguiram com sucesso *Enterococcus faecium* contendo VanB de isolados suscetíveis à vancomicina com sensibilidade de 96,7% e especificidade de 98,1% usando cinco picos no espectro gerado pelo MALDI-TOF MS

(GRIFFIN *et al.*; 2012). Picos específicos para MRSA foram identificados pela primeira vez em 2000 utilizando a célula intacta para fazer a análise por MALDI-TOF MS (EDWARDS-JONES *et al.*; 2000) e sua capacidade de identificar MRSA foi confirmada em estudos subsequentes (DU *et al.*; 2002; WOLTERS *et al.*; 2011).

O MALDI-TOF MS também foi avaliado para a detecção de resistência à carbapenêmicos entre cepas de *Klebsiella* spp. As porinas servem como canais na membrana externa de bactérias Gram-negativas que permitem a difusão de moléculas (incluindo antibióticos β -lactâmicos) para dentro da célula. A perda ou redução da expressão de proteínas da membrana externa (OMPs) específicas está implicada no desenvolvimento de resistência à carbapenêmicos. Uma destas OMPs, a OmpK36, foi identificada como uma das principais porinas da membrana de *K. pneumoniae* (TSAI *et al.*; 2011). Em um estudo de oito isolados de *K. pneumoniae* resistentes à carbapenêmicos e um isolado de *K. oxytoca*, a perda de OmpK36 foi investigada usando MALDI-TOF MS. Picos específicos foram identificados para indicar a presença de OmpK36 e cepas previamente determinadas como deficientes em OmpK36 foram identificadas (CAI *et al.*; 2012).

A resistência à carbapenêmicos também pode se dar devido à produção de carbapenemases. Um estudo validou um método utilizando MALDI-TOF MS para detectar a resistência à carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* mediada pela produção de carbapenemases (HRABAK; 2015). Um total de 121 cepas, incluindo 30 cepas produtoras de carbapenemases foram estudadas. A sensibilidade do método foi de 96,67%, com uma especificidade de 97,87%. Esses resultados demonstram o potencial do método em ser utilizado rotineiramente para detectar carbapenemases em *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Além de seu potencial no laboratório de microbiologia clínica, o MALDI-TOF MS também pode ser usado como um instrumento de investigação preliminar para caracterizar marcadores proteicos de doenças como câncer, Alzheimer, artrite, alergias, entre outros (MARVIN *et al.*; 2003).

Câncer é uma das principais doenças humanas crônico-degenerativas e micoses invasivas ainda representam um problema grave, com risco de morte, para pacientes com distúrbios onco-hematológicos e tumores sólidos (DIGNANI *et al.*; 2014). Os perfis

genômicos e proteômicos das células cancerosas são extremamente complexos e os marcadores tumorais são amplamente utilizados para o rastreamento, diagnóstico, estadiamento, prognóstico, monitoramento da resposta ao tratamento, e detecção da doença recorrente. Valério e colaboradores (2001) usaram o potencial do MALDI-TOF MS de identificar proteínas para analisar soros de pacientes com doenças pancreáticas (câncer de pâncreas e pancreatite crônica) e pacientes saudáveis. No estudo, foi identificada a presença de alguns peptídeos relacionados com as doenças pancreáticas, que não foram observadas em pacientes saudáveis. Por outro lado, fragmentos encontrados em pacientes saudáveis estavam ausentes em pacientes doentes (VALERIO *et al.*; 2001). Essa distinção entre o perfil proteico de pacientes saudáveis e doentes permitiu que um teste clinicamente útil para o diagnóstico de câncer de esôfago com base na análise estatística de espectros provenientes de amostras de plasma fosse desenvolvido, resultando em sensibilidade e especificidade de 79% (SCHWACKE *et al.*; 2015). Além disso, o MALDI-TOF MS também mostrou resultados promissores na investigação de câncer de mama (HEGER *et al.*; 2014), ovário (PARK; 2007), colorretal (XING *et al.*; 2013), pulmão (YILDIZ *et al.*; 2007), melanoma metastático, entre outros (MATHAROO-BALL *et al.*; 2007)

Uma característica do MALDI-TOF MS é a sua capacidade de detectar macromoléculas em misturas complexas na presença de grandes excessos molares de sais e tampões. Por essa razão, ele é uma ferramenta de alto desempenho, capaz de realizar a triagem de proteínas quimicamente modificadas em pequenos volumes de fluidos corporais, como o líquido (WESTMAN *et al.*; 1998). Várias proteínas ligadas à doença de Alzheimer foram encontradas em concentração femtomolar em um estudo no qual se comparou o líquido de pacientes com doença de Alzheimer e demência frontotemporal, usando-se uma combinação de radioimunoensaio e MALDI-TOF MS (NILSSON *et al.*; 2001; SICKMANN *et al.*; 2002). Atualmente, o diagnóstico da doença de Alzheimer é baseado na observação dos sinais clínicos dos pacientes e a distinção da doença de outros tipos de demência é complicada (KANTARCI; 2014). Portanto o diagnóstico laboratorial pelo MALDI-TOF MS desse tipo de doença neurodegenerativa, principalmente na fase inicial da doença, pode ser bastante útil.

Outras aplicações do MALDI-TOF MS incluem a pesquisa de anticorpos em pacientes com artrite reumatoide no estágio inicial (SAULOT *et al.*; 2002); identificação

de espécies de *Leishmania* (CASSAGNE *et al.*; 2014); pesquisa de alérgenos alimentares (OU *et al.*; 2001; TERHEGGEN-LAGRO *et al.*; 2002); genotipagem de polimorfismos em nucleotídeos (SAUER E GUT; 2002; TOST *et al.*; 2002); estudos biofarmacêuticos de novos medicamentos a base de proteínas e peptídeos (KAFKA *et al.*; 2011); diagnóstico rápido de pacientes com depressão maior (HUANG *et al.*; 2013); e muitas outras.

3.3.3 Diagnóstico de micoses

3.3.3.1 Leveduras

A parede celular de fungos é constituída principalmente por quitina e glucanas (BOWMAN E FREE; 2006). Esses componentes formam uma rede compacta e rígida por meio de ligações cruzadas, o que pode ser um impasse para a análise de proteínas citoplasmáticas por MALDI-TOF MS. Em alguns casos um solvente pode ser adicionado à matriz para lisar as células (QIAN *et al.*; 2008), porém, devido a sua natureza rígida, as células fúngicas podem não ser lisadas de maneira ideal (BADER *et al.*; 2011). Por essa razão, um tratamento prévio da amostra geralmente é requerido para a obtenção de resultados satisfatórios.

Quatro procedimentos de pré-tratamento foram comparados para a identificação por MALDI-TOF MS de 103 isolados de leveduras patogênicas (27 espécies de 8 gêneros) recuperadas de amostras clínicas que cresceram em ágar Sabouraud ou meio cromogênico, após incubação por 48 horas, a 30 °C (CASSAGNE *et al.*; 2013). O primeiro procedimento consistiu de um esfregaço descrito pelo fabricante (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics), onde uma camada fina da colônia foi colocada na placa de análise para secar. O segundo procedimento consistiu de uma extração com ácido fórmico, também descrito pelo fabricante, nesse procedimento uma camada fina da colônia foi colocada na placa e, após a secagem, a amostra foi coberta com 1 µL de ácido fórmico 70% e deixou-se secar. No terceiro procedimento descrito pelo fabricante, foi realizada uma extração completa com ácido fórmico e acetonitrila, onde uma colônia foi retirada do meio e suspensa em 300 µL de água estéril em um tubo, no qual foi adicionado 900 µL de álcool etílico anidro. Após dois minutos de centrifugação a 13,000 rpm o precipitado foi ressuspensionado com 10 µL de ácido fórmico 70%, após isso 10 µL de acetonitrila 100% foi adicionado. Após segunda centrifugação, 1 µL do sobrenadante foi depositado sobre a placa para secagem. Finalmente, o quarto procedimento consistiu de uma versão modificada do terceiro procedimento no qual o precipitado, após a

primeira centrifugação, foi incubado com ácido fórmico por 5 minutos antes da adição de acetonitrila e por 5 minutos após adição de acetonitrila antes da segunda centrifugação, o restante foi idêntico ao terceiro procedimento. Independentemente do procedimento utilizado, após a secagem na placa, as amostras foram cobertas com 1 μ L de matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) solubilizada em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético.

Nesse estudo a proporção de identificações corretas superou 85% a partir de amostras provenientes do ágar Sabouraud (85,4%, 89,3%, 98%, e 97,1) e do ágar cromogênico (94,2%, 92,2%, 99% e 97,1), com os métodos 1,2,3 e 4, respectivamente, mesmo com LS baixos ($LS < 2$). Porém, como o fabricante determina que é necessário um LS alto para garantir confiabilidade na identificação ($LS \geq 2$), as taxas de identificações obtidas a partir dos procedimentos 3 e 4 foram superiores ($> 77\%$), enquanto os resultados para os procedimentos 1 e 2 foram inferiores ($< 40\%$) (CASSAGNE *et al.*; 2013). Portanto, processos de extração completa parecem ser mais confiáveis para a identificação de leveduras por MALDI-TOF MS.

Theel e colaboradores (2012) também chegaram a resultados parecidos adicionando 1 μ L de ácido fórmico 70% antes da adição da matriz sobre noventa isolados de leveduras, no qual 95,6% dos gêneros e 81,1% das espécies foram identificadas por MALDI-TOF MS utilizando um LS acima de 1,7, porém quando foi utilizado um LS maior (≥ 2) a taxa de identificações corretas dos gêneros foi de 82,2%, enquanto a taxa de identificação das espécies foi de 41,1% (THEEL *et al.*; 2012).

O método mais simples adicionando ácido fórmico 70% diretamente sobre as amostras na placa reduz o custo com reagentes e o tempo de processamento. No entanto, para atingir taxas aceitáveis de identificação os valores de LS precisaram ser reduzidos. Por outro lado, para a identificação de leveduras na rotina de laboratórios clínicos um valor de *cut off* de 1,7 é considerado adequado, pois a maioria dos erros de identificação estão associados com valores menores que 1,7 independentemente do método de preparação da amostra utilizando o MALDI Biotyper (THEEL *et al.*; 2012; VLEK *et al.*; 2014).

Para a análise de 175 leveduras com o VITEK MS (bioMérieux) uma colônia isolada foi aplicada sobre a placa e lisada com 0,5 μ L de ácido fórmico 25%. Após a

secagem foi adicionado 1 µL da matriz CHCA sobre a amostra. A identificação de espécies foi considerada confiável quando uma única espécie foi obtida com nível de confiança acima de 95%. Nesse estudo o VITEK MS foi capaz de identificar 94,28% das espécies, o restante não foi identificado porque as espécies não estavam incluídas no BDER do equipamento (DURAN-VALLE *et al.*; 2014). Utilizando a mesma metodologia outro estudo obteve 95,8% de identificações corretas das espécies utilizando o VITEK MS (IRIART *et al.*; 2012).

Infeções por espécies de *Candida* são um problema em pacientes imunocomprometidos (OSTROSKY-ZEICHNER E PAPPAS; 2006). As principais espécies responsáveis por causar candidíase nesses pacientes são a *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr* e *Candida krusei*, no entanto, cerca de 40 espécies diferentes de *Candida* podem infectar humanos (LACROIX *et al.*; 2014). É importante que essas espécies de *Candida* não-*albicans* sejam devidamente identificadas, pois elas podem apresentar perfis variados de susceptibilidade à antifúngicos (CLARK *et al.*; 2013). Um grupo em Paris utilizou dois sistemas MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper e Andromas) para identificar 1383 isolados de *Candida* provenientes da rotina laboratorial de oito hospitais (LACROIX *et al.*; 2014). Ambos os sistemas foram capazes de identificar de forma correta 98,2% das espécies. Três isolados foram identificados de maneira errônea pelo Andromas, enquanto cinco isolados tiveram identificação equivocada pelo MALDI Biotyper. As espécies que não tinham espectros no BDER dos equipamentos (*C. fabianii* e *C. magnoliae* no Andromas e *C. fabianii*, *C. bracarensis*, *C. sphaerica*, *C. ethanolica* e *C. fermentati* no MALDI Biotyper) não puderam ser identificadas. Entretanto, os espectros dessas espécies podem ser adicionados ao BDER desses sistemas quando as espécies tem identificação confirmada por biologia molecular. Com atualizações constantes desses BDER, diversas espécies podem ser identificadas, inclusive as mais incomuns.

As leveduras também podem ser recuperadas diretamente de hemoculturas positivas. O tratamento da hemocultura em um estudo envolveu a suplementação com dodecil sulfato de sódio 0,5% e mistura em vórtex por 1 minuto, seguido de centrifugação a 12,000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 1 ml de água deionizada. O restante do processo foi o mesmo para a extração completa com ácido fórmico e acetonitrila. Nesse experimento, espécies

de *Candida* não-albicans foram analisadas com o MALDI Biotyper e 19 de 21 hemoculturas positivas foram devidamente identificadas (uma hemocultura positiva para *Candida lipolytica* foi identificada como *C. glabrata* e outra hemocultura positiva para *C. parapsilosis* e *E. coli* não foi identificada) (PULCRANO *et al.*; 2013). A análise diretamente de hemoculturas positivas é uma opção interessante para casos suspeitos de fungemia no qual a intenção é tratar o paciente de maneira efetiva o mais cedo possível a fim de evitar a progressão da doença. Quando a infecção é polimicrobiana, o microrganismo mais abundante é geralmente identificado pelo MALDI-TOF MS (FERRONI *et al.*; 2010). Por esse motivo, no caso de infecções causadas por mais de um microrganismo, um algoritmo mais sofisticado pode ser necessário para identificar todas as espécies.

Espécies de *Malassezia* spp. também foram analisadas com o MALDI-TOF MS da Bruker Daltonics utilizando o procedimento completo de extração preconizado pelo fabricante (KOLECKA *et al.*; 2014). Dos 165 isolados analisados, 140 espécies (84,8%) foram identificadas com $LS > 2$, enquanto 25 isolados (15,2%) restantes foram identificados com LS entre 1,7 e 2. No entanto, como avaliado previamente, valores de LS acima de 1,7 são suficientes para determinação da espécie de leveduras (THEEL *et al.*; 2012; VLEK *et al.*; 2014).

Estudos visando diferenciar *Cryptococcus neoformans* de *Cryptococcus gattii* por meio do MALDI-TOF MS foram publicados utilizando o sistema da Bruker Daltonics (MCTAGGART *et al.*; 2011; POSTERARO *et al.*; 2012). McTaggart e colaboradores (2011) utilizaram o método de extração completa com ácido fórmico e acetonitrila, porém Posteraro utilizou um método alternativo. No método descrito por Posteraro e colaboradores (2012) uma suspensão do isolado foi preparada utilizando ácido fórmico 10%, após isso, 1 μ L da mistura foi colocada na placa de análise e, após a secagem, 1 μ L de etanol absoluto foi adicionado sobre a amostra. Por fim, a matriz foi adicionada para que análise pudesse ser realizada. Os resultados obtidos por Posteraro mostraram que de 82 isolados de *Cryptococcus* (72 de *C. neoformans* e 10 de *C. gattii*), todos tiveram suas espécies devidamente identificadas e somente uma espécie de *C. Gattii* mostrou discrepancia com a subespécie determinado por técnicas de biologia molecular. Já o experimento de McTaggart também resultou na identificação inadequada de somente uma subespécie (*C. neoformans* var. *neoformans* identificado

como *C. neoformans* var. *grubii*). A análise por MALDI-TOF MS mostrou resultados adequados nos dois experimentos independentemente da técnica de extração utilizada, no entanto a técnica descrita por Posteraro foi menos trabalhosa por não envolver etapas de centrifugação e, portanto, melhor adaptável para a rotina laboratorial. O anexo 1 apresenta uma lista das leveduras identificadas nestes estudos com os sistemas MALDI TOF MS.

A comparação entre os desempenhos desses dois sistemas (VITEK MS e MALDI Biotyper) para análise de leveduras foi publicada pela primeira vez em 2013 por um grupo, na Itália (MANCINI *et al.*; 2013). Nesse estudo, 197 isolados de leveduras foram analisados pelo MALDI Biotyper utilizando o processo de extração completa com ácido fórmico e acetonitrila e pelo VITEK MS utilizando o processo de extração com ácido fórmico 25%, como já exemplificado. Dois BDER foram utilizados pelo MALDI Biotyper (o BDER disponibilizado pela Bruker Daltonics e um BDER construído *in house*), enquanto um único BDER disponibilizado pela bioMérieux foi utilizado pelo VITEK MS. Identificação com um LS acima de 2 pelo sistema comercial disponibilizado pela Bruker Daltonics foi considerada confiável e somente quando os LS ficaram entre 1,7 e 2,0 o BDER *in house* foi utilizado. Já para o sistema VITEK MS a identificação foi confiável quando o resultado apresentou 90% de confiança com nenhum resultado conflitante. O MALDI Biotyper identificou corretamente 89,8% das espécies em comparação com 84,3% das espécies identificadas pelo VITEK MS. A taxa de erros de identificação foi significativamente maior com o VITEK MS (12,1%) do que com o MALDI Biotyper (1%), porém o MALDI Biotyper foi fonte maior de identificações não confiáveis (9,2%) em comparação com o VITEK MS (3,6%). Por outro lado, todas as identificações não confiáveis pelo MALDI Biotyper foram testadas novamente utilizando o BDER *in house*, permitindo, dessa forma, identificações confiáveis. Ambos os sistemas identificaram a maioria das espécies mais comuns de leveduras recuperadas da rotina com valores altos de confiança, no entanto, as espécies mais incomuns identificadas de forma errada pelo VITEK MS também obtiveram valores altos de confiança, o que caracteriza uma desvantagem em relação ao MALDI Biotyper. Demais estudos comparando esses dois sistemas mostram uma boa correlação na identificação de espécies de leveduras quando o LS do MALDI Biotyper é reduzido para valores acima de 1,7 (CHAO *et al.*; 2014; JAMAL *et al.*; 2014; PENCE *et al.*; 2014).

Além do tratamento da amostra, outro parâmetro pré-analítico importante que deve ser levado em consideração é o tempo necessário de crescimento da colônia e quantidade de amostra para realizar a análise. Realizando um pré-tratamento de uma única colônia, retirada de ágar cromogênico, com o método de extração completa com ácido fórmico e acetonitrila, 94% de 335 isolados de leveduras foram identificados com o equipamento da Bruker Daltonics. Além disso, nesse mesmo estudo foi observado que a incubação da cultura primária por 48 e 72 horas não resultou em diferença significativa de acertos, com valores corretos de identificação de 95,1% e 96,2%, respectivamente (GOYER *et al.*; 2012).

A preferência de trabalhar com um sistema ou outro também foi avaliada (DEAK *et al.*; 2015). Os dois sistemas foram comparáveis analiticamente com taxa de identificação das espécies acima de 90%. Na maioria dos casos, ambos os instrumentos receberam boas notas pelos participantes da avaliação. No entanto, a nota média para facilidade de colocar a amostra na placa de análises foi maior para o VITEK MS, assim como a confiança dos funcionários em deixar o VITEK MS trabalhando sozinho durante uma análise e a simplificação do fluxo de trabalho. A velocidade do equipamento da Bruker Daltonics em gerar resultados foi melhor avaliada (menos de 1 hora para identificar 96), enquanto o equipamento da bioMérieux necessita de mais de 1 hora para analisar 48 isolados.

O sistema MALDI-TOF MS parece ser uma alternativa interessante para o diagnóstico rápido de leveduras recuperadas de meios de cultura e até mesmo de crescimento a partir de hemoculturas. Crescimento em meios de cultura após incubação por 48 horas é suficiente para uma análise de qualidade, no entanto, o momento pré-analítico merece atenção, pois os resultados podem variar dependendo da metodologia empregada no preparo da amostra. O melhor método de preparação da amostra é o método utilizado na construção do BDER, pois dessa forma existirá uma maior concordância entre os resultados da rotina e o banco de dados (BADER *et al.*; 2011), no caso do MALDI Biotyper geralmente é a extração, enquanto para o Andromas e para o VITEK MS a lise na placa com ácido fórmico parece suficiente. Além disso, os sistemas utilizados atualmente também podem mostrar variações nas taxas de detecções dependendo da versão e fornecedor do BDER. Portanto, a constante atualização do BDER e a validação de BDER internos ou *in house* parece ser a solução para o

problema de identificações inadequadas de espécies de leveduras menos frequentes da rotina laboratorial.

3.3.3.2 Fungos filamentosos

A identificação de fungos filamentosos pelo sistema MALDI-TOF MS mostra-se mais complicada do que a identificação de leveduras devido à grande variabilidade dos padrões de crescimento desses organismos e também devido à dificuldade de obtenção de inóculos padronizados para a análise (CLARK *et al.*; 2013). Para tanto, um estudo publicado, em 2011, teve por objetivo validar um procedimento padronizado para a identificação de fungos filamentosos pelo equipamento da Bruker Daltonics (CASSAGNE *et al.*; 2011).

Nesse estudo (CASSAGNE *et al.*; 2011), procedimentos de pré-extração e extração foram testados. O procedimento escolhido para a construção do BDER de fungos filamentosos e análises subsequentes envolveu o cultivo em ágar Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol e a incubação, por 72 horas, em temperatura de 27 °C resultando em 146 isolados que foram incluídos no BDER. As amostras (esporos e filamentos) foram colhidas por meio da raspagem suave da colônia e misturadas com 300 µL de água estéril e 900 µL de álcool etílico anidro. Após 10 minutos de centrifugação a 13,000 g, o precipitado foi incubado por 5 minutos em 10 µL de ácido fórmico 70%. Após esse período 10 µL de acetonitrila 100% foram adicionados e, 10 minutos depois, a mistura foi centrifugada por 2 minutos a 13,000 g. Após a centrifugação, 1 µL do sobrenadante foi adicionado sobre a placa em quatro posições diferentes e, em cada uma, 1 µL da solução da matriz (solução saturada de CHCA em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético) foi adicionada sobre as amostras e, após secagem, as amostras foram analisadas. Após a construção do BDER, amostras de rotina foram analisadas. Somente isolados que tiveram suas espécies identificadas por sequenciamento genético ou identificação fenotípica foram analisados por MALDI-TOF MS. Dos 177 isolados analisados, 156 estavam representados no BDER e desses, 150 (96,15%) foram corretamente identificados pelo MALDI-TOF MS. Portanto, neste experimento, um total de 87% dos isolados foram corretamente identificados pelo MALDI-TOF MS de 177 isolados analisados. Os problemas de identificação nesse experimento se resumiram a falta de espectros de referência no BDER e discordância entre os resultados das quadruplicadas de cada isolado.

Um método alternativo de preparo da amostra incluiu uma pequena modificação no procedimento de extração, onde os fungos foram suspensos utilizando um bastão de madeira esterilizado e agitados por turbilhamento em vórtex, por 15 minutos, a velocidade máxima antes da extração com álcool etílico anidro (LAU *et al.*; 2013). Nesse experimento os isolados clínicos foram obtidos a partir de diferentes meios e cresceram em temperaturas variadas, além disso, a idade das colônias variou de 2 a 7 dias. Os isolados utilizados para a construção do banco de dados foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose, a 28 °C, por cinco dias, antes da extração. Com a construção do banco de dados 370 isolados (88,9%) de 421 isolados clínicos tiveram suas espécies identificadas, enquanto somente 0,7% tiveram suas espécies identificadas pelo BDER fornecido pelo fabricante. Nesse estudo as análises não foram afetadas pelas diferentes condições de cultura, porém, a construção de um BDER mais abrangente do que o fornecido pelo fabricante foi essencial para melhores resultados. Por outro lado, mais recentemente o BDER da Bruker Daltonics (MALDI Biotyper) foi testado isoladamente após cultivo em meio líquido seguido de extração com ácido fórmico e acetonitrila obtendo identificação das espécies em 54,2% e 71,1% de 83 isolados utilizando valores de LS de 2,0 e 1,7, respectivamente (SCHULTHESS *et al.*; 2014).

Um procedimento menos trabalhoso foi testado para a identificação de fungos filamentosos raspando a superfície da colônia com um bisturi estéril e suspendendo as estruturas fúngicas, em 200 µL de água destilada. Um microlitro da suspensão foi adicionado à placa e, após secagem, cada isolado foi coberto com 1 µL de etanol absoluto. Após adição de 1 µL da matriz (CHCA), as amostras foram analisadas pelo equipamento da Bruker Daltonics. Utilizando essa metodologia 91 espécies (96,8%) de 94 isolados foram identificados corretamente pelo MALDI-TOF MS. No entanto, nove isolados que não estavam representados no BDER construído neste experimento foram excluídos da análise estatística (DE CAROLIS, POSTERARO, *et al.*; 2012), portanto dos 103 isolados analisados, 88% das espécies foram corretamente identificadas.

Esses estudos exemplificam o importante trabalho do micologista clínico em padronizar técnicas para a inclusão de espectros de referência ao sistema MALDI-TOF MS para sua utilização na rotina laboratorial, seja pelo trabalho do analista clínico no próprio laboratório ou por meio das atualizações dos BDER fornecidos pelos fabricantes, uma vez que a ampliação do BDER melhora substancialmente a

identificação de fungos filamentosos. Por outro lado, essa ampliação pode ser trabalhosa, uma vez que todos os espectros incluídos no BDER necessitam ter identificação confirmada por metodologias de referência como o sequenciamento genético do DNA fúngico ou análise fenotípica das colônias. Ademais, o momento pré-analítico, assim como para leveduras, influencia de maneira direta nos resultados da análise por MALDI-TOF MS, portanto, a procura por métodos de extração eficientes e pouco trabalhosos tem impacto direto sobre o fluxo de trabalho na identificação de fungos filamentosos por MALDI-TOF MS na rotina laboratorial.

A maturação da colônia também parece ter influência sobre o espectro gerado após a análise pelo MALDI-TOF MS. Em um estudo com membros do complexo *Pseudallescheria/Scedosporium*, a qualidade da identificação foi significativamente melhor quando as análises foram realizadas no sexto dia de incubação do que no terceiro dia (COULIBALY *et al.*; 2011). Além disso, outro estudo construiu BDER distintos e comparou-as entre si, concluindo que a combinação do maior número de espectros por cepa e o maior número de cepas por espécie obteve os melhores resultados de concordância nas identificações, com 611 (87%) de 706 isolados identificados com valores de LS maiores que 1,7 (NORMAND *et al.*; 2013). Esses resultados sugerem que a solução para resolver o problema da heterogeneidade entre membros da mesma espécie na análise por MALDI-TOF MS é construir um BDER padronizado com o maior número de cepas por espécie possível com diferentes condições de crescimento.

O desempenho do VITEK MS foi avaliado para a identificação de espécies do gênero *Aspergillus* (IRIART *et al.*; 2012). Uma porção da colônia foi raspada e colocada diretamente na placa, após isso a matriz (CHCA) foi adicionada sobre a amostra para a análise. De 44 isolados de *Aspergillus* (nove espécies ao total) analisados, 36 isolados (81,8%) foram corretamente identificados. Todavia, somente três das nove espécies analisadas foram identificadas (*A. flavus* (2), *A. fumigatus* (33) e *A. niger* (1)), pois o restante (*A. sydowi*, *A. terreus*, *A. tubingensis*, *A. calidoustus*, *A. nidulans* e *A. puniceus*) não estava no BDER do sistema. Esse foi o procedimento mais simples possível utilizado para a análise de um fungo filamentoso por MALDI-TOF MS. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar se esse procedimento é suficiente para resultar em análises satisfatórias pelo VITEK MS em espécies de demais gêneros e se o BDER do VITEK MS permite a identificação correta de outros fungos filamentosos.

Ademais, também são necessários estudos comparativos para avaliar o desempenho entre os sistemas MALDI-TOF MS na identificação de fungos filamentosos.

Mucormicose é uma doença grave que afeta principalmente pacientes imunodeprimidos causando infecções invasivas no sistema bronco-respiratório e rino-cerebral. Os fungos associados com a mucormicose são da ordem *Mucorales*, dos gêneros *Rhizopus*, *Apophysomyces*, *Mucor*, *Cunninghamella*, e *Lichtheimia* (RIBES *et al.*; 2000). Para prover um diagnóstico rápido o sistema MALDI-TOF MS da Bruker Daltonics foi utilizado para identificar espécies do gênero *Lichtheimia*, um dos agentes causadores da mucormicose (SCHRODL *et al.*; 2012). A análise foi capaz de discriminar todas as espécies clinicamente relevantes (*Lichtheimia corymbifera*, *L. ramosa*, e *L. ornata*) das irrelevantes (*L. hyalospora* e *L. sphaerocystis*) com valores de LS maiores que 1,8.

Dermatófitos causam, principalmente, micoses superficiais e raramente causam consequências mais graves, no entanto, eles estão entre as infecções mais comuns em seres humanos (FOSTER *et al.*; 2004). O diagnóstico desses fungos é muitas vezes trabalhoso e demanda tempo, portanto, técnicas que permitam a distinção entre espécies fenotipicamente parecidas, de maneira rápida, são interessantes para a identificação desses organismos na rotina laboratorial. O VITEK MS foi utilizado para identificar dermatófitos após o procedimento de extração completa com ácido fórmico e acetonitrila. Após a construção do BDER do VITEK MS usando várias cepas, tempos de incubações e condições de crescimentos variados o sistema identificou corretamente 95,4% das espécies de dermatófitos de amostras clínicas (DE RESPINIS *et al.*; 2014). Após a expansão do BDER do sistema da Bruker Daltonics com espectros obtidos a partir de diferentes condições de crescimento de 17 espécies bem caracterizadas de dermatófitos, 130 (97,8%) espécies de 133 isolados de dermatófitos foram corretamente identificados após extração com ácido fórmico e acetonitrila. Além disso, devido a necessidade de apenas uma pequena quantidade da colônia para a análise por MALDI-TOF MS, os isolados de dermatófitos puderam ser identificados três dias após a incubação, antes mesmo do aparecimento de suas características morfológicas, acelerando, dessa forma, o diagnóstico (L'OLLIVIER *et al.*; 2013).

Como já discutido anteriormente, uma das variáveis importantes para um nível satisfatório de identificação de fungos filamentosos, assim como para leveduras, é um

banco de dados de espectros de referência robusto. Geralmente a padronização de um BDER no próprio laboratório com os isolados que normalmente aparecem na rotina laboratorial melhora significativamente os resultados das análises por MALDI-TOF MS. Não obstante as espécies de fungos filamentosos frequentemente recuperados da rotina, espécies incomuns são geralmente erroneamente identificadas ou nem são identificadas devido à falta de espectros de referência nas bases de dados fornecidas pelos fabricantes ou devido à dificuldade de recuperar essas espécies da rotina para a padronização. Um estudo visou identificar espécies de *Penicillium marneffe*, *Fusarium solani*, *Pseudallescheria boydii*, e espécies do gênero *Paecilomyces* e *Rhizopus* utilizando o MALDI Biotyper (CHEN *et al.*; 2015). A análise por MALDI-TOF MS foi ineficiente para identificar as espécies de *Penicillium marneffe*, identificando em seu lugar outras espécies de fungos como o *Penicillium funiculosum*, *Penicillium rugulosum*, *Aspergillus scandidus* e *Trichophyton rubrum* com valores de LS menores que 1,7 (o que descarta esses resultados). Por outro lado, espectros desses isolados de *Penicillium marneffe* foram posteriormente adicionados ao BDER do sistema, e após análise de 28 isolados todas as espécies foram corretamente identificadas com LS maior que 1,7. Dentre as outras espécies analisadas somente um isolado de *Fusarium solani* foi identificado corretamente com LS maior que 1,7 sem a complementação do BDER. As limitações dos BDER atuais limitam o desempenho do MALDI-TOF MS, porém, é esperado que em alguns anos, com as constantes atualizações dos sistemas, até as espécies mais incomuns tenham seus espectros incluídos nos BDER dos sistemas MALDI-TOF MS. O anexo 2 apresenta uma lista dos fungos filamentosos identificados nestes estudos com os sistemas MALDI-TOF MS.

O sistema MALDI-TOF MS tem aplicabilidade, assim como para leveduras, no diagnóstico de fungos filamentosos. Fatores como a maturação da colônia e meio de cultura podem resultar em espectros diferentes, mesmo entre cepas da mesma espécie, portanto, a criação de BDER com o maior número possível de espectros por cepas e de cepas por espécie, além de cepas provenientes de diferentes meios, aumenta as chances de identificação. Além disso, outra variante importante que deve ser levada em consideração antes da análise é o preparo da amostra. Alguns autores defendem que é necessária uma extração completa com ácido fórmico e acetonitrila dos isolados para que os espectros gerados tenham qualidade, já outros acreditam que esse procedimento é muito trabalhoso e preferem uma abordagem mais simples sem etapas de

centrifugação. Não obstante, a maioria dos estudos encontrados na literatura utiliza o procedimento de extração completa. Esse fato facilita a comparação entre os diferentes estudos e a escolha do melhor método para aplicação na rotina laboratorial, uma vez que o volume de espécies estudadas utilizando o método simples de preparo da amostra é menor e não se sabe se esse método é aplicável para todos os tipos de fungos filamentosos. Por fim, estudos adicionais utilizando o sistema MALDI-TOF MS são necessários para compreender de maneira mais completa quais parâmetros pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos podem ser utilizados para que a análise resulte na identificação correta das espécies dos fungos filamentosos, para tanto, é necessário a padronização de todo o processo e a atualização frequente dos BDER dos sistemas MALDI-TOF MS.

3.3.4 Comparação com outros métodos diagnósticos de micoses

O diagnóstico laboratorial de micoses baseia-se na análise microscópica dos elementos fúngicos, na análise das características morfológicas da colônia após isolamento, provas imunológicas de reação antígeno-anticorpo e provas bioquímicas como as de assimilação de açúcares (KAUFFMAN; 2011; OLIVEIRA; 2014). A análise macroscópica e microscópica de fungos filamentosos é o método convencional utilizado para o diagnóstico desses microrganismos devido à suas distintas morfologias, no entanto, as identificações levam tempo e necessitam de um alto nível de experiência do micologista devido à variabilidade morfológica de cepas até mesmo da mesma espécie (SANTOS *et al.*; 2010). Por outro lado, as características morfológicas de leveduras não são de grande auxílio para o diagnóstico, porém as células de leveduras produzem vários metabólitos que podem ser utilizados para a identificação bioquímica (CHALUPOVA *et al.*; 2014). Por fim, a sorologia é utilizada com a intenção de acelerar o diagnóstico, pois não é necessário que o fungo seja isolado, porém essas reações podem apresentar reações cruzadas em pacientes que moram em regiões endêmicas da doença ou que possuam outras micoses (KONCAN *et al.*; 2015; TORTORANO *et al.*; 2012; ZANGENEH *et al.*; 2015).

Para comparar o sistema MALDI-TOF MS com métodos convencionais de diagnóstico, 200 isolados de leveduras recuperados da rotina laboratorial foram analisados pelo MALDI Biotyper e VITEK MS e por dois sistemas comerciais de identificação fenotípica de leveduras, o Phoenix 100 Yeast ID panel (Becton-Dickinson,

Microbiology Systems) e o VITEK 2 yeast identification card (bioMérieux) (CHAO *et al.*; 2014). De modo geral, a taxa de identificação correta para o MALDI Biotyper foi de 92,5% e para o VITEK MS foi de 79,5%. Mais especificamente para os isolados de *Candida*, 98,6% das espécies foram corretamente identificados pelo MALDI Biotyper e 87,3% pelo VITEK MS. As taxas de identificação pelo VITEK MS foram melhoradas, no entanto, quando um BDER adicional foi incluído no sistema. As novas taxas de identificações para todos os isolados de leveduras e para os isolados de *Candida* foram de 87,5% e 94,3%, respectivamente. Já na identificação fenotípica dos 200 isolados de leveduras o Phoenix 100 se saiu melhor que o VITEK 2 (89,0% vs. 74,0%), respectivamente. Para os isolados de *Candida*, o Phoenix 100 e o VITEK 2 identificaram corretamente 93,5% e 83,1% dos isolados, respectivamente. Nesse estudo, somente o MALDI Biotyper foi capaz de diferenciar espécies do complexo *Candida parapsilosis*, isso é importante clinicamente devido às diferenças em virulência e susceptibilidade a antifúngicos entre as três espécies desse complexo (BERTINI *et al.*; 2013). O desempenho do VITEK 2 foi um pouco melhor em outro estudo comparativo com os dois sistemas MALDI-TOF MS, no qual a identificação correta de leveduras pelo VITEK 2, VITEK MS e MALDI Biotyper foi de 94,1%, 93,0% e 92,6%, respectivamente (JAMAL *et al.*; 2014). De uma forma geral, a identificação pelos sistemas MALDI-TOF MS foi tão boa quanto pelos métodos fenotípicos, e ele é uma boa alternativa para a identificação de isolados normalmente encontrados na rotina, assim como para a diferenciação de espécies pertencentes a complexos.

O VITEK MS também foi comparado com outro sistema fenotípico de identificação de leveduras, o API ID32C (bioMérieux) (DURAN-VALLE *et al.*; 2014). Nesse estudo o VITEK MS foi mais sensível e específico (99,39% e 98,85%, respectivamente) do que o API (96,96% e 96,0%, respectivamente), ou seja, o VITEK MS foi capaz de identificar um maior número de isolados e apresentar menor número de identificações equivocadas de espécies incluídas no BDER, quando comparado com o API. Além disso, o diagnóstico utilizando o VITEK MS foi mais rápido, salvando 48 horas no tempo de diagnóstico. Quando o MALDI Biotyper foi comparado ao API ID32C para a identificação de espécies de *Candida*, o sistema MALDI-TOF MS identificou corretamente 96,0% das espécies, enquanto o API ID32C identificou 93,6% das espécies. Além disso, o preparo da amostra para a análise no MALDI Biotyper levou 10 minutos para cada isolado e em torno de 3 horas para o preparo de todas as 96

amostras que podem ser analisadas no equipamento por vez, já a identificação de espécies de *Candida* pelo método fenotípico necessitou de períodos de incubação de até 72 horas. (MARKLEIN *et al.*; 2009)

O diagnóstico convencional de leveduras e espécies de *Aspergillus* foi comparado ao VITEK MS e ao VITEK 2 (IRIART *et al.*; 2012). A *Candida albicans* foi identificada utilizando ágar cromogênico associado com a formação de clamidósporos terminais, *C. dubliniensis* e *C. krusei* foram identificadas por aglutinação em látex, e o restante das leveduras foi identificado por API ID32C. As espécies de *Aspergillus* foram identificadas por meio de análise morfológica. A *Candida albicans* foi identificada em 100% dos casos utilizando os métodos convencionais e o VITEK 2, enquanto o VITEK MS identificou 98,3% de *C. albicans*. As espécies de *C. krusei* e *C. dubliniensis* foram identificadas por todas as metodologias. A análise morfológica dos *Aspergillus* permitiu a identificação de 88,6% das espécies, ao passo que 81,8% das espécies foram identificadas pelo VITEK MS. De uma forma geral, 94,1% dos isolados foram identificados pelos métodos convencionais, 88,0% pelo VITEK 2 e 93,2% pelo VITEK MS.

O diagnóstico de dermatófitos pelo MALDI Biotyper foi comparado aos métodos convencionais como a análise das características microscópicas e macroscópicas da colônia. Após sete dias de incubação o MALDI-TOF MS foi capaz de identificar 80% dos isolados, e após 14 dias ele identificou 100% dos isolados, enquanto 93% dos dermatófitos foram identificados pelos métodos convencionais (PACKEU *et al.*; 2014). A identificação de dermatófitos com MALDI-TOF MS em outro estudo foi de 97,8% em um período entre 3 e 6 dias, o que foi consideravelmente mais rápido do que pelos métodos convencionais que levaram de duas a três semanas (L'OLLIVIER *et al.*; 2013).

A identificação de leveduras e fungos filamentosos pelos sistemas MALDI TOF MS é equivalente aos métodos convencionais de diagnóstico, porém ele mostra-se vantajoso na identificação rápida de espécies fenotipicamente parecidas. Essas espécies podem demandar mais tempo para serem identificadas corretamente por meio da análise das características morfológicas e fenotípicas dos fungos que, em alguns casos, são agrupados em complexos devido à dificuldade em distingui-los. A sensibilidade e especificidade na identificação dependem do tipo de fungo estudado, uma vez que os

fungos mais comuns na rotina laboratorial possuem vários espectros nos BDER dos sistemas MALDI-TOF MS, assim como nos BDER dos sistemas de identificação fenotípica, além de terem suas características morfológicas e fenotípicas mais facilmente reconhecidas pelo micologista clínico. Já para fungos mais incomuns o diagnóstico é mais difícil, no entanto, quando espectros de referência são adicionados ao BDER do sistema MALDI-TOF MS, até mesmo esses microrganismos são facilmente identificados. Dessa maneira, o sistema MALDI-TOF MS pode ser utilizado em laboratórios clínicos para a identificação rápida e precisa de fungos patogênicos fenotipicamente parecidos e até mesmo incomuns, contando que seu banco de dados de espectros de referência seja frequentemente atualizado.

3.3.5 Custo-benefício de implementação

Uma vantagem do sistema MALDI-TOF MS em relação aos métodos convencionais de diagnóstico de microrganismos é o volume mínimo de amostra necessário para a análise, que é de uma colônia isolada a partir do meio de cultura primário, enquanto outros métodos, principalmente os automatizados, necessitam de maiores volumes para a análise e também subculturas quando o teste só pode ser realizado a partir de crescimento em meios não seletivos (TAN *et al.*; 2012), o que acarreta no tempo adicional para a identificação. Já para o MALDI-TOF MS, após o crescimento do isolado, todo o processo de preparação da amostra até a análise e leitura pelo software do sistema pode levar cerca de vinte minutos (MCTAGGART *et al.*; 2011).

O impacto no tempo de identificação e custo-efetividade do MALDI-TOF MS são fatores importantíssimos para se levar em consideração quando está se pensando em implantar essa tecnologia na rotina laboratorial. Um estudo prospectivo comparou o uso do MALDI-TOF MS e métodos convencionais de diagnóstico em um total de 952 isolados da rotina, no qual 128 eram isolados de leveduras e o restante eram bactérias. Nesse estudo, a identificação dos microrganismos pelo MALDI-TOF MS foi, em média, 1,45 dias mais rápida em relação a outros métodos. Além disso, a estimativa de redução de gastos com reagentes e mão-de-obra em um período de 12 meses foi de 56,9%. Essa diferença ocorreu principalmente devido ao custo reduzido dos reagentes necessários para cada análise (\$0,79 por teste para amostras extraídas com ácido fórmico e acetonitrila) (TAN *et al.*; 2012).

Um estudo avaliando o desempenho e o custo por teste do MALDI Biotyper em relação a métodos convencionais para a análise de leveduras encontradas rotineiramente em um laboratório resultou na identificação de 96,3% das espécies, com um período médio de preparação da amostra de 5,1 minutos (extração com ácido fórmico e acetonitrila) e custo com reagentes por análise de \$0,50. Enquanto, o custo por análise do API 20C AUX, tubo germinativo e sequenciamento de DNA foi de \$6,86, \$0,80 e \$20,02, respectivamente (DHIMAN *et al.*; 2011). Outro estudo levou em consideração para a análise do custo de identificação por isolado de levedura do MALDI Biotyper o custo do equipamento, a manutenção, o uso de equipamentos adicionais (centrífuga, concentrador, micropipetas, vórtex), os reagentes/consumíveis e a mão-de-obra chegando a um valor de \$13,01 por análise, enquanto os gastos com o API ID 32C foram de \$14,00 (SENDID *et al.*; 2013).

De maneira geral, os gastos com reagentes e mão-de-obra por exame utilizando o MALDI-TOF MS são comparáveis aos gastos utilizando métodos convencionais. No entanto, quando o custo do equipamento, da manutenção e demais equipamentos utilizados no momento pré-analítico são levados em consideração, o custo por exame aumenta consideravelmente. Isso deve em parte devido ao alto preço do equipamento (\$250,000 - \$800,000) (WATROUS E DORRESTEIN; 2011) e das manutenções dos sistemas que devem ser constantes para a atualização dos BDER e para o bom funcionamento do equipamento.

A maior utilidade do sistema MALDI-TOF MS, portanto é em laboratórios com uma grande rotina laboratorial onde a redução do fluxo de trabalho e a redução de gastos adicionais com reagentes utilizados na identificação pelos métodos convencionais compensam os gastos com a aquisição do equipamento, ou ainda em laboratórios de referência onde a identificação correta de espécies fenotipicamente semelhantes é importante para a epidemiologia. Além disso, o sistema MALDI-TOF MS pode ser utilizado para a identificação de microrganismos em vários setores diferentes como a bacteriologia (RODRIGUEZ-SANCHEZ *et al.*; 2014), micologia (BADER *et al.*; 2011) e parasitologia (CASSAGNE *et al.*; 2014), atuando, dessa maneira, ainda mais para reduzir os gastos com demais equipamentos e reagentes. Por fim, um dos pontos mais atraentes da aplicação do sistema MALDI-TOF MS é a redução do tempo de diagnóstico, uma vez que internações hospitalares prolongadas são uma fonte

importante de gastos (GALAR *et al.*; 2012) e o início do tratamento correto, o mais cedo possível, aumenta as chances de sobrevivência do paciente (GAREY *et al.*; 2006).

3.3.6 Teste de sensibilidade a antifúngicos

Os principais antifúngicos usados na clínica atualmente são das classes dos polienos (anfotericina B), azóis (fluconazol, voriconazol e posaconazol) e equinocandinas (casposfungina, anidulafungina e micafungina) (BADER *et al.*; 2011). Vários mecanismos podem levar a resistência a esses medicamentos, os mais comuns sendo a indução de bombas de efluxo e a aquisição de mutações pontuais nos genes que codificam a enzima alvo do medicamento. Na prática, a resistência a antifúngicos está associada a elevadas concentrações inibitórias mínimas (MIC), piores desfechos clínicos, e piora dos sintomas durante o tratamento. (PFALLER; 2012).

Os testes de suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* atualmente são utilizados para determinar a concentração inibitória mínima de fármaco necessária para impedir o crescimento do fungo (ARIKAN; 2007). Entre os métodos comerciais comumente utilizados estão o VITEK 2 yeast susceptibility test (bioMérieux), o Sensititre YeastOne colorimetric plate (TREK Diagnostic Systems) e o Etest (bioMérieux). No entanto, apesar desses métodos serem padronizados e fáceis de usar, a leitura do resultado pode ser relativamente subjetiva e o tempo para o resultado lento (entre 24 a 48 horas) (PFALLER; 2012; VELLA *et al.*; 2013). Como alternativa, o sistema MALDI-TOF MS vem sendo estudado para determinar o índice de suscetibilidade a antifúngicos baseado no monitoramento das características proteicas das células fúngicas na presença de diferentes concentrações de fármacos (DE CAROLIS, VELLA, *et al.*; 2012; MARINACH *et al.*; 2009; SARACLI *et al.*; 2015; VELLA *et al.*; 2013).

Um método para avaliar a suscetibilidade de *Candida albicans* a fluconazol utilizando o MALDI Biotyper foi desenvolvido (MARINACH *et al.*; 2009). Após incubação das leveduras por 48 horas a 37 °C, uma quantidade padronizada (10^6 leveduras/mL) foi incubada com diferentes concentrações de fluconazol (diluições seriadas de 128 µg/mL a 0,125 µg/mL) por 15 horas a 37 °C. Após esse período as leveduras foram extraídas com ácido fórmico e acetonitrila e analisadas pelo MALDI-TOF MS. Os MS de culturas expostas até a concentração de 2 µg/mL de fluconazol foram indistinguíveis dos MS de culturas controle (sem exposição ao fluconazol), no

entanto, os MS de culturas expostas a partir da concentração de 4 µg/mL apresentaram picos distintos das maiores diluições, mostrando, dessa forma, que a composição proteica das leveduras foi alterada a partir dessa concentração. A partir disso, a menor concentração de fluconazol no qual o MS apresentou mudança foi determinada para 17 cepas de *C. albicans* com perfis de resistência variados (valores de MIC pré-determinados de acordo com o mecanismo de resistência da cepa). As concentrações onde ocorreram mudanças nos perfis do MALDI-TOF MS foram comparáveis aos MICs pré-determinados pela CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) nas cepas utilizadas em 94% e 100% dos casos utilizando variações de uma ou duas diluições, respectivamente.

A suscetibilidade a caspofungina de espécies de *Candida* e *Aspergillus* foi investigada utilizando o método descrito por Marinach *et al* (2009) com algumas modificações. Nesse estudo o MALDI-TOF MS foi utilizado para criar um índice de correlação que determina a menor concentração de caspofungina no qual o MS apresentou mudanças para avaliar o perfil de suscetibilidade de cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) e *Aspergillus* (*A. fumigatus* e *A. flavus*) com e sem resistência conhecida associada a mutações no gene *fks* (codifica o complexo enzimático Fks, alvo da caspofungina). Todos os isolados tiveram seus índices de correlação determinados pelo MALDI-TOF MS comparáveis a referência (CLSI) com um intervalo de duas diluições, e 94,1% das cepas de *Candida* foram corretamente categorizadas como resistentes ou sensíveis a caspofungina (DE CAROLIS, VELLA, *et al.*; 2012). Investigando somente a suscetibilidade de cepas de *Candida albicans* a caspofungina em outro estudo, 100% dos isolados foram corretamente classificados como sensíveis e 90,9% como resistentes, chegando a uma concordância de 98,4% com a referência (VELLA *et al.*; 2013).

Mais recentemente, o perfil de suscetibilidade de espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*) a antifúngicos azólicos (fluconazol, voriconazol e posaconazol) foi investigado utilizando o VITEK MS (SARACLI *et al.*; 2015). Utilizando o método descrito por De Carolis e colaboradores (2012) a concordância entre os testes de suscetibilidade a antifúngicos proposto pelo CLSI e o índice de correlação obtido pelo MALDI-TOF MS variou entre 54% a 97% e foi melhor para posaconazol contra *C. glabrata*, além disso a reprodutibilidade variou de 54 a 83% e foi melhor para fluconazol

contra *C. albicans* e posaconazol contra *C. glabrata*. Por outro lado, quando tolerância de 5% para os resultados do índice de correlação foi aplicada, a reprodutividade foi melhorada para 63% a 94,4%. Além disso, a reprodutividade dos resultados foi melhor para isolados de *C. glabrata* em relação a *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Poucos estudos estão disponíveis para avaliar de maneira abrangente a utilidade do sistema MALDI-TOF MS na suscetibilidade a antifúngicos. No entanto, eles demonstram que alterações nas características proteicas das células fúngicas podem ser detectadas pelo equipamento e utilizadas para estimar um índice que pode ser comparado aos valores de MIC determinados pelo CLSI para avaliar se um fungo é sensível ou resistente a um medicamento. O teste de suscetibilidade a antifúngicos utilizando o MALDI-TOF MS não originou resultados mais rápidos do que pelos métodos estabelecidos pelo CLSI (SARACLI *et al.*; 2015), com exceção do teste de suscetibilidade de *C. albicans* a caspofungina, que com um tempo de incubação de apenas três horas obteve resultados satisfatórios (VELLA *et al.*; 2013). Por fim, estudos com demais espécies são necessários para avaliar se a metodologia utilizando o sistema MALDI-TOF MS é, de fato, eficiente para determinar o perfil de suscetibilidade a antifúngicos, e se os resultados obtidos se correlacionam com a clínica.

3.3.7 Visita a um laboratório clínico que utiliza o MALDI TOF MS

Com a intenção de conhecer a rotina de diagnóstico laboratorial utilizando um sistema MALDI-TOF MS um laboratório que utiliza a tecnologia foi visitado.

A visita ocorreu no dia 06 de outubro de 2015, ao Laboratório Médico Santa Luzia (Rua Leoberto Leal – Barreiros, São José – Santa Catarina), no período de 8h30min às 11 horas da manhã. A rotina do funcionamento do equipamento VITEK MS (bioMérieux) (figura 2), desde a escolha da colônia a ser analisada até o resultado da análise, foi acompanhada nesse período.

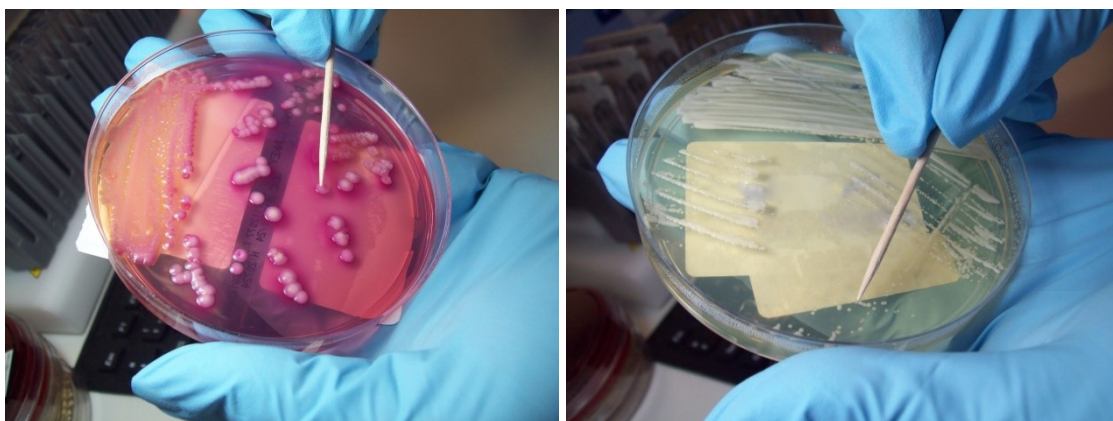
A primeira etapa para a análise pelo MALDI-TOF MS é a escolha da colônia a partir da cultura primária. Na figura 3, isolados de bactérias e leveduras são escolhidos para serem aplicados na placa de análise. As colônias isoladas com crescimento de no mínimo 48 horas são escolhidas pelo analista e o transporte de uma pequena quantidade do isolado é feito para a placa de análise com o auxílio de um palito de madeira previamente autoclavado.

Figura 2 – Equipamento que utiliza a tecnologia MALDI-TOF MS – VITEK MS (bioMérieux).



Fonte: foto retirada pela autora (2015).

Figura 3 – Isolados de bactérias e leveduras sendo retirados da cultura primária.

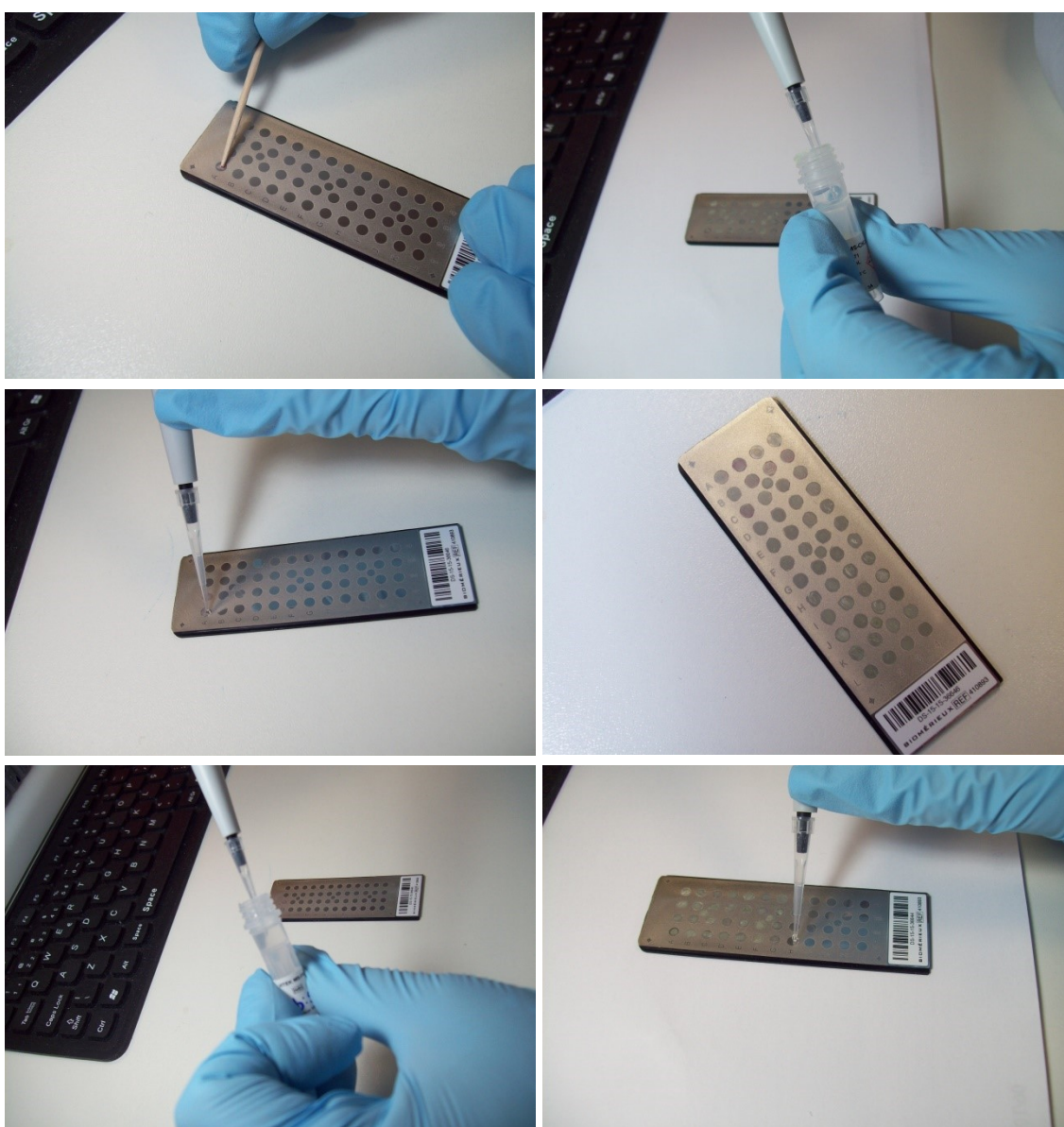


Fonte: foto retirada pela autora (2015).

O controle de qualidade interno é realizado todos os dias pela manhã no início da rotina e a cada mudança de lote de reagentes. Na primeira placa da rotina, os quatro primeiros círculos são reservados para os controles. No primeiro círculo é adicionado o controle negativo, onde somente a matriz e o ácido fórmico são adicionados. Os outros três círculos são reservados para a adição de três cepas de microrganismos conhecidos.

Com o auxílio do palito de madeira, a amostra é colocada no círculo com dimensões delimitadas pelo fabricante, preenchendo todo o espaço do desenho com movimentos circulares. Todas as bactérias com textura de colônia mucosa e todas as leveduras devem ser lisadas com ácido fórmico. Para isso 0,5 μ L de ácido fórmico devem ser adicionados ao esfregaço no círculo. Após a secagem, 1 μ L da matriz é adicionada sobre a amostra lisada (figura 4).

Figura 4 – Aplicação do isolado, extração com ácido fórmico, secagem e aplicação da matriz na placa de MALDI TOF MS.



Fonte: Foto retirada pela autora (2015).

Em cada placa, um máximo de 48 isolados podem ser analisados. Após a adição dos controles e de todas as amostras, a placa pode ser colocada no suporte e inserida no equipamento para análise (figura 5).

Os resultados no VITEK MS podem ser liberados de 16 em 16 grupos, o tempo de análise para cada grupo é entre 12 – 13 minutos e cada grupo tem sua *E. coli* controle. A análise da placa inteira com 48 círculos leva em torno de 45 minutos. No período de trabalho (8h30min às 13h30min) cinco placas inteiras, ou seja, 236 amostras mais quatro controles, podem ser analisadas pelo VITEK MS. As amostras de leveduras, no entanto, são adicionadas em dois círculos distintos para garantir que, em ao menos um deles, o processo de lise tenha ocorrido da maneira correta e o fungo seja identificado com segurança.

Cada frasco de matriz e ácido fórmico tem 500 μ L de volume e, ao passo que cinco frascos de matriz rendem 2500 testes e durem de dois a três dias, os frascos com ácido fórmico duram mais (cerca de um mês), pois menor volume é necessário para cada isolado e nem todos os isolados necessitam da lise pelo ácido fórmico (somente isolados de leveduras e bactérias mucoides). O custo final por exame para o laboratório, levando em consideração os gastos com os reagentes e consumíveis é de cerca de R\$2,00 por isolado.

Figura 5 – Placa de MALDI-TOF MS sendo colocada no suporte e posteriormente no equipamento para análise.



Fonte: foto retirada pela autora (2015).

Os espectros são processados pelo software do equipamento (Myla®) após o tempo de análise, e o resultado somente será considerado satisfatório após a análise de

100 perfis e a comparação destes ao BDER, o resultado é dado em porcentagem de correlação com o perfil do espectro do banco de dados.

Foi relatado que o alto custo do equipamento, conjuntamente a custos adicionais com o software, assistência técnica, assistência preventiva e interfaceamento com outros equipamentos da bioMérieux tornam o produto caro. Não obstante, o maior benefício observado pelos analistas no local de trabalho foi a diminuição no fluxo de trabalho e por isso, a implantação do sistema MALDI-TOF MS, nesse laboratório, obteve bom custo benefício.

3.3.8 Aplicações futuras

Atualmente, o BDER é limitado às espécies mais comuns da rotina laboratorial, portanto, a criação de bibliotecas públicas de espectros que podem ser continuamente atualizadas por profissionais da área tem o potencial de resolver o problema na identificação mesmo de espécies mais incomuns, com a implantação do MALDI-TOF MS, no laboratório clínico (BADER *et al.*; 2011). Além disso, com a construção de um BDER robusto, a necessidade de testes adicionais para a identificação de microrganismos patogênicos será menor, contribuindo assim, para a redução com gastos adicionais com outros equipamentos e reagentes.

A identificação rápida de fungos patogênicos, com um período de incubação de apenas 48 horas (GOYER *et al.*; 2012) no caso de leveduras é um grande atrativo para o uso do MALDI-TOF MS, por outro lado, a análise diretamente de amostras clínicas pode reduzir drasticamente esse período de espera. Alguns estudos preliminares já utilizam análise direta por MALDI-TOF MS de amostras clínicas como urina (WANG *et al.*; 2013) e líquido (HARTMEYER *et al.*; 2010), no entanto, estudos adicionais são necessários para verificar o desempenho do sistema MALDI-TOF MS de maneira mais ampla e o limite mínimo de detecção para obtenção de resultados confiáveis.

A previsão para o futuro é que a identificação de fungos patogênicos possa ser feita de maneira rápida e correta a partir de isolados obtidos de crescimento em meios de cultura e até mesmo diretamente de amostras clínicas e que, nesta mesma análise, o perfil de sensibilidade a antifúngicos possa ser determinado para que o paciente receba o tratamento correto o mais cedo possível, para que suas chances de cura sejam as melhores.

4 METODOLOGIA

O estudo foi realizado por meio de uma revisão da literatura do tipo integrativa, que é um método de revisão que permite incluir literatura teórica e estudos com diferentes abordagens metodológicas. Os estudos incluídos nesta revisão da literatura foram analisados de maneira sistemática, ou seja, seguiram um protocolo pré-estabelecido que orientou todo o processo de busca de informações e permitiu a análise do conhecimento pré-estabelecido sobre o tema investigado (POMPEO *et al.*; 2009).

As bases de dados acessadas para pesquisa de artigos científicos foram MEDLINE (PubMed), ScienceDirect e Scielo. Além disso, uma Tese de Doutorado foi utilizada como fonte bibliográfica. Todas as pesquisas bibliográficas foram realizadas no primeiro e segundo semestre do ano de 2015.

O trabalho foi desenvolvido por meio de pesquisa bibliográfica em livros, artigos científicos e monografias e como critério de inclusão foram utilizadas bibliografias que abordassem o tema de diagnóstico laboratorial de micoses, diagnóstico laboratorial de micoses utilizando o sistema MALDI-TOF MS, validação de procedimentos pré-analíticos para análise com o sistema MALDI-TOF MS, comparação entre o diagnóstico tradicional de micoses e o diagnóstico por meio do sistema MALDI-TOF MS, aplicação do sistema MALDI-TOF MS na determinação de suscetibilidade a antifúngicos, e parâmetros de custo e velocidade de diagnóstico de micoses utilizando o sistema MALDI-TOF MS.

Foram excluídos do trabalho pesquisas que não apresentassem *abstract*, estudos que não permitissem acesso ao conteúdo integral do artigo utilizando o VPN da UFSC, estudos que abordassem a identificação de fungos sem importância clínica pelo sistema MALDI-TOF MS e estudos que não incluíram métodos de identificação de referência para permitir a comparação adequada do sistema MALDI-TOF MS com esses e outros métodos de diagnóstico de micoses.

A coleta de dados foi realizada por meio da leitura exploratória de todo o material para seleção de material relevante para o trabalho, seguida por leitura seletiva e aprofundada do material selecionado e registro dessas informações extraídas das fontes selecionadas. Após a leitura analítica das fontes selecionadas o conteúdo foi organizado de modo que as informações coletadas atendessem os objetivos propostos no trabalho.

Por fim, a partir da análise e interpretação dos resultados, a proposta exposta nos objetivos foi organizada na forma de tópicos e discutida, na conclusão desse trabalho.

Para melhor compreensão do funcionamento do sistema MALDI-TOF MS na rotina laboratorial, uma visita a um laboratório clínico que utiliza essa tecnologia foi realizada, no dia 06 de outubro de 2015, no período da manhã. Todas as informações descritas neste trabalho a partir dessa visita foram obtidas por meio de conversa com profissionais que utilizam o equipamento, diariamente.

5 CONCLUSÕES

O diagnóstico rápido e preciso de fungos patogênicos é essencial para que o tratamento adequado seja oferecido ao paciente antes da progressão da doença. Esse fato é relevante, pois, atualmente, cerca de 50% das micoses sistêmicas não são identificadas antes da morte do paciente (DIGNANI; 2014), o que leva ao tratamento empírico e muitas vezes inadequado da micose. Além disso, em pacientes imunocomprometidos, no qual muitos dos sintomas são menos evidentes devido à deficiência da resposta inflamatória, o diagnóstico precoce é essencial para um bom prognóstico.

O sistema MALDI-TOF MS surgiu, portanto, como uma alternativa aos métodos atuais de diagnóstico laboratorial de micoses, proporcionando resultados rápidos e precisos, baseando-se no perfil proteico das células fúngicas íntegras ou tratadas, após isolamento em meios de cultura primários (TAN *et al.*; 2012). Dois sistemas são amplamente estudados, o MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e o VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Porém, existem outros sistemas MALDI-TOF MS no mercado, atualmente. Além disso, a grande maioria dos estudos publicados refere-se ao sistema MALDI Biotyper. Porém, somente o sistema VITEK MS, equipado com o software Myla®, possui autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para ser utilizado em laboratórios clínicos, no Brasil (SBPC/ML; 2015). Essa tecnologia é útil para a identificação de leveduras (DHIMAN *et al.*; 2011) e fungos filamentosos (RANQUE *et al.*; 2014), além disso, existe a possibilidade de se aplicar o sistema MALDI-TOF MS na determinação da suscetibilidade a antifúngicos sendo, entretanto, necessária a realização de mais publicações sobre este tema (MARINACH *et al.*; 2009; SARACLI *et al.*; 2015).

Devido ao fato do sistema MALDI-TOF MS ter sido introduzido no mercado recentemente para o diagnóstico de bactérias e fungos patogênicos, algumas limitações são observadas na sua utilização na rotina laboratorial, a principal sendo o custo do equipamento. Estima-se que somente a fonte de ionização custe em torno de \$250,000 - \$800,000 (WATROUS E DORRESTEIN; 2011) e as manutenções do equipamento, que precisam ser frequentes, são estipuladas pelos fabricantes, o que agrega no valor gasto pelo laboratório. O valor por análise do sistema MALDI-TOF MS, no entanto, é muito baixo, cerca de \$0,79 são gastos para cada amostra. Isso acontece porque os reagentes

utilizados para a preparação da amostra são de baixo custo e a identificação depende inteiramente do equipamento. Devido ao preço baixo dos reagentes, é necessária a aquisição do pacote completo com o equipamento, reagentes e manutenções preventivas e corretivas. Dessa forma, se o laboratório não tem uma rotina suficientemente grande para compensar os gastos com a compra do sistema MALDI-TOF MS, a compra da tecnologia não é vantajosa. Por outro lado, a redução do fluxo de trabalho e economia de longo prazo devido à redução de gastos com outras metodologias de diagnóstico torna vantajosa a aquisição do equipamento em laboratórios de grande fluxo de amostras e laboratórios de referência.

Outra limitação do sistema MALDI TOF MS é o banco de dados de espectros de referência (BDER). Atualmente, existem alguns problemas de identificação das espécies menos comuns, na rotina laboratorial e os sistemas comerciais não possuem um amplo número de espectros de referência, principalmente para os fungos filamentosos (CHEN *et al.*; 2015). Esse problema pode ser resolvido com a criação *in house* de um BDER com essas espécies menos frequentes, encontradas na rotina. No entanto, para que esses isolados sejam incluídos no BDER, eles precisam ser totalmente identificados, muitas vezes utilizando técnicas de biologia molecular, o que pode ser um fator limitante. Além disso, os métodos de extração e os tempos de incubação da cultura utilizados para a construção do BDER e para a análise do isolado podem não ser os mesmos, o que pode influenciar na identificação do microrganismo, uma vez que esses parâmetros deveriam ser padronizados para reduzir as chances de identificações equivocadas ou não confiáveis. Espera-se que em alguns anos, os BDER oferecidos pelos fabricantes sejam mais completos e resultem em identificações mais confiáveis.

Uma vantagem do sistema MALDI-TOF MS em relação aos métodos tradicionais de diagnóstico de micoses é o tempo de identificação reduzido. De forma geral, em 48 horas é possível identificar uma levedura (GOYER *et al.*; 2012) e em 72 horas um fungo filamentosos (CASSAGNE *et al.*; 2011), ao passo que o preparo das amostras e análise pelo equipamento leva de uma a três horas após o crescimento do isolado, sem a necessidade de repiques para demais meios de cultura e realização de provas bioquímicas (DEAK *et al.*; 2015). Além disso, a redução no tempo de diagnóstico contribui para a redução com os gastos de internação hospitalar, uma vez que a identificação e tratamento corretos da micose no início da doença reduzem gastos com

procedimentos e medicamentos desnecessários (GALAR *et al.*; 2012; GAREY *et al.*; 2006).

É possível concluir, dessa maneira, que o sistema MALDI-TOF MS tem potencial para ser utilizado em grandes rotinas de laboratórios de microbiologia clínica e que, fatores limitantes, atualmente, como o custo do equipamento e BDER deficientes podem, no futuro, se tornarem menos limitantes com a popularização da metodologia. Além disso, a análise de amostras retiradas diretamente de pacientes como líquido, urina e sangue pode acelerar drasticamente o diagnóstico de micoses sem a necessidade de isolamento em meios de cultura, o que pode ser essencial para o bom prognóstico do paciente. Por fim, a previsão da suscetibilidade a antifúngicos baseado no perfil proteico do microrganismo pode otimizar as escolhas dos antifúngicos tornando o tratamento mais efetivo. Todas essas variáveis, no entanto, precisam ser pesquisadas e publicadas, para possibilitar uma análise mais ampla e fidedigna do verdadeiro potencial do sistema MALDI-TOF MS, no laboratório de micologia clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRETHSEN, J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. **Clin Chem**, v. 53, n. 5, p. 852-8, 2007. ISSN 0009-9147.

ALEXANDER, B. D. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. **Transpl Infect Dis**, v. 4 Suppl 3, p. 32-7, 2002. ISSN 1398-2273.

ALMEIDA JÚNIOR, J. N. **Padronização da espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de cepas de *Trichosporon* spp. de importância médica. Tese (Doutorado em Patologia)**. 2014. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALVARADO, P. et al. Serological diagnosis of sporotrichosis using an antigen of *Sporothrix schenckii* sensu stricto mycelium. **Invest Clin**, v. 56, n. 2, p. 111-22, 2015. ISSN 0535-5133.

ANVISA. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica**. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Brasília - BRASIL, 2013.

ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Med Mycol**, v. 45, n. 7, p. 569-87, 2007. ISSN 1369-3786.

ASCIOGLU, S. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 1, p. 7-14, 2002. ISSN 1058-4838.

AZEVEDO, P. Z. et al. Evaluation of the Double Agar Gel Immunodiffusion Test and of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis and Follow-Up of Patients with Chronic Pulmonary Aspergillosis. **PLoS One**, v. 10, n. 8, 2015. ISSN 1932-6203.

BADER, O. et al. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 9, p. 1359-65, 2011. ISSN 1198-743x.

BALAJEE, S. A.; SIGLER, L.; BRANDT, M. E. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. In: (Ed.). **Med Mycol**. England, v.45, 2007. p.475-90. ISBN 1369-3786.

BARNES, R. A. Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. **J Antimicrob Chemother**, v. 61 Suppl 1, p. i3-6, 2008. ISSN 0305-7453.

BENCHIMOL, J. L.; SÁ, M. R. **Adolpho Lutz - Dermatologia e Micologia**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. ISBN 8575410423.

BERENGUER, J. et al. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. Disseminated versus single-organ infection. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 103-9, 1993. ISSN 0732-8893.

BERTINI, A. et al. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 2, p. 98-103, 2013. ISSN 1438-4221.

BILLE, E. et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. In: (Ed.). **Clin Microbiol Infect**. France: Clinical Microbiology and Infection 2011 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases., v.18, 2012. p.1117-25. ISBN 1469-0691

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006. ISSN 0265-9247.

CAI, J. C. et al. Detection of OmpK36 Porin Loss in *Klebsiella* spp. by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 6, p. 2179-82, 2012. ISSN 0095-1137.

CASSAGNE, C. et al. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. **Med Mycol**, v. 51, n. 4, p. 371-7, 2013. ISSN 1369-3786.

CASSAGNE, C. et al. Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 6, p. 551-7, 2014. ISSN 1198-743x.

CASSAGNE, C. et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **PLoS One**, United States, v. 6, n. 12, 2011. ISSN 1932-6203.

CHALUPOVA, J. et al. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnol Adv**, v. 32, n. 1, p. 230-41, 2014. ISSN 0734-9750.

CHAO, Q. T. 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. ISSN 1932-6203.

CHEN, Y. S. et al. Evaluation of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry Bruker Biotyper for identification of *Penicillium marneffei*, *Paecilomyces* species, *Fusarium solani*, *Rhizopus* species, and *Pseudallescheria boydii*. **Front Microbiol**, v. 6, p. 679, 2015. ISSN 1664-302x.

CLARK, A. E. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013. ISSN 0893-8512.

CONNOLLY, P. A. et al. Detection of *Histoplasma* Antigen by a Quantitative Enzyme Immunoassay. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 12, p. 1587-91, 2007. ISSN 1556-6811.

COULIBALY, O. et al. *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. **Med Mycol**, v. 49, n. 6, p. 621-6, 2011. ISSN 1369-3786.

DE CAROLIS, E. et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 5, p. 475-84, 2012. ISSN 1198-743x.

DE CAROLIS, E. et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 7, p. 2479-83, 2012. ISSN 0095-1137.

DE RESPINIS, S. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using the Vitek MS system for rapid and accurate identification of dermatophytes on solid cultures. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 12, p. 4286-92, 2014. ISSN 0095-1137.

DEAK, E. et al. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 81, n. 1, p. 27-33, 2015. ISSN 0732-8893.

DEL BONO, V. et al. Clinical performance of the (1,3)-beta-D-glucan assay in early diagnosis of nosocomial *Candida* bloodstream infections. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 12, p. 2113-7, 2011. ISSN 1556-679x.

DEL NEGRO, G. M. B. et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 33, n. 4, p. 277-280, 1991. ISSN 0036-4665.

DENNING, D. W.; STEVENS, D. A.; HAMILTON, J. R. Comparison of *Guizotia abyssinica* seed extract (birdseed) agar with conventional media for selective identification of *Cryptococcus neoformans* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 11, p. 2565-7, 1990. ISSN 0095-1137.

DHIMAN, N. et al. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 1614-6, 2011. ISSN 0095-1137.

DIGNANI, M. C. Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports. **F1000Prime Reports**, n. 6, p. 81, 2014. ISSN 2051-7599 (Electronic).

DINGLE, T. C.; BUTLER-WU, S. M. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. **Clin Lab Med**, v. 33, n. 3, p. 589-609, 2013. ISSN 0272-2712.

DRAHOS, L.; VEKEY, K. MassKinetics: a theoretical model of mass spectra incorporating physical processes, reaction kinetics and mathematical descriptions. **J Mass Spectrom**, v. 36, n. 3, p. 237-63, 2001. ISSN 1076-5174.

DU, Z. et al. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 74, n. 21, p. 5487-91, 2002. ISSN 0003-2700 (Print)0003-2700.

DUBOIS, D. et al. Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. In: (Ed.). **J Clin Microbiol**, v.48, 2010. p.941-5. ISBN 0095-1137.

DURAN-VALLE, M. T. et al. Identification of clinical yeasts by Vitek MS system compared with API ID 32 C. **Med Mycol**, v. 52, n. 4, p. 342-9, 2014. ISSN 1369-3786.

DURDEN, F. M.; ELEWSKI, B. Fungal infections in HIV-infected patients. **Semin Cutan Med Surg**, v. 16, n. 3, p. 200-12, 1997. ISSN 1085-5629.

EDWARDS-JONES, V. et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. **J Med Microbiol**, v. 49, n. 3, p. 295-300, 2000. ISSN 0022-2615.

EGLI, A. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) directly from positive blood culture flasks allows rapid identification of bloodstream infections in immunosuppressed hosts. **Transpl Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. 481-7, 2015. ISSN 1398-2273.

EISBERG, R.; RESNICK, R. **Quantum Physics of Atoms, Molecules, Solids, Nuclei, and Particles**. second edition. New York: Wiley, 1974. 713 ISBN 047187373X.

ELLEPOLA, A. N.; MORRISON, C. J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **J Microbiol**, v. 43 Spec No, p. 65-84, 2005. ISSN 1225-8873.

FDA. **Press Announcements - New test system identifies 193 different yeasts and bacteria known to cause illness**. Food and Drug Administration (FDA). LAINE, S. EUA 2013.

FERRONI, A. et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1542-8, 2010. ISSN 0095-1137.

FIDALGO, O. Introdução à história da micologia brasileira. **São Paulo: Rickia**, v. v.3, p. p.1-44, 1968.

FORD, B. A.; BURNHAM, C. A. Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 5, p. 1412-20, 2013. ISSN 0095-1137.

FOSTER, K. W.; GHANNOUM, M. A.; ELEWSKI, B. E. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. **J Am Acad Dermatol**, v. 50, n. 5, p. 748-52, 2004. ISSN 0190-9622.

GALAR, A. et al. Clinical and economic evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing. **J Infect**, v. 65, n. 4, p. 302-9, 2012. ISSN 0163-4453.

GALES, A. C. et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C

AUX and vitek YBC systems. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 12, p. 3804-8, 1999. ISSN 0095-1137.

GAREY, K. W. et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 1, p. 25-31, 2006. ISSN 1058-4838.

GAVIRIA, M. et al. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 376–383, 2015.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 2, p. 140-50, 2003. ISSN 1474-1776.

GOYER, M. et al. Optimization of the preanalytical steps of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification provides a flexible and efficient tool for identification of clinical yeast isolates in medical laboratories. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 9, p. 3066-8, 2012. ISSN 0095-1137.

GRIFFIN, P. M. et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 9, p. 2918-31, 2012. ISSN 0095-1137.

GUIMARÃES, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. DIAGNOSIS OF HISTOPLASMOSIS. **Braz J Microbiol**, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2006. ISSN 1517-8382.

HARTMEYER, G. N. et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. **Scand J Infect Dis**, v. 42, n. 9, p. 716-8, 2010. ISSN 0036-5548.

HEGER, Z. et al. Identification of estrogen receptor proteins in breast cancer cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (Review). **Oncol Lett**, v. 7, n. 5, p. 1341-1344, 2014. ISSN 1792-1074.

HERBRECHT, R. et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 7, p. 1898-906, 2002. ISSN 0732-183X.

HILLENKAMP, F. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Anal Chem**, v. 63, n. 24, p. 1193a-1203a, 1991. ISSN 0003-2700.

HOTTA, Y. et al. Classification of the genus *Bacillus* based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal proteins coded in *S10* and *spc* operons. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 10, p. 5222-30, 2011. ISSN 0021-8561.

HRABAK, J. Detection of carbapenemases using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) meropenem hydrolysis assay. **Methods Mol Biol**, v. 1237, p. 91-6, 2015. ISSN 1064-3745.

HUANG, T. L. et al. Principle component analysis combined with matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for rapid diagnosing the sera of patients with major depression. **Clin Chim Acta**, v. 424, p. 175-81, 2013. ISSN 0009-8981.

HUSAIN, S. et al. Prospective assessment of Platelia *Aspergillus galactomannan* antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. **Am J Transplant**, v. 4, n. 5, p. 796-802, 2004. ISSN 1600-6135.

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. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 6, p. 2107-10, 2012. ISSN 0095-1137.

JAMAL, W. Y. et al. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. **Int J Infect Dis**, v. 26, p. 167-70, 2014. ISSN 1201-9712.

KAFKA, A. P. et al. The application of MALDI TOF MS in biopharmaceutical research. **Int J Pharm**, v. 417, n. 1-2, p. 70-82, 2011. ISSN 0378-5173.

KANTARCI, K. Molecular imaging of Alzheimer disease pathology. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 35, n. 6 Suppl, p. S12-7, 2014. ISSN 0195-6108.

KARAS, M. et al. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 78, p. 53-68, 1987. ISSN 0168-1176.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Anal Chem**, v. 60, n. 20, p. 2299-301, 1988. ISSN 0003-2700.

KARBACH, V.; KNOCHENMUSS, R. Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, n. 14, p. 968-974, 1998. ISSN 1097-0231.

KAUFFMAN, C. A., PAPPAS, P.G., SOBEL, J.D., DISMUKES, W.E. **Essentials of Clinical Mycology**. Springer, 2011. ISBN 1441966390.

KNOCHENMUSS, R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. **Analyst**, v. 131, n. 9, p. 966-86, 2006. ISSN 0003-2654.

KNOCHENMUSS, R. et al. The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 10, n. 8, p. 871-877, 1996. ISSN 1097-0231.

KOLECKA, A. et al. Efficient identification of *Malassezia* yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Br J Dermatol**, v. 170, n. 2, p. 332-41, 2014. ISSN 0007-0963.

KONCAN, R. et al. Cross-reactivity of *Nocardia* spp. in the fungal (1-3)-beta-d-glucan assay performed on cerebral spinal fluid. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 81, n. 2, p. 94-5, 2015. ISSN 0732-8893.

KOURKOUMPETIS, T. K. et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 9, p. 1322-31, 2012. ISSN 1058-4838.

L'OLLIVIER, C. et al. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. **Med Mycol**, v. 51, n. 7, p. 713-20, 2013. ISSN 1369-3786.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e8041, 2009. ISSN 1932-6203.

LACAZ, C. D. S. História da micologia médica no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 35, n. 11, p. 1599-1607, 1983.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002. ISBN 8573781238.

LACROIX, C. et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 2, p. 153-8, 2014. ISSN 1198-743x.

LAU, A. F. et al. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 828-34, 2013. ISSN 0095-1137.

LAY, J. O., JR. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. **Mass Spectrom Rev**, v. 20, n. 4, p. 172-94, 2001. ISSN 0277-7037.

LING, H. et al. Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: a meta-analysis. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 7, p. 2573-82, 2014. ISSN 0095-1137.

LIONAKIS, M. S.; KONTOYIANNIS, D. P. Glucocorticoids and invasive fungal infections. **Lancet**, v. 362, n. 9398, p. 1828-38, 2003. ISSN 0140-6736.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Revista Semana de Medicina e Cirurgia**, v. 13, p. 121-4, 1908.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Ueber eine bei Menschen und Ratten beobachtete Mykose. Ein Beitrag zur Kenntnis der sogenannten Sporotrichosen. **Centralblatt Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten**, v. 45, p. 631-7, 1907.

MANCINI, N. et al. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 7, p. 2453-7, 2013. ISSN 0095-1137.

MARINACH, C. et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. **Proteomics**, v. 9, n. 20, p. 4627-31, 2009. ISSN 1615-9853.

MARKLEIN, G. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 9, p. 2912-7, 2009. ISSN 0095-1137.

MARR, K. A. et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. **J Infect Dis**, v. 190, n. 3, p. 641-9, 2004. ISSN 0022-1899.

MARVIN, L. F.; ROBERTS, M. A.; FAY, L. B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. In: (Ed.). **Clin Chim Acta**. Netherlands, v.337, 2003. p.11-21. ISBN 0009-8981.

MATHAROO-BALL, B. et al. Diagnostic biomarkers differentiating metastatic melanoma patients from healthy controls identified by an integrated MALDI-TOF mass spectrometry/bioinformatic approach. **Proteomics Clin Appl**, v. 1, n. 6, p. 605-20, 2007. ISSN 1862-8346.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 2, p. 560-4, 1977. ISSN 0027-8424.

MCTAGGART, L. R. et al. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 8, p. 3050-3, 2011. ISSN 0095-1137.

MENGOLI, C. et al. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 89-96, 2009. ISSN 1473-3099.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Medical Microbiology**. 7th edition. Iowa: Elsevier Health Sciences, 2012.

NENOFF, P. et al. MALDI-TOF mass spectrometry - a rapid method for the identification of dermatophyte species. **Med Mycol**, v. 51, n. 1, p. 17-24, 2013. ISSN 1369-3786.

NILSSON, C. L. et al. Processing of neuropeptide Y, galanin, and somatostatin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Peptides**, v. 22, n. 12, p. 2105-12, 2001. ISSN 0196-9781.

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. 13, p. 76, 2013. ISSN 1471-2180.

OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em Micologia Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: 2014. ISBN 85-900986-1-3.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. **Crit Care Med**, v. 34, n. 3, p. 857-63, 2006. ISSN 0090-3493.

OU, K. et al. Identification of a serine protease inhibitor homologue in Bird's Nest by an integrated proteomics approach. **Electrophoresis**, v. 22, n. 16, p. 3589-95, 2001. ISSN 0173-0835.

OUANES, A. et al. Contribution of the chromogenic medium CHROMagar((R))Candida in mycological diagnosis of yeasts. **J Mycol Med**, v. 23, n. 4, p. 237-41, 2013. ISSN 1156-5233.

PACKEU, A. et al. Fast and accurate identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: validation in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 9, p. 3440-3, 2014. ISSN 0095-1137.

PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 20, n. 3, p. 485-506, 2006. ISSN 0891-5520.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **J Control Release**, v. 120, n. 1-2, p. 1-3, 2007. ISSN 0168-3659.

PATEL, R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. **Clin Infect Dis**, United States, v. 57, n. 4, p. 564-72, 2013. ISSN 1537-6591.

PATIL, S. A.; KATYAYANI, S.; ARVIND, N. Significance of antibody detection in the diagnosis of cryptococcal meningitis. **J Immunoassay Immunochem**, v. 33, n. 2, p. 140-8, 2012. ISSN 1532-1819.

PENCE, M. A. et al. Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 10, p. 1703-12, 2014. ISSN 0934-9723.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med**, v. 125, n. 1, p. 3-13, 2012. ISSN 0002-9343.

POMPEO, D. A. et al. Integrative literature review: the initial step in the validation process of nursing diagnoses. **Acta paul. enferm.**, v. 22, n. 4, p. 434-438, 2009. ISSN 0103-2100.

POSTERARO, B. et al. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. **Expert Rev Proteomics**, v. 10, n. 2, p. 151-64, 2013. ISSN 1744-8387.

POSTERARO, B. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 7, p. 2472-6, 2012. ISSN 0095-1137.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009. ISSN 0074-0276.

PULCRANO, G. et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. **J Microbiol Methods**, v. 94, n. 3, p. 262-6, 2013. ISSN 0167-7012.

QIAN, J. et al. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Anal Bioanal Chem**, v. 392, n. 3, p. 439-49, 2008.

RANQUE, S. et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. **Mycoses**, v. 57, n. 3, p. 135-40, 2014. ISSN 0933-7407.

REISS, E.; LEHMANN, P. F. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect Immun.* **Infect Immun**, v. 25, n. 3, p. 57-65, 1979.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in Human Disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 2, p. 236-301, 2000. ISSN 0893-8512 (Print)1098-6618 (Electronic).

RIMEK, D. et al. [Fungal nucleic acid detection for invasive aspergillosis]. **Mycoses**, v. 41 Suppl 2, p. 65-8, 1998. ISSN 0933-7407.

RIVET-DANON, D. et al. Rapid diagnosis of cryptococcosis using an antigen detection immunochromatographic test. **J Infect**, v. 70, n. 5, p. 499-503, 2015. ISSN 0163-4453.

RODRIGUEZ-SANCHEZ, B. et al. Improvement of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of difficult-to-identify bacteria and its impact in the workflow of a clinical microbiology laboratory. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 79, n. 1, p. 1-6, 2014. ISSN 0732-8893.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-4, 1985. ISSN 0036-8075.

SALEEB, P. G. et al. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry[∇]. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 5, p. 1790-4, 2011. ISSN 0095-1137.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977. ISSN 0027-8424.

SANTOS, C. et al. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J Appl Microbiol**, England, v. 108, n. 2, p. 375-85, 2010. ISSN 1365-2672.

SARACLI, M. A. et al. Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Med Mycol**, v. 53, n. 7, p. 736-42, 2015. ISSN 1369-3786.

SAUER, S.; GUT, I. G. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 782, n. 1-2, p. 73-87, 2002. ISSN 1570-0232.

SAULOT, V. et al. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 5, p. 1196-201, 2002. ISSN 0004-3591.

SBPC/ML. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial: Boas Práticas em Microbiologia Clínica**. Barueri, São Paulo: Manole : Minha Editora, 2015.

SCHERER, W. P.; KINMON, K. Dermatophyte test medium culture versus mycology laboratory analysis for suspected onychomycosis. A study of 100 cases in a geriatric population. **J Am Podiatr Med Assoc**, v. 90, n. 9, p. 450-9, 2000. ISSN 8750-7315.

SCHRODL, W. et al. Direct analysis and identification of pathogenic *Lichtheimia* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analyzer-mediated mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 2, p. 419-27, 2012. ISSN 0095-1137.

SCHULTHESS, B. et al. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 8, p. 2797-803, 2014. ISSN 0095-1137.

SCHWACKE, J. et al. Discrimination of normal and esophageal cancer plasma proteomes by MALDI-TOF mass spectrometry. **Dig Dis Sci**, v. 60, n. 6, p. 1645-54, 2015. ISSN 0163-2116.

SENDID, B. et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. **Med Mycol**, v. 51, n. 1, p. 25-32, 2013. ISSN 1369-3786.

SICKMANN, A. et al. Towards a high resolution separation of human cerebrospinal fluid. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 771, n. 1-2, p. 167-96, 2002. ISSN 1570-0232.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. ISBN 85277086663.

SILVA, R. F. Chapter 8 - Fungal infections in immunocompromised patients. **J. bras. pneumol.**, v. 36, n. 1, p. 142-147, 2010. ISSN 1806-3713.

SPLENDORE, A. Zimonematosi con localizzazione nella cavità della bocca osservata nel Brasile. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, p. 5: 313-319, 1912.

STAHL, B. et al. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Anal Biochem**, v. 223, n. 2, p. 218-26, 1994. ISSN 0003-2697.

TAN, K. E. et al. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. In: (Ed.). **J Clin Microbiol**. United States, v.50, 2012. p.3301-8. ISBN 0095-1137.

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. ISSN 1097-0231.

TERHEGGEN-LAGRO, S. W. et al. Safety of a new extensively hydrolysed formula in children with cow's milk protein allergy: a double blind crossover study. **BMC Pediatr**, v. 2, p. 10, 2002. ISSN 1471-2431.

THEEL, E. S. et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 9, p. 3093-5, 2012. ISSN 0095-1137.

TORTORANO, A. M. et al. Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the Aspergillus Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 3, p. 1051-3, 2012. ISSN 0095-1137.

TOST, J. et al. Molecular haplotyping at high throughput. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 19, p. e96, 2002. ISSN 0305-1048.

TSAI, Y. K. et al. Klebsiella pneumoniae Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 4, p. 1485-93, 2011. ISSN 0066-4804.

TUREČEK, F. Renaissance of Cation-Radicals in Mass Spectrometry. **Mass Spectrom (Tokyo)**, v. 2, n. Spec Iss, 2013. ISSN 2187-137X.

VALERIO, A. et al. Serum protein profiles of patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis: searching for a diagnostic protein pattern. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 15, n. 24, p. 2420-5, 2001. ISSN 0951-4198.

VÉKEY, K. Internal Energy Effects in Mass Spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, n. 5, p. 445-463, 1996. ISSN 1096-9888.

VELLA, A. et al. Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 9, p. 2964-9, 2013. ISSN 0095-1137.

VLEK, A. et al. Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a yeast test panel. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 8, p. 3023-9, 2014. ISSN 0095-1137.

WANG, H.; YUAN, X.; ZHANG, L. Latex agglutination: diagnose the early cryptococcus neoformans test of capsular polysaccharide antigen. **Pak J Pharm Sci**, v. 28, n. 1 Suppl, p. 307-11, 2015. ISSN 1011-601X.

WANG, X. H. et al. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. **J Microbiol Methods**, v. 92, n. 3, p. 231-5, 2013. ISSN 0167-7012.

WATROUS, J. D.; DORRESTEIN, P. C. Imaging mass spectrometry in microbiology. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 9, p. 683-94, 2011. ISSN 1740-1526.

WESTMAN, A.; NILSSON, C. L.; EKMAN, R. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of proteins in human cerebrospinal fluid. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 12, n. 16, p. 1092-8, 1998. ISSN 0951-4198.

WHEAT, J. L. Current diagnosis of histoplasmosis. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 10, p. 488-94, 2003. ISSN 0966-842X.

WHITE, P. L. et al. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 4, p. 479-86, 2006. ISSN 1058-4838.

WHITE, P. L. et al. Aspergillus Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, 2015-06-25 2015.

WILKINSON, L. Introduction to the history of medical and veterinary mycology. **Med Hist**, v. 32, n. 1, p. 102-3, 1988. ISSN 0025-7273.

WILSON, D. A. et al. Multicenter evaluation of a Candida albicans peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 2909-12, 2005. ISSN 0095-1137.

WOLTERS, M. et al. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant Staphylococcus aureus lineages. **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 1, p. 64-8, 2011. ISSN 1438-4221.

XING, J. D. et al. [Application of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry in detecting K-ras gene mutation of colorectal cancer]. **Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi**, v. 16, n. 1, p. 80-3, 2013. ISSN 1671-0274.

YILDIZ, P. B. et al. Diagnostic accuracy of MALDI mass spectrometric analysis of unfractionated serum in lung cancer. **J Thorac Oncol**, v. 2, n. 10, p. 893-901, 2007. ISSN 1556-0864.

ZANGENEH, T. T. et al. Positive (1-3) B-d-glucan and cross reactivity of fungal assays in coccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 53, n. 2, p. 171-3, 2015. ISSN 1369-3786.

ANEXOS

ANEXO 1 – Identificação de espécies de leveduras pelos Sistemas MALDI-TOF MS.

Espécie	Referência	Sistema MALDI-TOF
<i>Arthrographis kalrae</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Candida albicans</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida boidinii</i>	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
<i>Candida bracarensis</i>	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND
<i>Candida catenulata</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Candida ciferrii</i>	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Candida colliculosa</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Candida dubliniensis</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida famata</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
<i>Candida glabrata</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida guilliermondi</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida haemulonii</i>	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
<i>Candida inconspicua</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida intermedia</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida kefyr</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS

	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida krusei</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida lambica</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Candida lipolytica</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida lusitanae</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida magnoliae</i>	LACROIX <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Candida metapsilosis</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Candida nivariensis</i>	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Candida norvegensis</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Candida orthopsilosis</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida palmioleophila</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Candida parapsilosis</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida pararugosa</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Candida pelliculosa</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Candida pulcherrima</i>	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Candida rugosa</i>	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Candida sphaerica</i>	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND
<i>Candida tropicalis</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB

	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida utilis</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
	LACROIX <i>et al</i> (2014)	AND e MB
<i>Candida zeylanoides</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Cryptococcus curvatus</i>	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
<i>Cryptococcus neoformans</i>	McTAGGART <i>et al</i> (2011)	MB
	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	POSTERARO <i>et al</i> (2012)	MB
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Cryptococcus gattii</i>	McTAGGART <i>et al</i> (2011)	MB
	POSTERARO <i>et al</i> (2012)	MB
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Cryptococcus humicolus</i>	CHAO <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Cryptococcus laurentii</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
<i>Geotrichum candidum</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Geotrichum capitatum</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
<i>Geotrichum silvicola</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Kloeckera apiculata</i>	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
<i>Kodamaea ohmeri</i>	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia caprae</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia cuniculi</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia dermatis</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia equina</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia furfur</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia globosa</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia japonica</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia nana</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia obtusa</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia pachydermatis</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia restricta</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia slooffiae</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia sympodialis</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Malassezia yamatoensis</i>	KOLECKA <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Pichia cactophila</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Pichia norvegensis</i>	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS

<i>Rhodothorula mucilaginosa</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Sporobolomyces Salmonicolor</i>	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Trichosporon asahii</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB e VMS
<i>Trichosporon inkin</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Trichosporon mucoides</i>	THEEL <i>et al</i> (2012)	MB
	DURÁN-VALLE <i>et al</i> (2013)	VMS
	CHAO <i>et al</i> (2014)	MB

Fonte: (CASSAGNE *et al.*; 2013; CHAO *et al.*; 2014; DURAN-VALLE *et al.*; 2014; IRIART *et al.*; 2012; KOLECKA *et al.*; 2014; LACROIX *et al.*; 2014; MCTAGGART *et al.*; 2011; POSTERARO *et al.*; 2012; THEEL *et al.*; 2012)

Notas: MB: MALDI Biotyper; VMS: VITEK MS; AND: Andromas.

ANEXO 2 – Identificação de espécies de fungos filamentosos pelos Sistemas MALDI-TOF MS.

Espécie	Referência	Sistema MALDI TOF
<i>Alternaria tenuissima/alternata</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Arthrographis kalrae</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus aculeatus</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus alabamensis</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Aspergillus alliaceus</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Aspergillus calidoustus</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Aspergillus clavatus</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Aspergillus flavipes</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus flavus</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
	SCHULTHESS <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
	SCHULTHESS <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Aspergillus lentulus</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Aspergillus melleus</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Aspergillus nidulans</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus niger</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	IRIART <i>et al</i> (2012)	VMS
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus ochraceus</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus oryzae</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus sydowi</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus terreus</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB

	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
	SCHULTHESS <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Aspergillus tubingensis</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Aspergillus unguis</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Aspergillus ustus</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus uvarum</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus versicolor</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	SCHULTHESS <i>et al</i> (2014)	MB
<i>Aspergillus viridinutans</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Alternaria tenuissima/alternata</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Chaetomium globosum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Curvularia geniculata</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Curvularia lunata</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Curvularia trifoli</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Dematiaceous Scopulariopsis</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Emericella quadrilineata</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Emericella nidulans</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Epidermophyton floccosum</i>	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Eurotium amstelodami</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Eutypella scoparia</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Eutypella vitis</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Exophiala dermatitidis</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Exophiala pisciphila</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Fomitopsis ostreiformis</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Fusarium oxysporum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Fusarium proliferatum</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Fusarium solani</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Geosmithia argillacea</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Geosmithia pallida</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Hamigera avallanea</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Histoplasma capsulatum</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Hypocrea jecorina</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	SCHRÖDL <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Lichtheimia hyalospora</i>	SCHRÖDL <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Lichtheimia ornata</i>	SCHRÖDL <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Lichtheimia ramosa</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	SCHRÖDL <i>et al</i> (2012)	MB

<i>Lichtheimia phaerocystis</i>	SCHRÖDL <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Microsporium audouinii</i>	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Microsporium canis</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Microsporium gypseum</i>	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Microsporium persicolor</i>	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Mucor circinelloides</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Mucor velutinosus</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Myrmecridium schulzeri</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Nectria mauriticaula</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Neosartorya hiratsukae</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Ochroconis gallopava</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Ochroconis humicola</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Onychocola canadensis</i>	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Paecilomyces formosus</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Paecilomyces saturatus</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Paecilomyces variotii</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Penicillium citrinum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Penicillium funiculosum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Penicillium glabrum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Penicillium marneffeii</i>	CHEN <i>et al</i> (2015)	MB
<i>Penicillium oxalicum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Penicillium roqueforti</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Penicillium spirulosum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Penicillium spinophilum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Phanerochaete sordida</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Phellinus gilvus</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Phialophora verrucosa</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Pseudallescheria boydii</i>	COULIBALY <i>et al</i> (2011)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	COULIBALY <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Rhizopus oryzae</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB

<i>Rhizomucor pusillus</i>	DE CAROLIS <i>et al</i> (2012)	MB
<i>Scedosporium apiospermum</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Scedosporium prolificans</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Talaromyces helicus</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Thielavia terrestris</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Trichoderma atroviride</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
<i>Trichoderma viride</i>	CASSAGNE <i>et al</i> (2011)	MB
	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Trichophyton erinacei</i>	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Trichophyton interdigitale</i>	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Trichophyton rubrum</i>	LAU <i>et al</i> (2013)	MB
	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Trichophyton soudanense</i>	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
	NORMAND <i>et al</i> (2013)	MB
<i>Trichophyton terrestre</i>	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Trichophyton tonsurans</i>	L'OLLIVIER <i>et al</i> (2013)	MB
	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS
<i>Trichophyton violaceum</i>	DE RESPINIS <i>et al</i> (2014)	VMS

Fonte: (CASSAGNE *et al.*; 2011; CHEN *et al.*; 2015; COULIBALY *et al.*; 2011; DE CAROLIS, POSTERARO, *et al.*; 2012; DE RESPINIS *et al.*; 2014; L'OLLIVIER *et al.*; 2013; LAU *et al.*; 2013; NORMAND *et al.*; 2013; POSTERARO *et al.*; 2012; SCHRODL *et al.*; 2012; SCHULTHESS *et al.*; 2014).

Notas: MB: MALDI Biotyper; VMS: VITEK MS.