Fernanda Marques Américo Antunes

Avaliação da metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF (VITEK MS®) para identificação de espécies de *Aspergillus* de importância médica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Dr. João Nobrega de Almeida Junior

Versão corrigida conforme CoPGr6018/11

São Paulo

2019

Fernanda Marques Américo Antunes

Avaliação da metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF (VITEK MS®) para identificação de espécies de *Aspergillus* de importância médica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Dr. João Nobrega de Almeida Junior

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Antunes, Fernanda Marques Américo
Avaliação da metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF (VITEK MS®) para identificação de espécies de Aspergillus de importância médica / Fernanda Marques Américo Antunes. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: João Nobrega de Almeida Junior.

Descritores: 1.Aspergillus 2.Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz 3.Base de dados 4.Espécies crípticas 5.Resistência a antifúngicos

USP/FM/DBD-077/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha família que tanto me apoiou e confiou em mim, a todas as pessoas especiais que fazem parte da minha vida e aquelas que contribuíram com o meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter me guiado em todos os passos da minha vida. Em meio a tantas barreiras, ele me fortaleceu até o exato momento.

À MINHA FAMÍLIA, minha base, em especial minha mãe Zélia que sempre foi minha amiga motivadora e grande incentivadora e esteve lá sempre que as minhas pernas fraquejaram e a mente disse que não conseguiria. Ao meu pai Antônio (*In memorian*), meu eterno amigo que me ensinou o significado do que é a vida e que sem ele também não teria chegado até aqui. Ao meu irmão Rodolfo meus sinceros agradecimentos por sempre estar torcendo por minhas conquistas e vibrando com elas. Ao meu esposo Manuel Junior por ter passado momentos difíceis, por compartilhar minhas dúvidas, ansiedades e ter permanecido sempre ao meu lado. Aos meus sogros, Manuel e Maria Emília, sempre dedicados e prontos a me ajudar.

Ao meu orientador Dr. João Nobrega, meu reconhecimento pela oportunidade e orgulho de realizar este trabalho ao lado de uma pessoa com tanta sabedoria. A você meu respeito e admiração.

À Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro por ter sido o meu exemplo e meu porto seguro. Obrigada por seus ensinamentos, competência, compreensão e paciência.

Ao Chefe do LIM-53, Prof. Dr. Gil Benard, e ao Chefe do Laboratório de Micologia Médica do IMT-USP, Prof. Dr. Carlos P. Taborda, pelo suporte e disponibilidade do Laboratório de Micologia Médica – LIM-53 para realização dos experimentos.

Aos meus amigos do Mestrado que foram partes essenciais desta jornada. Dr. Mauro Cintra Giudice, que me trouxe para o laboratório, obrigada pela confiança depositada, pela amizade e ensinamentos dentro da Micologia Médica. À Dra. Viviane Mazo Fávero Gimenes pelo apoio, pelos ensinamentos e palavras que me fortaleceram e me fizeram crescer. Ao Dr. Danilo Thomaz Yamamoto, com quem aprendi muito com seu jeito dedicado, crítico, detalhista e sempre pronto a ajudar. Dra. Gloria Sousa, que compartilhou comigo seu jeito amigo e inteligente de ser. À Ms. Roseli Santos Freitas por mostrar e dividir sua paixão pela

micologia médica. À Ms. Mônica Scarpelli Martinelli Vidal pela amizade, ajuda e ensinamentos. Ao Ms. Gabriel Naves Felix pela amizade, por sempre me ajudar quando precisei. À aprimoranda Lumena Siqueira por ser esta pessoa inteligente, dedicada e sempre disposta a me ajudar. Aos funcionários do LIM-53, Dona Antônia, Sônia Cristina Cavalcante e Fábio Lorenzo pelo carinho e amizade.

Aos companheiros do LIM-53 que passaram e aos que ainda estão presentes, Letícia Santos, Vanessa Morais, Vagner de Castro, Giovanna Traficante, Leticia de Alessio, Dulce Figueiredo, Fabiana Fonseca, Flaviano Luiz Batista da Silva, Giovanna Azevedo Colestrino, Camila Midori Henriques Tanaka, Gabrielle Haddad, Antônio Marques, Ana Maria Pereira, Renata Buccheri, Oscar Chagas muito obrigada pelo apoio e companheirismo durante essa etapa.

Aos colegas do LIM-48, Vera Lúcia, Daniel Valério, Cláudia, Paula K. Sato, Felipe Delatorre Busser e Célia Regina Ueda Tanowe amizade e em especial, Márcia Andréa Ferreira e Vivian Coelho pelo carinho, companheirismo e amizade.

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP por ter disponibilizado seus Equipamentos do Laboratório para o Projeto.

Aos Profs. Dr. Luiz Juliano Neto, Ms. Rafaella Grenfell e Mario Trindade do Laboratório Especial em Micologia da Universidade Federal de São Paulo (LEMI-UNIFESP).

À Divisão de Laboratório Central – Flavia Rossi, Afonso Rafael e Adriana Motta. À Coordenadora da Pós-Graduação da Dermatologia: Profa. Dra. Valeria Aoki. Aos Secretários da Pós-Graduação da Dermatologia: Ruth e Marcelo.

“ Ninguém poderá jamais aperfeiçoar-se, se não tiver o mundo como mestre. A experiência se adquire na prática ”

William Shakespeare

Essa dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de Abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Histórico e biologia do gênero *Aspergillus* 1

1.2 Taxonomia 3

1.3 Espécies de *Aspergillus* de importância médica 4

1.4 Tratamento de infecções causadas por espécies crípticas 7

1.5 Identificação de espécies de *Aspergillus* por espectrometria de massas MALDI-TOF 8

2. JUSTIFICATIVA 14

3. OBJETIVOS 15

3.1 Objetivo geral 15

3.2 Objetivos específicos 15

4. MATERIAIS E MÉTODOS 15

4.1 Instituições participantes 15

4.2 Desenho do estudo 16

4.3 Microrganismos 16

4.4 Identificação molecular dos isolados DLC HC-FMUSP 19

4.5 Espectrometria de massas MALDI-TOF 22

4.5.1 Protocolo de extração simplificado 22

4.5.2 Protocolo de extração proteica a partir de meio de cultura líquido 24

4.5.3 Obtenção dos espectros de massas no VITEK MS® 25

4.5.4 Construção da biblioteca de espectros de referência *in-house* 26

4.5.5 Análise dos resultados 26

5. RESULTADOS 29

5.1 Identificação molecular dos isolados HC-FMUSP 29

5.2 Construção da biblioteca de espectros de referência (SuperSpectro) 30

5.3 Desempenho das bibliotecas de espectro de referência para identificação de *Aspergillus* spp 32

6. DISCUSSÃO 37
7. CONCLUSÃO 41
8. ANEXO 42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem da cabeça aspergilar de *Aspergillus fumigatus* por microscopia óptica..... 1

Figura 2 - Esquematização das características microscópicas utilizadas na identificação de *Aspergillus*..... 2

Figura 3 - Princípios da tecnologia de espectrometria de massas por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF) 10

Figura 4 - Plataformas de espectrometria de massas MALDI-TOF disponíveis no mercado nacional: A) VITEK MS (BioMérieux, França); B) Microflex LT® (BrukerDaltonics/BD, Alemanha/EUA)..... 11

Figura 5 - Fluxograma de atividades desenvolvidas no estudo em sequência cronológica..... 16

Figura 6 - Protocolo simplificado de extração de proteínas..... 23

Figura 7 - Protocolo de extração de proteínas a partir de meio líquido..... 25

Figura 8 - Identificação molecular dos 53 isolados clínicos de *Aspergillus* spp. do HC-FMUSP..... 30

Figura 9 - Dendrograma criado pelo software SARAMIS Premium® com os SuperSpectros da biblioteca *in-house*..... 32

Figura 10 - Percentual de identificação de gênero, espécie e espécies crípticas de acordo com o espectro de referência analisado..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das espécies anamórficas e seus teleomorfos correlatos responsáveis por infecções em humanos..... 6

Tabela 2 - Dados atualmente disponíveis sobre resistência a antifúngicos das espécies crípticas de *Aspergillus*..... 7

Tabela 3 - Vinte e duas cepas de *Aspergillus* spp. previamente identificadas por sequenciamento, cedidas pelo LEMI-UNIFESP..... 18

Tabela 4 - Vinte e cinco cepas de referência de *Aspergillus* spp., adquiridas da coleção *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (Holanda)..... 19

Tabela 5 - Espécies de *Aspergillus* passíveis de identificação pela biblioteca MYLA® versão 3.0..... 27

Tabela 6 - Espécies dos espectros de referência de *Aspergillus* spp. (SuperSpectros) presentes na biblioteca SARAMIS® versão 4.12..... 28

Tabela 7 - Número de isolados e cepas utilizados para construção da biblioteca *in-house* de espectros de referência..... 31

Tabela 8 - Identificações fornecidas pelas diferentes bibliotecas de espectro de referência para identificação de *Aspergillus* não-*fumigatus* da Seção Fumigati..... 33

Tabela 9 - Identificações fornecidas pelas diferentes bibliotecas de espectro de referência para identificação de *Aspergillus* da Seção Flavi e Nigri..... 34

Tabela 10 - Identificações fornecidas pelas diferentes bibliotecas de espectro de referência para identificação de *Aspergillus* das Seções Usti, Versicolores, Clavati e Terrei..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ATCC	American Type Culture Collection
CBS	Centraalbureau von Schimmelcultures
DLC	Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAses	Desoxirribonucleases
dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
EM	Espectrometria de massas
ER	Espectro de referência
ERs	Superespectro
ESI	Electronspray Ionization
HCCA/CHCA	Ácido-α-ciano-4-hidroxicinâmico
ID	Identification
ICHC	Instituto Central do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IFI	Infecção Fúngica Invasiva
IMT	Instituto de Medicina Tropical
ITS1	Internal transcriber spacer entre regiões 18S e 5.8S do DNA ribossomal
Kb	Kilopares de bases de nucleotídeos
N	Número de amostras
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MLST	Multilocus sequence typing
MAT	Mating type
MgCl2	Cloreto de magnésio
MgSO4	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
RAPD	Random Amplified Polymorfic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SDA	Ágar Sabouraud dextrose
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida

SN	Intensidade de sinal para ruído
sp.	Espécie não identificada
spp.	Espécies
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tampão Tris, ácido bórico e EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Time-of-fligh (tempo de voo)
USP	Universidade de São Paulo
UV	Comprimento de onda ultravioleta
var.	Variedade
v/v	Volume/volume

RESUMO

Antunes FMA. *Avaliação da metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF (VITEK MS®) para identificação de espécies de Aspergillus de importância médica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A especiação de isolados clínicos de *Aspergillus* ganhou relevância nos últimos anos devido à descrição de espécies crípticas resistentes aos derivados azólicos. A identificação morfológica convencional não é capaz de discriminar as espécies de *Aspergillus* e o sequenciamento de DNA é uma técnica pouco adaptada a laboratórios clínicos. A espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz tempo-de-voo (EM MALDI-TOF) é uma metodologia emergente que vem sendo explorada com intuito de fornecer identificação rápida e acurada de microrganismos, incluindo os fungos filamentosos de importância clínica. Entretanto, há poucos estudos avaliando a plataforma VITEK MS® para a identificação de espécies de *Aspergillus.* O presente estudo teve como objetivo fornecer dados adicionais sobre a performance dos sistemas do VITEK MS® e suas bibliotecas de espectros de referências (ER) *In Vitro Diagnostics* (IVD) e *Research Use Only* (RUO) para identificar as espécies de *Aspergillus* de relevância clínica. Uma biblioteca de ER *in-house* também foi construída e avaliada. Um total de 106 organismos foram avaliados por EM, incluindo 47 cepas provenientes das coleções de fungos do Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Holanda) e do LEMI-UNIFESP, seis isolados ambientais (IMT-USP) e 53 isolados cínicos do HC-FMUSP. Foram utilizados dois protocolos de extração proteica, um recomendado pelo fabricante e outro empregando meio de cultura líquido para os isolados/cepas com baixa esporulação. Trinta e cinco organismos foram selecionadas para construir os ERs, e os 71 restantes foram usados para avaliação de desempenho das bibliotecas IVD, RUO e RUO+in-house. Entre os 71 organismos analisados, 91,5%, 84,5% e 100% tiveram identificação correta de gênero pelos bibliotecas IVD, RUO e RUO+*in-house*, respectivamente. Enquanto para identificação de espécie, as bibliotecas IVD, RUO e RUO+*in-house* mostraram 83,1%, 77,4% e 90,1% de identificações de espécie, respectivamente. Para as 16 espécies crípticas de *Aspergillus* analisadas, a identificação foi correta em 31,2%, 18,7% e 62,5%, pelos sistemas IVD, RUO e RUO+*in-house*, respectivamente. Entre as espécies crípticas resistentes aos derivados azólicos, o sistema IVD forneceu identificação correta para as espécies *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus*

calidoustus e *Aspergillus sydowii.* Entretanto, *Aspergillus fumigatiaffinis* e *Neosartorya pseudofischeri* foram erroneamente identificadas como *Aspergillus fumigatus* pelo sistema IVD. A biblioteca *in-house* demonstrou melhor performance, mas espécies filogeneticamente próximas como *A. fumigatiaffinis* e *A. lentulus* tiveram identificações cruzadas. Concluímos que o VITEK® MS demonstrou boa performance para a identificação das espécies de *Aspergillus,* porém para algumas espécies crípticas, há necessidade de melhoria das bibliotecas de espectro de referência comercializadas. Algumas espécies crípticas filogeneticamente relacionadas apresentaram espectros similares e são de difícil diferenciação por EM MALDI, mesmo com a construção de uma biblioteca de ER in-house com vários representantes de cada espécie.

Descritores: *Aspergillus*; espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz; base de dados; espécies crípticas; resistência a antifúngicos.

SUMMARY

Antunes FMA. *Evaluation of the MALDI-TOF mass spectrometry (VITEK MS®) methodology for the identification of clinically relevant Aspergillus species.* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Aspergillus spp. identification has become more relevant in clinical practice since azole-resistant cryptic species have emerged in the last years. Conventional morphologic identification is not able to discriminate *Aspergillus* species and DNA sequencing is not feasible for clinical laboratories. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) is an emergent technology that has been explored to provide fast and accurate identification of microorganisms, including clinically relevant molds. However, only a few studies have explored the platform VITEK MS® for the identification of *Aspergillus* species. The present study aimed to provide additional data regarding the performance of the In Vitro Diagnostics (IVD) and Research Use Only (RUO) systems for the identification of *Aspergillus* species, including azole-resistant ones, and also to construct and to evaluate an in-house reference spectrum library. A total of 106 organisms were evaluated by MS, including 47 *Aspergillus* strains (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute and LEMI-UNIFESP collections), six environmental (IMT-USP) and 53 clinical isolates (HC-FMUSP). Two protein extraction protocols were used, one recommended by the manufacturer and another with liquid broth for the organisms with poor sporulation. Thirty-five organisms were selected to construct the in-house reference spectrum library and the remaining 71 were used for the performance evaluation. Correct genus identification was provided in 91.5%, 84.5% and 100% by the IVD, RUO, and RUO+in-house reference spectrum libraries, respectively. Correct species identification was provided in 83.1%, 77.4% and 90.1% by the IVD, RUO, and RUO+in-house reference spectrum libraries, respectively. Among the 16 *Aspergillus* cryptic species, correct identification was provided in 31.5%, 18.7% and

62.5% by the IVD, RUO, and RUO+in-house reference spectrum libraries, respectively. Among the azole-resistant cryptic species, the IVD system provided correct identification for *Aspergillus lentulus, Aspergillus calidoustus* and *Aspergillus sydowii*. However, *Aspergillus fumigatiaffinis* and *Neosartorya pseudofischeri* were misidentified as *Aspergillus fumigatus* by the IVD system. The in-house library had better performance for the identification of *Aspergillus* cryptic species, but closely related taxa may be difficult to have correct differentiation by MALDI-TOF MS. In conclusion, VITEK® MS showed good performance for the identification of *Aspergillus* species and some azole-resistant species. However, a more robust reference spectrum library including more representatives of azole-resistant cryptic species may be necessary to achieve better identification performance of closely related taxa.

Descriptors: *Aspergillus*; spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization; database; cryptic species; antifungal resistance.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e biologia do gênero *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* foram descritos pela primeira vez em 1729, pelo padre e micologista italiano Pier Antonio Micheli (Lacaz *et al.*, 2002; Buckingham e Hansell, 2003). A denominação *Aspergillus*, derivada do latim (asperge), é devido à aparência do conidióforo (cabeça aspergilar) semelhante ao instrumento usado para aspergir água benta em cerimônias religiosas – aspersório (McCarthy e Pepys, 1973; Aldoory, 1985; Buckingham e Hansell, 2003), como mostra a **Figura 1**. Uma descrição completa sobre esse gênero foi realizada por Raper e Fennell (1965), na qual foram reconhecidas 132 espécies e 18 variedades (Geiser *et al.*, 2007; Bennett, 2010).

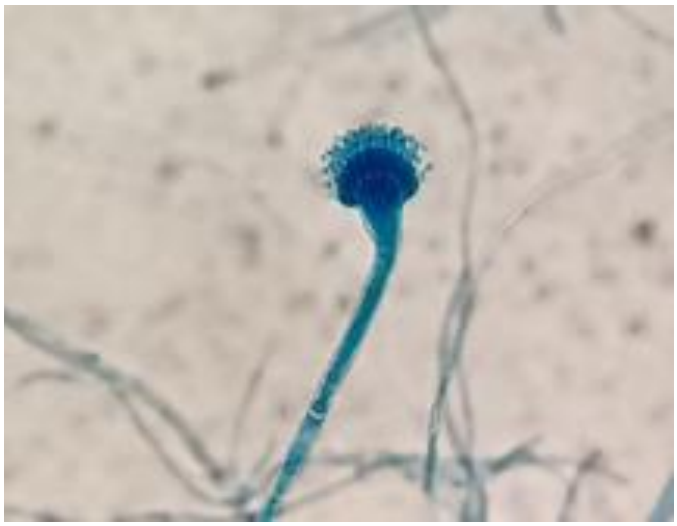

Figura 1. Imagem da cabeça aspergilar de *Aspergillus fumigatus* por microscopia Óptica (autoria própria)

Os fungos do gênero *Aspergillus* são organismos eucarióticos, em geral multinucleados, heterotróficos, ubíquos na natureza, e são considerados decompositores de matéria orgânica, reciclando o carbono e o nitrogênio de vegetação em decomposição no solo ou do acúmulo de outros compostos orgânicos. Todas as espécies de *Aspergillus* apresentam dispersão eficaz através da produção de estruturas fúngicas conhecidas como conídios, fazendo do grupo *aspergilli* um dos mais dominantes no ar (Dagenais e Keller,

2009; McCormick *et al.*, 2010; Pasqualotto, 2010; Krijgsheld *et al.*, 2013). Esses fungos são pertencentes ao Reino *Fungi*, Divisão *Ascomycota*, à ordem *Eurotiales*, e considerados anamorfos de ascomicetos, portanto são caracterizados pela produção de esporos assexuais (Klich e Pitt, 1988).

O gênero *Aspergillus* é composto por uma enorme variedade de espécies, distintas por análise macro e micromorfológica (Latgé, 1999; Latgé, 2001). A análise macroscópica baseia-se na análise das colônias fúngicas, a sua taxa de crescimento, aspecto e cor (frente e reverso). O estudo das características microscópicas de uma dada cultura, indispensáveis à identificação da espécie, deve ter em conta determinadas estruturas específicas da constituição do gênero *Aspergillus* **(Figura 2)**, tais como o conidióforo, a vesícula, as fiálides e os conídios (Latgé, 1999; Ferreira e Sousa, 2000).

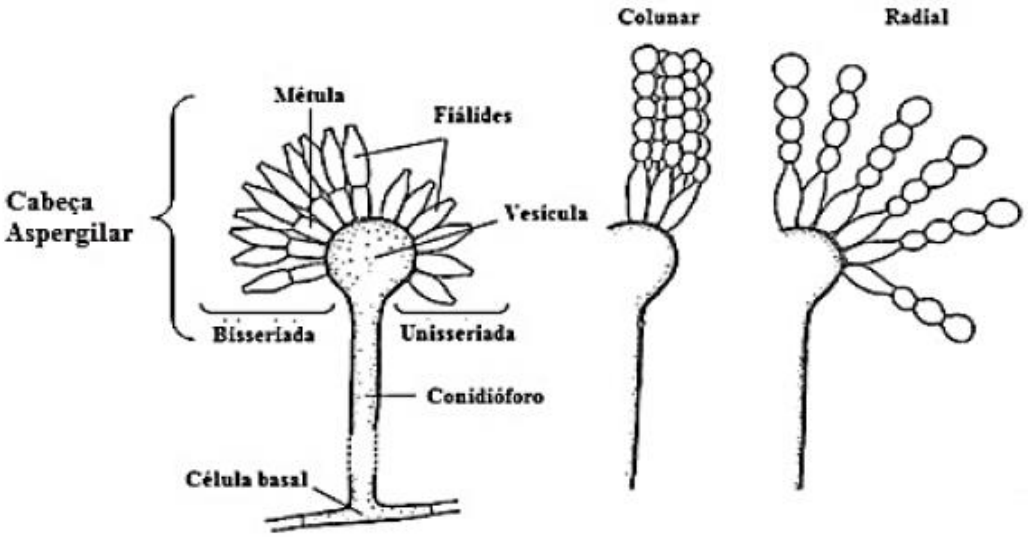

Figura 2. Esquematização das características microscópicas utilizadas na identificação de *Aspergillus* (Adaptado de Valente, 2014).

As espécies de *Aspergillus* produzem conídios no ar e estima-se que o homem inale centenas de conídios de *Aspergillus* diariamente. A imunidade do hospedeiro e as doenças pulmonares subjacentes são fatores críticos na determinação do resultado dessa exposição diária. Pacientes com deficiência na imunidade mediada por células, incluindo aqueles com

neutropenia devido à quimioterapia citotóxica, ou disfunção de células T devido a corticosteróides ou outra terapia imunossupressora, estão em risco de desenvolver aspergilose pulmonar invasiva, caracterizada por invasão de tecidos pulmonares e disseminação de hifas para outros órgãos. Por outro lado, pacientes com distúrbios respiratórios crônicos subjacentes podem desenvolver doença pulmonar obstrutiva crônica, tuberculose pulmonar, micobacteriose não tuberculosa, fibrose cística, bronquiectasia ou aspergilose broncopulmonar alérgica (Takazono e Izumikawa, 2018).

1.2 Taxonomia

A classificação das espécies de *Aspergillus*, proposta por Raper e Fennell (1965), sofreu modificações devido às informações fornecidas por análises moleculares. Essa alteração taxonômica baseia-se numa abordagem polifásica que agrega, além dos dados morfológicos (macro e microscópicos), aspectos fisiológicos, metabólicos e informações de sequências de DNA de diferentes *loci*. As análises do DNA, através de marcadores moleculares, tais como a região ITS do DNA ribossomal, dos genes β-tubulina e calmodulina, entre outros, permitiram acrescentar às antigas espécies diversas subespécies ou espécies crípticas (Geiser, 2009; Samson e Varga, 2009; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2012; Krijgsheld *et al.*, 2013). Espécies crípticas são morfologicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas por métodos moleculares (Howard, 2014). Assim, a classificação de espécies foi substituída por "seção" ou “complexo” e este, por sua vez, é dividido nas diferentes espécies (Geiser, 2009; Samson e Varga, 2009; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2012; Krijgsheld *et al.*, 2013).

O gênero *Aspergillus* foi dividido em diversas seções: *Flavi, Circundati, Nigri, Restricti, Fumigati, Cervini, Clavati, Nidulantes, Flavipedes, Versicolores, Usti, Terrei, Candidi, Cremei, Sparsi e Wentii*. Embora já tenham sido descritas mais espécies desse gênero, a classificação continua em constante processo de mudança (Klich, 2002; Samson

e Varga, 2009).

1.3 Espécies de *Aspergillus* de importância médica

A incidência de infecções fúngicas graves tem aumentado na última década, principalmente devido ao aumento do número de pacientes imunodeprimidos, representando uma séria causa de morbidade e mortalidade nessa população (Murray *et al.*, 2006; Jacobs *et al.*, 2012; Baddley *et al.*, 2013). Portanto, é fundamental que os médicos se familiarizem com a apresentação clínica, com os métodos de diagnóstico e tratamento das enfermidades causadas por fungos (Raja e Singh, 2006).

No ambiente hospitalar, *Aspergillus* spp. são facilmente aerossolizados e, por sua pequena dimensão, os esporos podem atingir os alvéolos pulmonares (Raja e Singh, 2006). Assim, a principal via de penetração dos conídios fúngicos é a via aérea (Richardson e Warnock, 2003), sendo o aparelho broncopulmonar o mais suscetível à aspergilose (Carvalho, 2013).

Aspergillus spp. causam um amplo espectro de doenças pulmonares no hospedeiro humano, dependendo do estado do sistema imune, da virulência do organismo infectante e do grau de doença pulmonar crônica. A virulência de *Aspergillus* é multifatorial e sob controle poligenético (Chmiel *et al.*, 2014). As estratégias utilizadas pelos fungos são multifacetadas e incluem estrutura fúngica, capacidade de crescimento, adaptação a condições estressantes, capacidade de danificar as células do hospedeiro e escapar do reconhecimento imunológico, características que podem ser exploradas como alvos diagnósticos ou terapêuticos. Em indivíduos com imunidade normal e sem doença pulmonar crônica, os conídios inalados geralmente são depurados por barreiras anatômicas, macrófagos funcionais e neutrófilos e, portanto, não levam a sequelas clinicamente significativas (Yii *et al.*, 2017) .

A inalação dos conídios pode causar doenças pulmonares que vão desde a

inflamação local das vias aéreas, como a aspergilose broncopulmonar alérgica, até infeções graves, como a aspergilose pulmonar invasiva (API) (Beisswenger *et al.*, 2012). A ABPA é definida como um conjunto de manifestações alérgicas provocadas pela inalação de esporos de *Aspergillus*, em que ocorre o desenvolvimento de anticorpos do tipo IgE contra os antígenos de superfície dos conídios (Richardson e Warnock, 2003). A aspergilose pulmonar invasiva foi descrita pela primeira vez em 1953 (Kousha *et al.*, 2011) e apresenta-se como uma infecção progressiva, aguda e severa, de mau prognóstico, podendo ser fatal (Dagenais e Keller, 2009).

Aspergilose pulmonar crônica (APC) é outra entidade patológica relacionada ao *Aspergillus*, sendo dividida em aspergiloma, aspergilose cavitária pulmonar crônica e aspergilose pulmonar crônica fibrosante (Denning *et al.*, 2016). O aspergiloma é referido como o desenvolvimento do fungo *in situ*, numa cavidade pré-existente, permitindo, por um lado, a chegada dos conídios e, por outro, o arejamento da cavidade necessário ao crescimento fúngico, dando origem a quantidades abundantes de hifas e cabeças aspergilares no espaço pulmonar anormal (Richardson e Warnock, 2003; Hope *et al.*, 2005; Kousha *et al.*, 2011).

Estimativas globais de 2017 indicam que mais de 3.000.000 de casos de APC e cerca de 250.000 casos de API ocorrem anualmente (Bongomin *et al*., 2017). Estimativas prévias, baseadas em populações com AI nos anos 90, sugerem uma incidência anual de 1 a 2 casos de aspergilose por 100.000 habitantes, entretanto, esta taxa pode estar subestimada devido ao aumento do número de receptores de transplante de órgão sólido e de transplante de células tronco, bem como o aumento do uso de imunossupressores (Jenks e Hoenigl, 2018). No Brasil, estima-se que ocorram mais de 9.000 casos anuais de API (Giacomazzi *et al*., 2016).

Das mais de 250 espécies de *Aspergillus*, menos de 40 são conhecidas por causarem

infecções em seres humanos. As espécies patogênicas ao homem são encontradas principalmente nas seções *Fumigati*, *Flavi*, *Terrei*, *Usti*, *Nigri* e *Nidulantes* (Balajee e Marr, 2006)**,** entretanto o principal responsável por causar doença é o *Aspergillus fumigatus* (Richardson e Warnock, 2003; Murray *et al.*, 2006; Raja e Singh, 2006). De acordo com o estudo de revisão de Sanguinetti e Posteraro (2017), *A. flavus* é o segundo agente mais frequentemente isolado de episódios de aspergilose humana. As principais espécies responsáveis por infecções em humanos estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Distribuição das espécies anamórficas e seus teleomorfos correlatos responsáveis por infecções em humanos.

Seção	Espécies anamórficas	Espécies teleomórficas
Seção não descrita	*A. chevalieri, A. glaucus, A. hollandicus, A. reptans*	*Eurotium chevalieri , Eurotium herbariorum Eurotium amstelodami, Eurotium repens*
Candidi	*A. candidus, A. tritici*	-
Circumdati	*A. chraceopetaliformi, A. ochraceus, A. sclerotiorum*	-
Clavati	*A. clavato-nanicu, A. clavatus*	-
Flavi	*A. alliace, A. avenaceus, A. flavus, A. nomius, A. oryzae, A. tamarii*	*Pertromyces alliaceus, Petromyces flavus, Petromyces nomius*
Flavipedes	*A. flavipes, A. janus*	*Fennellia flavipes*
Fumigati	*A. fumigatiaffinis, A. fumigatus, A. fumisynnematus, A. lentulus, A. viridinutans*	*Neosartorya fumigata; Neosartorya pseudofischeri*
Nidulantes	*A.nidulans, A. sydowii, A. tetrazonus, A. unguis, A. versicolor*	*Emericella nidulans, Emericella quadrilineata, Emericella unguis*
Nigri	*A. aculeatus, A. brasiliensis, A. japonicus, A. niger, A. tubingensis*	-
Restricti	*A. conicus, A. restrictus*	-
Terrei	*A. alabamensis, A. niveus, A. carneus, A. terreus*	-
Usti	*A. caesiellus, A. ceflectus, A. granulosus, A. ustus, A. calidoustus*	-

FONTE: De Hoog *et al.*, 2011.

1.4 Tratamento de infecções causadas por espécies crípticas

As espécies do gênero *Aspergillus* são, na maioria dos casos, suscetíveis a vários fármacos antifúngicos, incluindo anfotericina B, voriconazol, itraconazol e posaconazol. Entretanto, isolados com resistência intrínseca ou adquirida a alguns dos antifúngicos citados têm sido descritos (Baddley *et al.*, 2009; Van Der Linden *et al.*, 2009; Mavridou *et al.*, 2010; Camps *et al.*, 2012). A anfotericina B tem atividade limitada contra *A. terreus* e *A. nidulans* (Kontoyiannis e Lewis, 2002; Lass-Flörl *et al.*, 2009), enquanto *A. calidoustus* é resistente aos compostos triazólicos (Samson e Varga, 2009). Algumas espécies da seção Fumigati *(A.lentulus, N. pseudofisheri* e *A. fumigatiaffinis*) podem ser menos suscetíveis aos compostos triazólicos e à anfotericina B (Balajee *et al.*, 2005).

Em estudo de revisão, Gautier *et al*. (2016) descreveram as espécies crípticas de *Aspergillus*, de acordo com sua suscetibilidade aos antifúngicos (**Tabela 2**).

Tabela 2. Dados atualmente disponíveis sobre resistência a antifúngicos das espécies crípticas de *Aspergillus.*

Espécies	Anfotericina B	Voriconazol	Posaconazol	Itraconazol	Caspofungina
Fumigati					
A. *lentulus*	R	R	V	R	S/V
A. *viridinutans*	R	R	S	R	S
A. *felis*	S	V	V	V	S
N. pseudofischeri	S	R	S	R	S
A. *fumigatiaffinis*	R	R	S	R	S
A. *udagawae*	V	V	S	S	S
A. *novofumigatus*	S	R	R	R	S
Flavi					
A. *flavus*	R	S	S	S	V
A. *alliaceus*	R	S	S	S	V
A. *tamarii*	V	S	S	S	S
A. *nomius*	R	S	S	S	S
Terrei					
A. *terreus*	R	S	S	S	V
A. *alabamensis*	R	S	S	S	SD
A. *hortai*	R	S	S	S	S

(continua)

Tabela 2. Dados atualmente disponíveis sobre resistência a antifúngicos das espécies crípticas de *Aspergillus* (conclusão).

Espécies	Anfotericina B	Voriconazol	Posaconazol	Itraconazol	Caspofungina
Nigri					
A. *niger*	S	S	S	V	S
A. *tubingensis*	S	S	S	V	S
A. *awamori*	S	SD	S	SD	SD
A. *brasiliensis*	S	S	S	R	SD
Nidulantes					
A. *tetrazonus*	S	S	S	S	R
A. *nidulans*	V	S	S	S	V
Versicolores					
A. *versicolor*	R	S	S	S	R
A. *sydowii*	R	S	S	S	V
Usti					
A. *ustus*	V	V	R	R	R
A. *calidoustus*	V	R	R	R	V
A. *insuetus*	R	R	R	R	SD
A. *pseudodeflectus*	V	R	R	R	V
A. *keveii*	R	R	R	R	SD
Circumdati					
A. *persii*	R	S	S	S	SD
A. *ochraceus*	R	S	S	S	S
A. *westerdijkiae*	R	S	S	S	S

R= resistente; V= variável; S= suscetível; SD= sem dados; S/V= suscetível/variável

FONTE: Gautier *et al*. (2016)

1.5 Identificação de espécies de *Aspergillus* por espectrometria de massas MALDI-TOF

Os gêneros de fungos filamentosos mais frequentes e de relevância clínica envolvidos em doenças humanas incluem *Aspergillus, Fusarium e Scedosporium* (Paramythiotou *et al.*, 2014). Como a modalidade de tratamento varia amplamente nos diferentes casos de infecção, métodos rápidos e precisos para a identificação desses agentes patogênicos tornam-se um grande avanço para o correto diagnóstico clínico.

A identificação fenotípica para fungos filamentosos ainda é empregada nos laboratórios de rotina diagnóstica, apesar de ser uma técnica demorada. Por outro lado, os

métodos de sequenciamento de genes fornecem identificação definitiva das espécies, mas são trabalhosos e pouco adaptados à rotina diagnóstica (Zhu *et al.*, 2011).

A espectrometria de massas (EM) de dessorção e ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) tem sido reconhecida como uma ferramenta promissora para a rotina de identificação de microrganismos, entre leveduras e fungos filamentosos como *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Trichoderma* e *Mucorales* spp., entre outros (Chen e Chen, 2005; Hettick *et al.*, 2008; Marinach-Patrice *et al.*, 2009; De Respinis *et al.*, 2010; Alanio *et al.*, 2011; De Carolis *et al.*, 2012; Ranque *et al.*, 2014).

Os princípios da espectrometria de massas surgiram com J.J. Thomson (Nobel de Física - 1906) durante experimentos com a transmissão de eletricidade através de gases e o desvio de raios catódicos por campos eletromagnéticos (Dahal,1997). O primeiro espectrômetro de massas foi desenvolvido somente em 1922 por F. Aston – Nobel de Química (Assis *et al.*, 2011).

A primeira tentativa na classificação de microrganismos foi realizada em 1975 (Anhalt *et al*., 1975). No entanto, foi por volta dos anos 80 que as técnicas mais simples de ionização, como *Matrix-Assisted Lazer Desorption Ionization* (MALDI-TOF) e *electronspray ionization* (ESI) permitiram a análise de moléculas de peso molecular elevado, como proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, sem a decomposição desses analitos (Fenn, 2002; Karas, 1985). Com o desenvolvimento da nova técnica, foi possível aplicá-la na microbiologia e como consequência, alguns trabalhos foram realizados na tentativa de se obter espectros de massas para a classificação e identificação dos microrganismos (Claydon *et al.*, 1996; Rupf *et al.*, 2005).

A EM é uma técnica utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. De forma geral, a EM baseia-se em propriedades físicas do analito, de forma a determinar a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas

ionizadas em fase gasosa (Aebersold e Mann, 2003). O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização para a obtenção de íons, um analisador de massas, o qual separa os íons, um detector desses íons, e um sistema de aquisição dos dados. Em geral, as fontes de ionização mais comumente empregadas são ESI e MALDI e os analisadores são os *íon-traps*, *time-of-flight* (TOF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros (Glish e Vachet, 2003).

A matriz utilizada pelo MALDI-TOF é um ácido orgânico que fornece um próton para o processo de ionização da amostra. Ao mesmo tempo, a matriz tem a capacidade de absorver a energia emitida por um *laser* e desencadear um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o estado gasoso. Já a sigla TOF (*time-of-flight*) caracteriza o "tempo de vôo" da amostra ionizada em um tubo de vácuo até que esta atinja o detector (Assis *et al.*, 2011) como mostra a **Figura 3.**

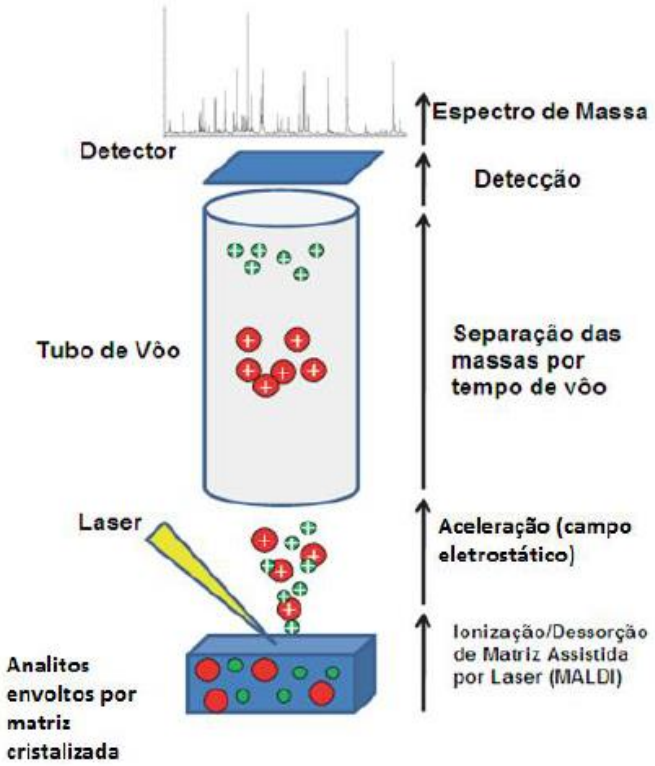

Figura 3. Princípios da tecnologia de espectrometria de massas por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de vôo (MALDI-TOF) (Adaptado de: Grenfell, RC *et al.*, 2016)

Existem dois instrumentos de MALDI-TOF MS que estão disponíveis no mercado nacional para o uso dos laboratórios clínicos: Microflex LT® (Bruker Daltonics/BD, Alemanha/EUA) e VITEK MS® (bioMérieux, França) (De Almeida, 2014) **(Figura 4).**

a b

Figura 4. Plataformas de espectrometria de massas MALDI-TOF disponíveis no mercado nacional: A) VITEK MS (BioMérieux, França); B) Microflex LT® (BrukerDaltonics/BD, Alemanha/EUA) (De Almeida, 2014).

Os espectros de massas gerados pelo MALDI-TOF MS são característicos e únicos para cada espécie. Dessa forma, diferentes microrganismos apresentam diferentes espectros de massa independente da condição em que foi cultivado. Diante dessas características, empresas fabricantes de equipamentos de espectrometria de massas (Bruker Daltonics, bioMérieux) desenvolveram bancos de dados com espectros de massas de referência de microrganismos (Hettick *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2004). Um desses bancos é comercializado pela empresa Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha) com o nome de

Biotyper. Outros bancos como MYLA e SARAMIS são comercializados pela bioMérieux (Marcy-L`Étoile, França) (Lacroix *et al.*, 2014). A confiabilidade destes bancos já está comprovada por publicações de alto impacto que têm comparado a espectrometria de massas com outras ferramentas já utilizadas na identificação de microrganismos (Cherkaoui *et al.*, 2010; Eigner *et al.*, 2009; Seng *et al*., 2009).

Apesar de ser uma técnica já consagrada na identificação de patógenos em bacteriologia clínica, a aplicação da metodologia em laboratórios de micologia foi mais lenta, particularmente em relação aos fungos filamentosos, devido a sua complexidade biológica e coexistência de diferentes fenótipos (hifas e conídios) em um mesmo isolado (Posteraro *et al.*, 2013).

Para validar a técnica na identificação de fungos filamentosos, Cassagne *et al*. (2011) analisaram, prospectivamente, isolados obtidos de amostras clínicas, utilizando protocolo de extração proteica e banco de dados *in house* desenvolvido com espectros de referência obtidos de 146 isolados. De um total de 177 isolados clínicos, 154 (87%) incluindo 86 *A. fumigatus* e 38 *Aspergillus* de nove diferentes espécies, foram corretamente identificados, mas espécies como *A. alliaceus*, *A. clavatus* e *A. oryzae*, que não estavam representados na biblioteca de 146 isolados, não foram identificadas.

Lau *et al*. (2013) utilizando lise mecânica para obter o extrato proteico, realizou a identificação de 421 isolados clínicos de fungos filamentosos, e incluiu no banco de dados do *software* Biotyper (Bruker) uma biblioteca *in house* contendo 294 espectros de referência de 152 espécies de fungos de relevância clínica, incluindo 63 espécies de *Aspergillus*. Os autores demonstraram que 88,9% dos isolados foram corretamente identificados como espécies, em 4,3% a identificação foi em nível de gênero, e 7,7% dos isolados para os quais não houve identificação, as espécies não estavam representadas no banco de dados.

Esses estudos, entre outros, têm demonstrado acurácia na identificação de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus*, empregando bibliotecas *in house* adicionadas aos bancos de espectros dos fabricantes dos equipamentos (Cassagne *et al*., 2011; Lau *et al*., 2013; Ranque *et al*., 2014). Mais recentemente, dois grupos apresentaram resultados empregando somente os bancos de dados comerciais para a identificação em nível de espécie. No estudo realizado por Huang *et al.* (2017), o percentual de acerto na identificação de 374 isolados de fungos filamentosos de origem clínica, incluindo 50 *A. fumigatus*, 50 *A. flavus*, 30 *A. terreus*, 30 *A. nidulans*, 30 *A. versicolor* e 50 *A. niger* foi determinado pelas metodologias de identificação fenotípica, e pelas plataformas MALDI-TOF Bruker Microflex LT e Xiamen Microtyper. O sequenciamento genético foi utilizado como forma de identificação definitiva para os casos de discrepância nos resultados. As plataformas Bruker Microflex LT e Xiamen Microtyper identificaram com precisão (nível de espécie) 98,9% e 99,2% das amostras, respectivamente, contra um acerto de 91,9% pelo método fenotípico.

Park *et al.* (2017) avaliaram a capacidade da biblioteca de fungos filamentosos do sistema MALDI-TOF MS Biotyper 1.0, para identificar 345 isolados clínicos de *Aspergillus* de 11 hospitais coreanos. Ao comparar os resultados do MALDI-TOF com o sequenciamento genético da região ITS do DNA ribossomal, o percentual de identificação correta no nível de espécie foi de 94,5% e 98,8%, com valores de corte de 2,0 e 1,7, respectivamente. O percentual de acerto quando comparado com o sequenciamento do gene da β-tubulina para 303 amostras de cinco espécies não crípticas (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*/*oryzae*, *A. terreus* e *A. nidulans*) foi de 96,0% (ponto de corte 2,0) e 100% (ponto de corte 1,7). Entretanto, para 42 isolados de seis espécies crípticas (*A. lentulus*, *A. tubingensis*, *A. tamarii*, *A. sydowii* e *A. calidoustus*) o percentual de acerto foi de apenas 4,8% e 0% para valores de corte de 1,7 e 2,0, respectivamente. Os resultados apresentados

demonstram a necessidade de aprimorar a biblioteca comercial para espécies crípticas de *Aspergillus.*

De acordo com o estudo de revisão de Sanguinetti e Posteraro (2017), a grande limitação de MALDI-TOF para a correta identificação de fungos filamentosos é a pequena amplitude dos bancos de espectros (bibliotecas) comercialmente disponíveis, bem como a limitada disponiblidade de bibliotecas construídas *in house* por laboratórios especializados em micologia, a exemplo do que ocorre com banco de dados genéticos (*GenBank*). Essa limitação tem prejudicado a implementação da MALDI-TOF em laboratórios clínicos, sendo necessária a expansão e contínua atualização dos bancos de espectros comerciais (Lau *et al.*, 2013; Masih *et al.*, 2016; Sleiman *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

As técnicas moleculares de identificação de espécies de *Aspergillus*, baseadas em sequenciamentos automatizados, são consideradas padrão-ouro, entretanto, são morosas, de custo elevado e pouco adaptadas aos laboratórios de rotina.

A adoção de testes rápidos na identificação desses patógenos, como a MALDI-TOF MS, é considerada um grande avanço. Entretanto, os bancos de espectros dos equipamentos comercialmente disponíveis, necessitam ser ampliados com espectros de referência de uma maior diversidade de espécies crípticas de *Aspergillus*. A otimização dos bancos permitirá a identificação correta desses patógenos, particularmente de espécies crípticas emergentes, sem a necessidade de técnicas moleculares, possibilitando um diagnóstico rápido, preciso e de baixo custo, para a introdução de terapêutica adequada aos pacientes acometidos pelas diversas formas da infecção.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho do equipamento MALDI-TOF MS Vitek MS (bioMérieux), para identificação de isolados clínicos e ambientais de espécies crípticas e não-crípticas de *Aspergillus*, para aplicação na rotina diagnóstica no complexo HC-FMUSP.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Acrescentar à biblioteca do equipamento Vitek MS, espectros de referência (ER) obtidos de cepas de espécies crípticas de *Aspergillus*, provenientes da coleção de culturas Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Holanda (cepas de referência);

3.2.2 Identificar as espécies de isolados de *Aspergillus* de origem clínica e ambiental, empregando as técnicas de macro e microcultivo (análise fenotípica);

3.2.3 Identificar as espécies dos mesmos isolados de *Aspergillus*, por sequenciamento do tipo Sanger, de uma sequência do gene da β-tubulina;

3.2.4 Avaliar biblioteca de ER *in house*, identificando as espécies de *Aspergillus* de isolados clínicos e ambientais por EM MALDI TOF, e comparando com as identificações obtidas pelo sequenciamento;

3.2.5 Comparar o desempenho das bibliotecas de ER SARAMIS e MYLA na correta identificação das espécies crípticas e não-crípticas de *Aspergillus.*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instituições participantes

Trata-se de um estudo multicêntrico, envolvendo a Seção de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central (DLC) do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), o Laboratório de Micologia Médica (LIM-53) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP) e o Laboratório Especial de

Micologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (LEMI-UNIFESP).

4.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de análise laboratorial, no qual isolados clínicos e ambientais, bem como cepas de referência de *Aspergillus*, foram utilizados para avaliar a plataforma VITEK MS (bioMérieux, França) na identificação de espécies desse gênero. O desenho do estudo está resumido na **Figura 5.**

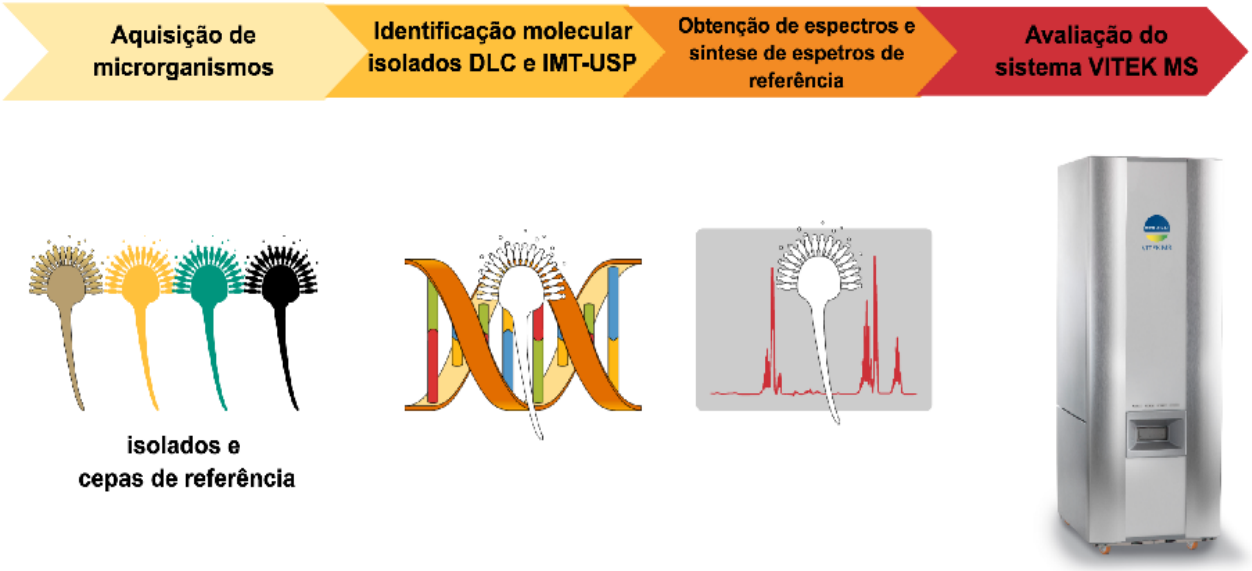

Figura 5. Fluxograma de atividades desenvolvidas no estudo em sequência cronológica.

4.3 Microrganismos

Neste estudo foram utilizados 106 microrganismo, sendo 59 amostras isolados de amostras clínicas e ambientais, da Seção de Microbiologia da DLC HC-FMUSP; 22 cepas de *Aspegillus* previamente identificadas por sequenciamento cedidas pelo LEMI-UNIFESP, 25 cepas de referência de *Aspergillus* adquiridas da coleção *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (Holanda).

Do total de 106 organismos, 53 foram isolados de amostras clínicas com cultivos sugestivos de *Aspergillus* (micromorfologia) obtidos entre janeiro de 2015 e novembro de 2018 da Seção de Microbiologia da DLC HC-FMUSP. Os isolados foram obtidos de amostras de escarro, secreção traqueal, lavado bronco-alveolar, líquidos corpóreos (líquido articular, líquor, líquido peritoneal) e biópsias (pele, osso e/ou partes moles, amostras pulmonares, seios da face). Outros seis isolados ambientais de *Aspergillus* spp. obtidos nos centros cirúrgicos do Instituto Central do HC-FMUSP em 2015 e analisados no Instituto de Medicina Tropical da USP também foram analisados.

Os 47 organismos restantes foram cepas de *Aspergillus* spp. foram: 22 cepas de origem clínica da coleção do LEMI-UNIFESP, previamente identificadas por técnicas moleculares por Negri *et al.*, 2014 (**Tabela 3**); e 25 cepas de referência adquiridas da coleção holandesa do *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (**Tabela 4**). A seleção das cepas foi baseada na espécie (ênfase para as espécies crípticas resistentes aos antifúngicos) e na qualidade da identificação que foi utilizada, dados detalhados no site http://www.westerdijkinstitute.nl/collections. Assim, as cepas selecionadas tinham sequencias do gene β-tubulina e/ou calmodulina disponíveis, e a identificação das espécies foi confirmada no *GenBank* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e *MycoBank* (http://www.mycobank.org).

Tabela 3. Vinte e duas cepas de *Aspergillus* spp. previamente identificadas por sequenciamento, cedidas pelo LEMI-UNIFESP.

Seção	**Número LEMI**	**Espécie**
Fumigati		
	73	*Aspergillus fumigatus*
	399	*Aspergillus fumigatus*
	842	*Aspergillus fumigatus*
	918	*Neosartoria pseudofischeri*
Flavi		
	1198	*Aspergillus flavus*
	183	*Aspergillus tamari*
	436	*Aspergillus tamari*
	1121	*Aspergillus tamari*
	1516	*Aspergillus tamari*
	999	*Aspergillus tamari*
	812	*Aspergillus parasiticus*
	897	*Aspergillus parasiticus*
	900	*Aspergillus parasiticus*
	250	*Aspergillus novoparasiticus*
	267	*Aspergillus novoparasiticus*
Nigri		
	924	*Aspergillus niger*
	926	*Aspergillus niger*
	IOP-86	*Aspergillus awamori*
	891	*Aspergillus foetidus*
Terrei		
	941	*Aspergillus terreus*
	1254	*Aspergillus terreus*
Clavati		
	40	*Aspergillus clavatus*

Tabela 4. Vinte e cinco cepas de referência de *Aspergillus* spp., adquiridas da coleção *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (Holanda).

Seção	Número da Coleção	Espécie
Fumigati		
	CBS 117194	*Aspergillus fumigatiaffinis*
	CBS 132254	*Aspergillus fumigatiaffinis*
	CBS 117186	*Aspergillus fumigatiaffinis*
	CBS 117884	*Aspergillus lentulus*
	CBS117885	*Aspergillus lentulus*
	CBS 116886	*Aspergillus lentulus*
	CBS 121597	*Aspergillus lentulus*
	CBS 100504	*Neosartoria pseudofischeri*
	CBS 20892	*Neosartoria pseudofischeri*
	CBS 114218	*Aspergillus udagawae*
	CBS 114217	*Aspergillus udagawae*
	CBS 130254	*Aspergillus felis*
	CBS 126.56	*Aspergillus unilateralis*
	CBS 117519	*Aspergillus novofumigatus*
	CBS 127.56	*Aspergillus viridinutans*
Flavi		
	CBS 100927	*Aspergillus flavus*
Nidulantes		
	CBS 126972	*Aspergillus nidulans*
Nigri		
	CBS 122719	*Aspergillus tubingensis*
	CBS 116417	*Aspergillus tubingensis*
Terrei		
	CBS 117.37	*Aspergillus terreus*
Usti		
	CBS 26167	*Aspergillus ustus*
	CBS 121601	*Aspergillus calidoustus*
	CBS 112452	*Aspergillus calidoustus*

4.4 Identificação molecular dos isolados DLC HC-FMUSP

Para extração do DNA, as culturas dos 59 fungos entre isolados clínicos e ambientais, provenientes do HC-FMUSP foram semeadas em meio de ágar Sabouraud dextrose (Difco) a 30ºC e incubadas por 3-7 dias. Foram retiradas duas alçadas e misturadas em 0,5 mL de água ultrapura, 10µL de Tween 20 (Sigma) e 50 µL de microesferas de vidro de 180 µm (Sigma). Os tubos foram submetidos à agitação em

vórtex e centrifugados para obtenção do *pellet* de células. Aos tubos contendo os *pellets*, foram adicionados 600 µL de solução tampão (TRIS 50mM + EDTA 10mM), 3 mg de *lysing enzyme Trichoderma harzianum* (L-1412, Sigma) e 250 U/mL de liticase (L-2524, Sigma). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C por um período de 1 hora. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm em centrífuga modelo 5804R (Eppendorf) a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspenso em 180 µl do tampão ATL do *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen). Os tubos foram então submetidos ao vórtex e, em seguida, foi adicionado 20 µL de proteinase K 20mg/mL (Invitrogen). Os tubos foram submetidos à agitação em vórtex e mantidos a 56ºC, *overnight*. Ao término do período, as demais etapas da extração foram executadas de acordo com as instruções do fabricante do *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen).

A quantificação das amostras de DNA foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher), com medidas de absorbância em comprimentos de onda de 260nm e 280nm, para se estimar a pureza do material extraído (razão entre as leituras DO260/DO280) (Sambrook *et al.*, 1989).

Em seguida, foram realizadas amplificações por PCR com pares de *primers* da região ITS e β-tubulina. As amostras foram inicialmente submetidas a amplificação da região ITS (PCR universal para fungos) para verificar a qualidade das extrações de DNA. As reações foram realizadas com 20 ng do DNA genômico dos fungos, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen), 1,25 U T*aq* DNA polimerase (Invitrogen), 1X PCR *buffer* (KCl 30 mM, TRIS 10 mM pH 8,3), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,2 µM de cada *primer* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Luo e Mitchell, 2002), em volume final de reação de 25µL. As amplificações foram realizadas com um ciclo de denaturação inicial de 94˚C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94˚C por 1 min, 55˚C por 1 min e 72˚C por 1 min, e extensão final de 72˚C por 5 min.

Para a PCR com os *primers* do gene β-tubulina Beta1 (5'AATTGGTGCCGCTTTCTGG-3') e Beta2 (5'-AGTTGTCGGGACGGAATAG-3') (Balajee *et al.*, 2005), o preparo do mix de reagentes foi o mesmo que o citado anteriormente, em volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram realizadas com um ciclo de denaturação inicial de 2 min a 94ºC seguido por 30 ciclos de 1 min a 94ºC, 2 min a 55°C e 2 min a 72°C e um ciclo de extensão final de 8 min a 72°C.

Para todas as reações de PCR foram empregados controles negativos para monitoramento da presença de contaminantes, e controles positivos para confirmar a qualidade das reações de amplificações.

Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em solução tampão TAE 1X [40 mM TRIS base (Invitrogen), 40 mM ácido acético glacial (Merck) e 2,0 mM EDTA (Life Technologies), pH 8] a 80 V por 40 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados com GelRed (Biotium) e registrados em equipamento de fotodocumentação (Uvitec).

A purificação dos amplificados foi realizada empregando-se o kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, EUA), de acordo com protocolo do fabricante, e posteriormente esses amplificados foram submetidos às reações de sequenciamento no equipamento *ABI 3500 DNA Analyser* (Thermo Fisher).

As sequências foram analisadas com auxílio do *software Sequence Scanner* v2.0 (Thermo Fisher) e alinhadas pelo programa Clustal Omega. As sequências nucleotídicas consenso obtidas foram comparadas às sequências de cepas de *Aspergillus* de referência disponíveis nas bases de dados do *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e *MycoBank* (http://www.mycobank.org), e analisadas pelo BLAST no site NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

4.5 Espectrometria de massas MALDI-TOF

4.5.1 Protocolo de extração simplificado

O protocolo simplificado (protocolo 1) é recomendado pelo fabricante (bioMérieux) como método inicial para a identificação de fungos filamentosos pelo espectrômetro de massas VITEK MS® (bioMérieux) e o sistema comercial (Myla®, bioMérieux), aprovado para uso em laboratórios clínicos (*in vitro diagnostics*, IVD). Para tanto, é necessário que o isolado apresente esporulação. Assim, os isolados foram cultivados em meio sólido ágar batata dextrose (Difco) por 48-72 horas a 30°C. Das colônias filamentosas com esporulação, os conídios foram coletados com *swabs* umedecidos, e inseridos em microtubos de 2 mL contendo 300 µl de água estéril. O processo foi repetido até turvar a solução. À solução turva foram acrescentados 900 µL de etanol 100% (Merck) e os tubos foram submetidos à agitação; em seguida, a solução de conídios em 1.2 mL de etanol 70% foi centrifugada por 5 min a 13.000 rpm a 25°C (centrífuga 5804R, Eppendorf) para a obtenção do sedimento de células. Após a completa remoção do sobrenadante e secagem do sedimento, foram adicionados 50 µL de ácido fórmico (Sigma) a 70%, com posterior incubação por 10 min à temperatura ambiente. Após rápida agitação em vórtex, foram acrescentados 50 µL de acetonitrila (Sigma) e a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm durante 2 min. Em seguida, 1 µL do sobrenadante foi aplicado em *spot* da lâmina de 48 amostras do VITEK MS (bioMérieux). Após secagem, foi aplicado 1uL da solução da matriz [acetonitrila 50%; água 47,5% e ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma)] sobre as amostras. O protocolo 1 está resumido na **Figura 6**.

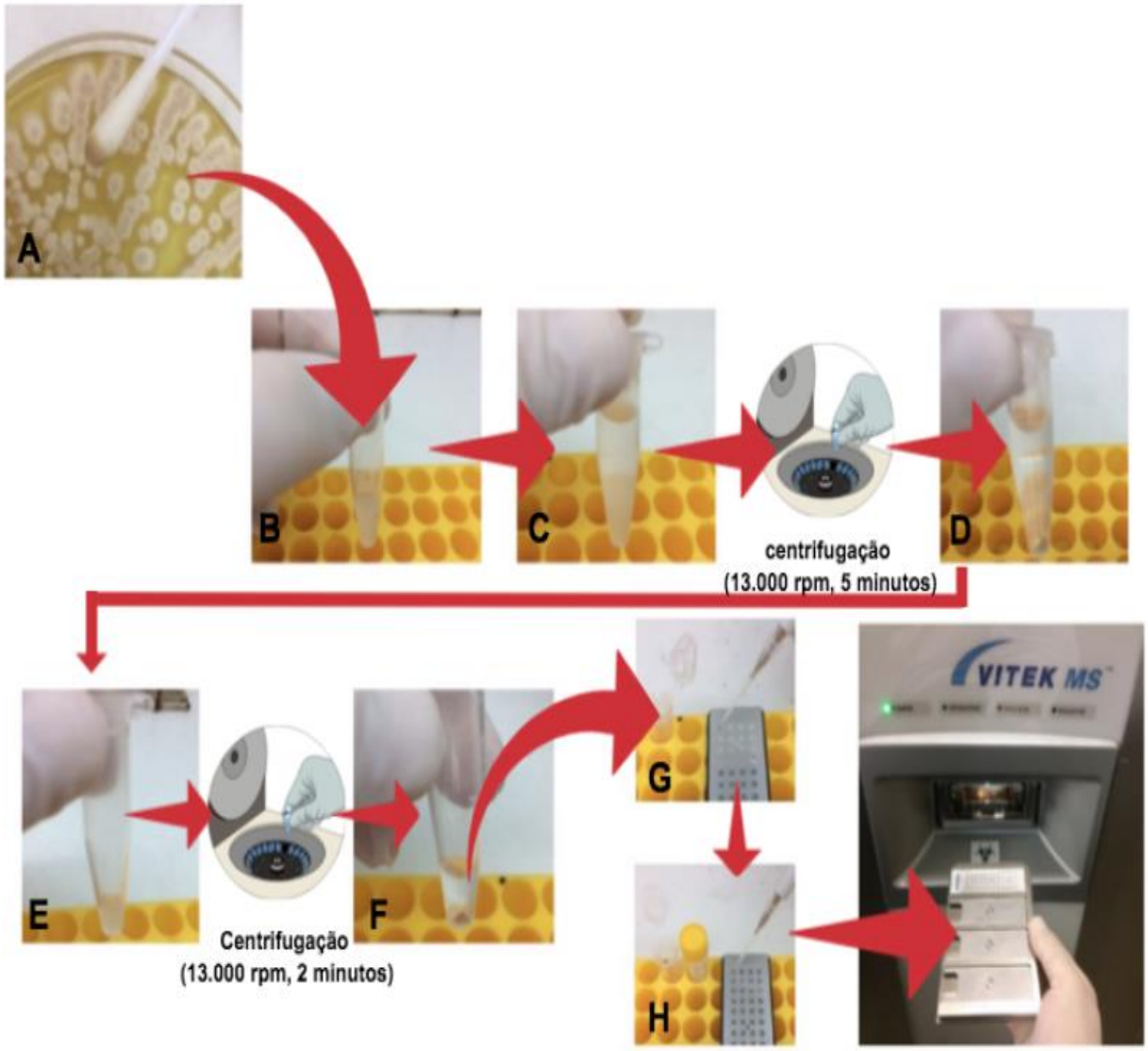

Figura 6. Protocolo simplificado de extração de proteínas (protocolo 1). A) coleta de conídios com *swab* umedecido; B) Diluição dos conídios em 300µL de água estéril; C) adição de 700µL de álcool 70% e agitação; D) Após centrifugação, o sobrenadante é descartado e o sedimento é seco; E) Ao sedimento são adicionados 50 µL de ácido fórmico, espera-se 5 minutos e então são adicionados 50 µL de acetonitrila ; F) Agitação e nova centrifugação; G) 1 µL é aplicado em *spot* do slide e deixado para secar em temperatura ambiente; H) 1 µL de matriz é aplicado e deixado para secar em temperatura ambiente, e a amostra está pronta para análise.

4.5.2 Protocolo de extração proteica a partir de meio de cultura líquido

O protocolo 2 é uma adaptação das recomendações do fabricante Bruker Daltonics (Sanguinetti e Posteraro, 2017). Este protocolo foi usado como método alternativo para as amostras que não obtiveram espectros pelo protocolo 1. Suspensões dos fungos foram preparadas em 10 mL de caldo Sabouraud dextrose (Difco), contidos em tubos do tipo Falcon de 50 mL, até turvar o meio. Em seguida, os tubos foram mantidos em constante agitação em rotor (Dragon Lab) a 50 rpm, e angulação de 50°, por 48 horas a temperatura ambiente (**Figura 7**). Após este período, os tubos foram centrifugados para obtenção do sedimento de células, o qual foi submetido a três lavagens com água ultrapura, sendo o sobrenadante retirado com auxílio de pipeta. Em seguida, foram adicionados 50 µL de microesferas de vidro de 180 µm (Sigma), e os tubos foram submetidos à agitação em vórtex (etapa adicional ao protocolo Bruker). Foram então adicionados 300 µL de água ultrapura e 900 µL de etanol absoluto (Merck) e, após agitação em vórtex, os tubos foram centrifugados por 10 min a 13.000 rpm. Após completa remoção do sobrenadante e secagem do sedimento, foram acrescentados 100 µL de ácido fórmico (Sigma) a 70%, e os tubos foram incubados por 10 min a temperatura ambiente, após rápida agitação em vórtex. Finalmente, foram acrescentados 100 µL de acetonitrila (Sigma) e a mistura foi centrifugada (13.000 rpm durante 5 min). Em seguida, 1 µL do sobrenadante foi aplicado nos *spots* da lâmina de 48 amostras do VITEK MS (bioMérieux). Após secagem, foi aplicado 1uL da solução da matriz [acetonitrila 50%; água 47,5% e ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma)] sobre a amostra. O protocolo 2 está resumido na **Figura 7.**

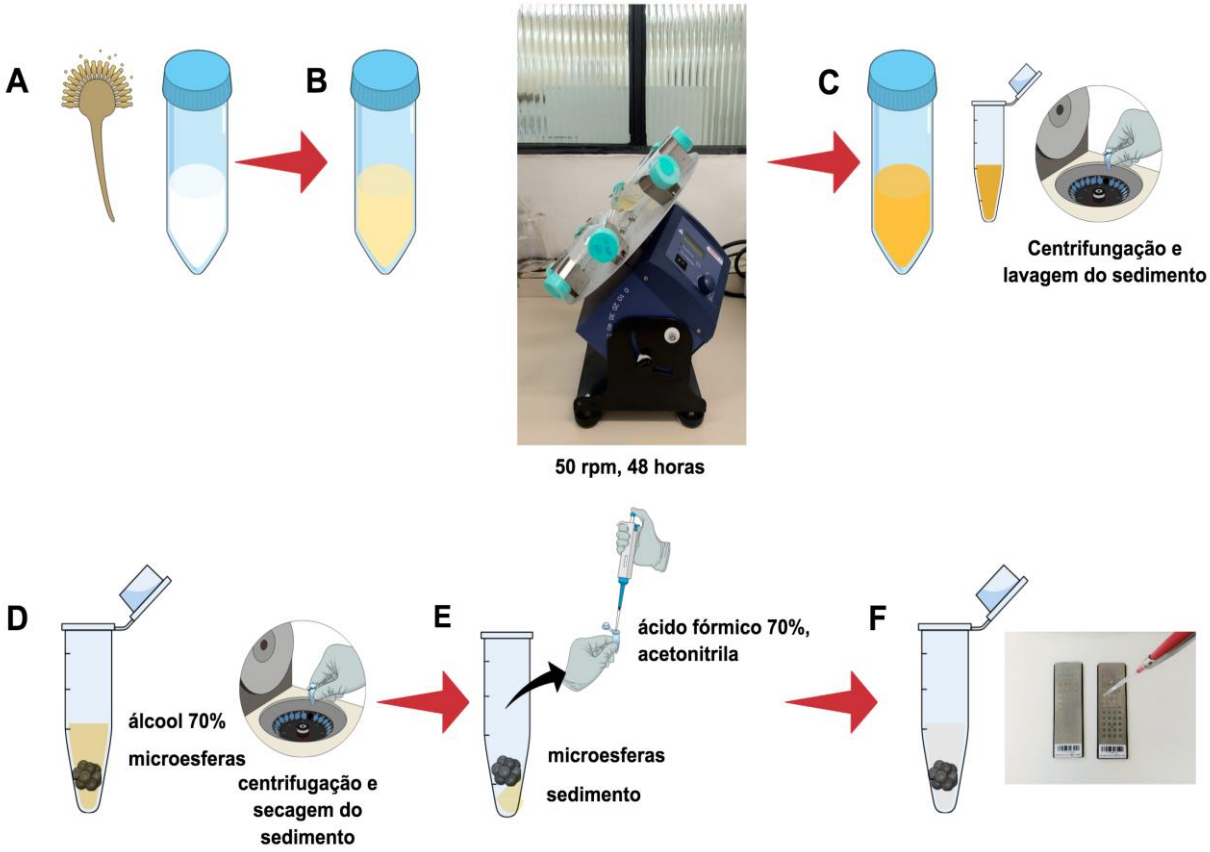

Figura 7. Protocolo de extração de proteínas a partir de meio líquido (protocolo 2). A) Turvação do caldo com conídios; B) Agitação e incubação em rotor a temperatura ambiente por 48 horas; C) Transferência de material para microtubos, centrifugação e lavagens; D) Ao sedimento são acrescidos microesferas e etanol 70%, o material é agitado em vórtex e depois centrifugado ; E) Ao sedimento são adicionados 100 µL de ácido fórmico, agita-se e espera-se 5 minutos, então são adicionados 100 µL de acetonitrila; F) Após nova centrifugação, 1 µL do sobrenadante é aplicado em *spot* da lâmina e deixado para secar em temperatura ambiente; 1 µL de matriz é aplicado e deixado para secar em temperatura ambiente. A amostra está pronta para análise.

4.5.3 Obtenção dos espectros de massas no VITEK MS®

Para cada análise, o padrão (*Escherichia coli* ATCC 8739) foi utilizado para calibrar o instrumento. Os organismos foram inicialmente submetidos ao protocolo simplificado de extração (protocolo 1), e os extratos proteicos foram analisados no sistema aprovado para uso clínico (IVD), através do *software VITEK MS Acquisition* (bioMérieux),

e também no sistema de pesquisa (Research Use Only-RUO), através do *software* Launchpad versão 2.8 (bioMérieux). Os organismos, com análises sem geração de espectros de massas ou sem identificação pelo protocolo simplificado, foram cultivados em meio líquido e reanalisados após nova extração (protocolo 2).

4.5.4 Construção da biblioteca de espectros de referência *in-house*

Espectros gerados no *software* SARAMIS Premium® (bioMérieux) de organismos cultivados em meio líquido, foram avaliados quanto à qualidade (≥120 picos e 70% de similaridade) e selecionados. Então, espectros de referência espécie-específicos (SuperSpectros) foram gerados com a ferramenta SARAMIS Premium® SuperSpectrum (bioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante: 40 biomarcadores (massas) foram selecionados, e para cada biomarcador foram designados 35 pontos, dando um total de 1.400 pontos para a formação do SuperSpectro final. Dendrograma dos SuperSpectros foi criado através da ferramenta *Show taxonomy* disponível no programa SARAMIS Premium®.

4.5.5 Análise dos resultados

Os espectros obtidos no sistema IVD foram comparados com os espectros de referência da base de conhecimento (ou biblioteca) MYLA® versão 3.0 (bioMérieux). Os resultados foram expressos em % de identificação; valores ≥60% apenas para uma espécie são classificados como resultados de alta discriminação pelo fabricante.

As espécies de *Aspergillus* presentes na biblioteca MYLA® versão 3.0, segundo o fabricante, estão sumarizadas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Espécies de *Aspergillus* passíveis de identificação pela biblioteca MYLA® versão 3.0.

Seção	Espécie
Fumigati	
	Aspergillus fumigatus
	Aspergillus lentulus
Nigri	
	Aspergillus niger
	Aspergillus brasiliensis
Flavi	
	Aspergillus flavus
	Aspergillus oryzae*
Nidulantes	
	Aspergillus nidulans
	Aspergillus unguis
Versicolores	
	Aspergillus versicolor
	Aspergillus sydowii
Usti	
	Aspergillus calidoustus
Candidi	
	Aspergillus candidus

***Hoje considerada mesma espécie que *Aspergillus flavus* (Gautier *et al.*, 2016).**

Os espectros obtidos no sistema RUO foram inicialmente comparados à biblioteca de espectros de referência SARAMIS™ v.4.12 (bioMérieux), na qual os resultados são expressos em % de identificação. Apenas resultados com percentuais ≥75% são reportados. Resultados com duas ou mais espécies com identificação ≥75% são reportados em vermelho e são considerados de baixa discriminação. Os SuperSpectros originais de *Aspergillus* spp. presentes na biblioteca SARAMIS™ v.4.12 (bioMérieux), estão resumidos na **Tabela 6**.

Tabela 6. Espécies dos espectros de referência de *Aspergillus* spp. (SuperSpectros) presentes na biblioteca SARAMIS® versão 4.12.

Seção	**Espécie**
Fumigati	
	Aspergillus fumigatus
	Aspergillus lentulus
	*Aspergillus thermomutatus**
Nigri	
	Aspergillus niger
	Aspergillus niger/lacticoffeatus
	Aspergillus brasiliensis
	Aspergillus sclerotioniger
	Aspergillus aculeatus
Flavi	
	Aspergillus flavus/oryzae
	Aspergillus tamari
Flavipedes	
	Aspergillus flavipes
Nidulantes	
	Aspergillus nidulans
	Aspergillus unguis
Versicolores	
	Aspergillus versicolor
	Aspergillus sydowii
Usti	
	Aspergillus calidoustus
	Aspergillus ustus
Candidi	
	Aspergillus candidus
Circundati	
	Aspergillus ochraceus
Restricti	
	Aspergillus restrictus
Terrei	
	Aspergillus terreus

* Espécie anamórfica de *Neosartorya pseudofischeri*

Em análise final, os espectros foram submetidos à identificação pela biblioteca SARAMIS™ v.4.12 (bioMérieux) acrescida dos SuperSpectros da nova biblioteca *in-house*. Os resultados foram reportados da mesma maneira, ou seja, apenas resultados com percentuais ≥75%. Resultados com duas ou mais espécies com identificação ≥75% e considerados de baixa discriminação.

Os resultados de desempenho de identificação das bibliotecas IVD, RUO e RUO + *in-house* foram expressos em percentuais de identificação de Gênero, Seção e espécie. Isolados e cepas utilizados para a construção de espectros de referência (SuperSpectros) não foram utilizados para avaliação do desempenho.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação molecular dos isolados HC-FMUSP

Este estudo foi realizado com um total de 106 amostras, sendo 59 identificados por sequenciamento dentre isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp. do HC – FMUSP.

Dentre os 53 isolados clínicos do HC-FMUSP, quarenta (74,5%) foram identificados como *A. fumigatus*, e um isolado (1,9%) de cultura de escarro foi identificado como *A. lentulus* (Seção Fumigati). Tais isolados, sem exceção, eram provenientes de culturas de amostras do trato respiratório.

Cinco isolados (9,4%), também oriundos de culturas do trato respiratório, foram classificados, pelo sequenciamento, como pertencentes à Seção Flavi. Destes, quatro foram identificados como *A. flavus* (7,5%) e um como *A. parasiticus* (1,9%).

Outros cinco isolados (9,4%), oriundos de culturas do trato respiratório, foram classificados como pertencentes à Seção Nigri, todos pertencentes à espécie *A. niger*.

Um isolado (1,9%), oriundo de cultura de lavado bronco-alveolar, foi identificado como *A. clavatus*, e outro obtido de líquido de articular de joelho, como *A. terreus* (1,9%).

Os seis isolados ambientais do HC-FMUSP, salas cirúrgicas, foram identificados como: *A. fumigatus* (n=3), *A. versicolor* (n=1), *A. sydowii* (n=1) e *A. flavus/oryzae* (n=1).

Os resultados de identificação molecular dos isolados clínicos do HC-FMUSP estão resumidos na **Figura 8**.

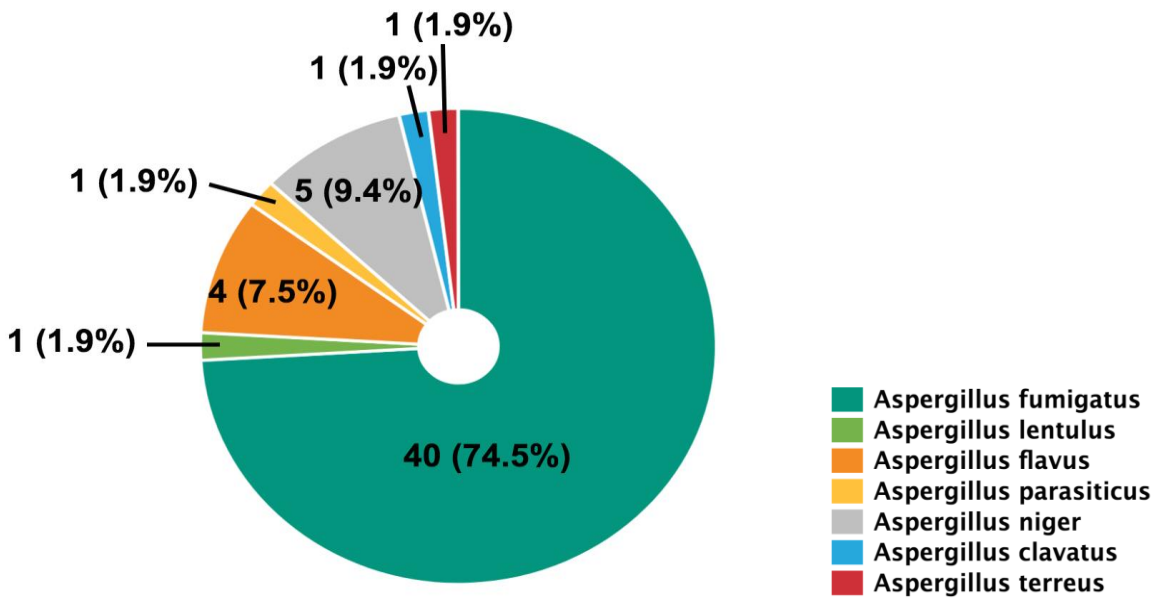

Figura 8. Identificação molecular dos 53 isolados clínicos de *Aspergillus* spp. do HC-FMUSP.

5.2 Construção da biblioteca de espectros de referência (SuperSpectro)

No total de 106 amostras, 53 isolados clínicos e seis ambientais, 22 cepas do LEMI-UNIFESP e 25 cepas da coleção do *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*, 35 representantes de diferentes espécies foram selecionadas para a construção da biblioteca *in-house* de espectros de referência. As espécies representadas na biblioteca *in-house* e o respectivo número de espectros de referência estão na **Tabela 7.**

Tabela 7. Número de isolados e cepas utilizados para construção da biblioteca *in-house* de espectros de referência.

Seção	**Espécie**	**N. espectros de referência (SuperSpectros)**
Fumigati		
	Aspergillus fumigatus	4
	Aspergillus fumigatiaffinis	1
	Aspergillus lentulus	2
	Aspergillus udagawae	1
	Neosartorya pseudofischeri	1
	Aspergillus felis	1
	Aspergillus unilateralis	1
	Aspergillus novofumigatus	1
	Aspergillus viridinutans	1
Flavi		
	Aspergillus flavus	3
	Aspergillus tamari	3
	Aspergillus parasiticus	2
	Aspergillus novoparasiticus	1
Nidulantes		
	Aspergillus nidulans	1
Nigri		
	Aspergillus niger	2
	Aspergillus tubingensis	1
	Aspergillus awamori	1
	Aspergillus foetidus	1
Terrei		
	Aspergillus terreus	2
Usti		
	Aspergillus ustus	1
	Aspergillus calidoustus	1
Clavati		
	Aspergillus clavatus	1
Versicolores		
	Aspergillus versicolor	1
	Aspergillus sydowii	1

O dendrograma com os 35 SuperSpectros está demonstrado na **Figura 9**.

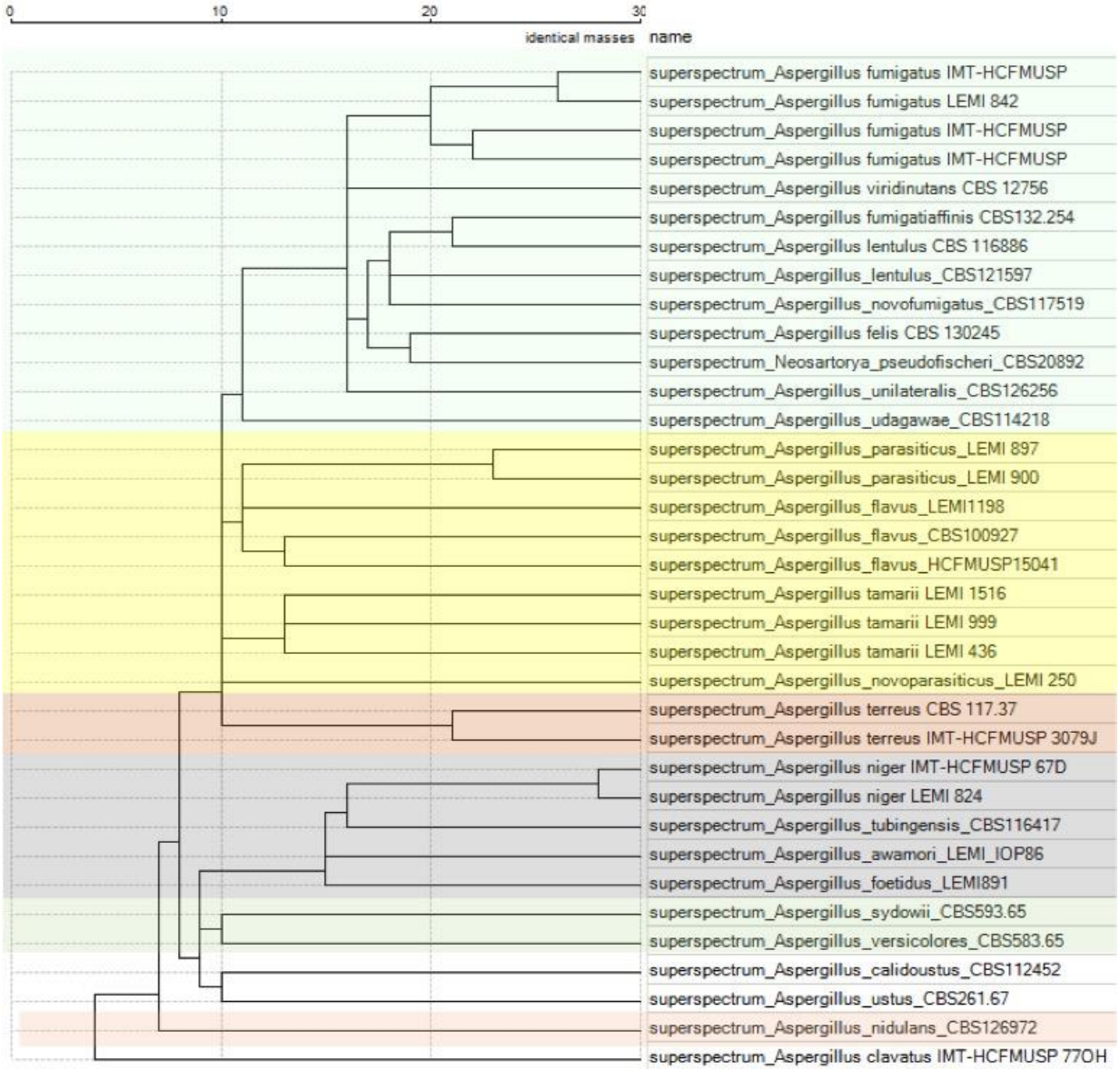

Figura 9. Dendrograma criado pelo software SARAMIS Premium® com os SuperSpectros da biblioteca *in-house.*

5.3 Desempenho das bibliotecas de espectros de referência para identificação de *Aspergillus* spp.

Das 106 amostras, 71 organismos foram submetidos à identificação de espécies pelas três bibliotecas (IVD, RUO e RUO+*in-house)*. Os 42 isolados de *A. fumigatus* tiveram identificação correta pelas três bibliotecas . Os demais resultados estão resumidos nas **Tabelas 8**, **9** e **10**.

Tabela 8. Identificações fornecidas pelas diferentes bibliotecas de espectros de referência para identificação de *Aspergillus* não-*fumigatus* da Seção Fumigati.

Espécie analisada (nº isolados)	**Biblioteca**					
	IVD[1]		**RUO[2]**		**RUO + *in house***	
	Gênero	**Espécie**	**Gênero**	**Espécie**	**Gênero**	**Espécie**
Aspergillus lentulus (n=3)	*Aspergillus*	*lentulus*	*Aspergillus*	*lentulus*	*Aspergillus*	*lentulus*
Aspergillus fumigatiaffinis (n=2)	*Aspergillus*	*fumigatus*	Sem identificação	Sem identificação	*Aspergillus*	*fumigatiaffinis* *lentulus* *novofumigatus*
Aspergillus udagawae (n=1)	Sem identificação	Sem identificação	Sem identificação	Sem identificação	*Aspergillus*	*udagawae*
Neosartorya pseudofischeri (n=2)	*Aspergillus*	*fumigatus*	Sem identificação	Sem identificação	*Neosartorya*	*pseudofischeri*

[1] IVD: *in vitro diagnostics*, aprovado para uso clínico; [2]RUO: *research use only*, apenas para pesquisa

Tabela 9. Identificações fornecidas pelas diferentes bibliotecas de espectros de referência para identificação de *Aspergillus* da Seção Flavi e Nigri.

Espécie analisada (nº isolados)	**Biblioteca**					
	IVD[1]		**RUO[2]**		**RUO + *in house***	
	Gênero	**Espécie**	**Gênero**	**Espécie**	**Gênero**	**Espécie**
Seção Flavi						
Aspergillus flavus (n=4)	*Aspergillus*	*flavus*	*Aspergillus*	*flavus*	*Aspergillus*	*flavus*
Aspergillus tamari (n=2)	Sem identificação	Sem identificação	*Aspergillus* Sem identificação	*tamari* Sem identificação	*Aspergillus*	*tamari*
Aspergillus parasiticus (n=2)	*Aspergillus*	*flavus*	*Aspergillus*	*flavus*	*Aspergillus*	*flavus novoparasiticus*
Aspergillus novoparasiticus (n=1)	*Aspergillus*	*flavus*	*Aspergillus*	*flavus*	*Aspergillus*	*flavus*
Seção Nigri						
Aspergillus niger (n=5)	*Aspergillus*	*niger*	*Aspergillus*	*niger*	*Aspergillus*	*niger tubingensis*
Aspergillus tubingensis (n=1)	Sem identificação	Sem identificação	*Aspergillus*	*niger*	*Aspergillus*	*tubingensis*

[1] IVD: *in vitro diagnostics*, aprovado para uso clínico; [2]RUO: *research use only*, apenas para pesquisa

Tabela 10. Identificações fornecidas pelas diferentes bibliotecas de espectros de referência para identificação de *Aspergillus* das Seções Usti, Versicolores, Clavati e Terrei.

Espécie analisada (n. isolados)	**Biblioteca**					
	IVD[1]		**RUO**[2]		**RUO + *in house***	
	Gênero	**Espécie**	**Gênero**	**Espécie**	**Gênero**	**Espécie**
Seção Usti						
Aspergillus calidoustus (n=1)	*Aspergillus*	*calidoustus*	Sem identificação	Sem identificação	*Aspergillus*	*calidoustus*
Seção Versicolores						
Aspergillus versicolor (n=1)	Sem identificação	Sem identificação	Sem identificação	Sem identificação	*Aspergillus*	*versicolor*
Aspergillus sydowii (n=1)	*Aspergillus*	*sydowii*	*Aspergillus*	*sydowii*	*Aspergillus*	*sydowii*
Seção Clavati						
Aspergilllus clavatus (n=1)	Sem identificação	Sem identificação	*Aspergillus*	*clavatus*	*Aspergillus*	*clavatus*
Seção Terrei						
Aspergillus terreus (n=2)	*Aspergillus*	*terreus*	*Aspergillus*	*terreus*	*Aspergillus*	*terreus*

[1] IVD: *in vitro diagnostics*, aprovado para uso clínico; [2]RUO: *research use only*, apenas para pesquisa

As bibliotecas IVD, RUO e RUO+*in-house* demonstraram identificação correta de gênero em 91,5%, 84,5% e 100%, respectivamente, enquanto que para a identificação de espécie, os resultados foram corretos em 83,1%, 77,4% e 90,1%, respectivamente. Para as espécies crípticas (tabela 3 e 4) as bibliotecas IVD, RUO e RUO+*in-house* demonstraram identificação correta em 31,2%, 18,7% e 62,5%, respectivamente. Os desempenhos das três bibliotecas analisadas estão resumidos na **Figura 10**.

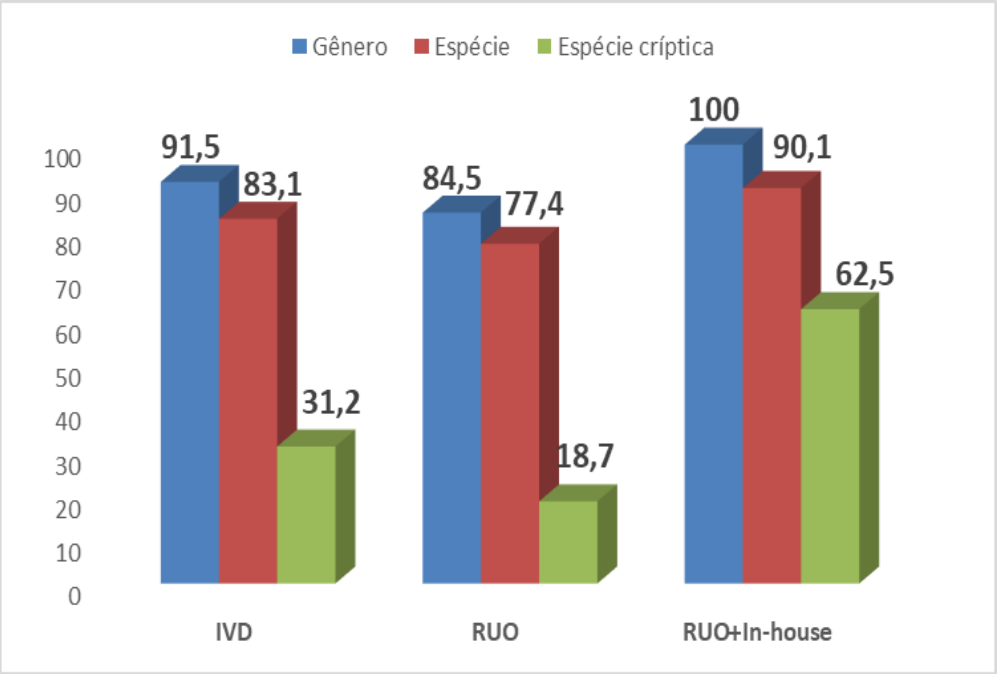

Figura 10. Percentual de identificação de gênero, espécie e espécies crípticas, de acordo com o espectro de referência analisado.

Entre as espécies crípticas, o sistema IVD identificou corretamente as espécies *A. lentulus*, *A. calidoustus* e *A. sydowii*. O sistema RUO identificou as espécies *A. lentulus*, *A. sydowii* e *A. tamari*. O sistema RUO+*in-house* apresentou os melhores resultados, identificando corretamente *A. pseudofischeri*, *A. udagawae*, *A. lentulus*, *A. calidoustus*, *A. tubingensis*, *A. sydowii* e *A. tamarii*.

6. DISCUSSÃO

A identificação molecular dos isolados clínicos de *Aspergillus* do HC-FMUSP mostrou que *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* foram as principais espécies entre os isolados analisados. Uma baixa frequência (<4%) de espécies crípticas foi caracterizada, com apenas um isolado da espécie *A. lentulus (*Seção Fumigati) e outro de *A. parasiticus* (Seção Flavi). Porém, Negri *et al*., 2014 encontraram uma prevalência de 19% de espécies crípticas de *Aspergillus* em 133 amostras de 12 centros brasileiros, coletadas entre 2006 e 2013. O curto período de tempo no qual as amostras foram coletadas no presente estudo, e o fato de serem do mesmo centro médico, podem estar relacionados à baixa prevalência de espécies crípticas identificadas.

Infecções invasivas por espécies crípticas de *Aspergillus* da Seção Fumigati resistentes aos derivados azólicos são preocupantes, já que voriconazol é a primeira escolha terapêutica (Lamoth, 2016; Paterson, 2016). Porém, poucos são os estudos que descreveram a frequência de espécies crípticas de *Aspergillus* da Seção Fumigati resistentes aos azólicos, com percentuais que não ultrapassam 5% do total de isolados clínicos analisados (Lamoth, 2016). Entre os isolados do HC-FMUSP, apenas um *A. lentulus* foi identificado. Trata-se de um isolado obtido de uma amostra do trato respiratório inferior, mas os dados clínicos disponíveis não permitiram estabelecer o diagnóstico de Aspergilose Invasiva (AI). No Hospital do Rim foi documentado o único caso de AI por *A. lentulus* no Brasil, que ocorreu em paciente transplantado renal, sendo que a identificação fenotípica inicial foi de *A. fumigatus* (Bastos *et al*., 2015). Tal caso é uma ilustração das limitações da identificação macro e micromorfologia de isolados do gênero *Aspergillus*, que além de levar vários dias (3-14 dias), é limitada a nível de Seção e pode ser imprecisa em mais de 20% das vezes (Gautier *et al*., 2014).

A EM MALDI-TOF vem sendo explorada há quase uma década para identificação de fungos filamentosos, destacando-se o trabalho pioneiro do grupo francês chefiado pelo Professor Renaud Piarroux (Cassagne *et al*., 2011). Vários métodos de extração de proteínas foram testados e a inativação das estruturas fúngicas (conídios e hifas) com etanol a 70%, e extração com ácido fórmico 70% e acetonitrila, são essenciais e comuns a todos (Cassagne *et al*., 2011, Lau *et al*., 2013).

A diferença entre os protocolos utilizados está no método de coleta das estruturas fúngicas, seja com swab umedecido, como recomendado pela bioMérieux, ou através da coleta de material com bisturi (Lau *et al.*, 2013; Normand *et al*., 2017), ou ainda pelo cultivo em meio líquido e posterior centrifugação do material (Schulthess *et al*., 2014). Os organismos foram analisados inicialmente pela utilização do método de coleta das estruturas fúngicas com *swab* umedecido, mas se mostrou pouco produtível para amostras de crescimento lento e com pouca esporulação (ex. *A. lentulus*), e espectros de má qualidade eram produzidos repetitivamente, apesar da insistência.

Assim, o método alternativo de cultivo em meio líquido com homogeneização constante permitiu que isolados de difícil crescimento em meio sólido produzissem micélio homogêneo e fácil de ser emulsionado, o que facilitou a coleta de material, extração de proteínas, e obtenção de espectros de melhor qualidade. Há críticas quanto à utilização de cultivo em meio líquido para fungos filamentosos, devido ao risco de contaminação por esporos em aerossol e pela incapacidade de visualizar características fenotípicas macro e microscópicas. Mas na rotina laboratorial do HC-FMUSP, a cultura de biópsias para fungos mostra-se segura, sem contaminação cruzada e útil para o diagnóstico de infecções com inóculos pequenos, desde que o material seja inoculado, manuseado e incubado em condições adequadas, com o uso de cabine de biossegurança e tubos devidamente vedados. Em nossos resultados o protocolo alternativo foi o

cultivo em meio líquido com homogeneização constante que demonstrou-se mais eficaz para a obtenção de espectros de melhor qualidade (adaptado por Schulthess, 2014).

O aparelho de EM MALDI-TOF VITEK MS® e sua biblioteca de ER IVD (versão 3.0) foi recentemente aprovado pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para identificação de fungos filamentosos (Rychert *et al*., 2018), e dois recentes estudos mostraram desempenho de 86-93% de identificações corretas de espécies do gênero *Aspergillus* (McMullen *et al*., 2016; Rychert *et al*., 2018), performance similar à apresentada neste estudo. Em comparação a análises prévias realizadas com o equipamento da Bruker e sua biblioteca IVD (Bruker Daltonics, Alemanha), o sistema VITEK MS®, aprovado para uso clínico, apresenta melhor *performance* para identificação de espécies de *Aspergillus* (Lau *et al*., 2013, Normand *et al*., 2017). Estudo recente que comparou as performances dos sistemas IVD do VITEK MS® e Bruker para identificação de fungos filamentosos (Dupont *et al*., 2018), incluindo 56 amostras de *Aspergillus* spp., mostrou desempenho superior do sistema VITEK MS® (72% vs. 55%).

Espécies com resistência intrínseca ao voriconazol, como *A. lentulus* e *A. calidoustus*, foram previamente analisadas e corretamente identificadas pelo sistema VITEK MS® (McMullen *et al*., 2016; Rychert *et al*., 2018). Porém, ao se comparar os isolados avaliados em tais estudos e neste trabalho, houve variabilidade quanto às espécies crípticas de *Aspergillus* analisadas. Por exemplo, as espécies resistentes aos derivados azólicos como *A. fumigatiaffinis, A. udagawae, N. pseudofischeri* (*A. thermomutatus*) não foram avaliadas previamente e, neste estudo, não tiveram identificação correta pelas bibliotecas comerciais, devendo ser incluídas em próximas versões. Outras espécies crípticas não analisadas anteriormente no VITEK MS® são *A. parasiticus* e *A. tamari* da Seção Flavi. As análises deste estudo mostraram que os

isolados de *A. tamari* e de *A. flavus* apresentaram espectros com menos de 25% de similaridade (vide dendrograma **Figura 9**). Tal diferença foi relevante, já que isolados de *A. tamari* não tiveram identificação de gênero e espécie pela biblioteca IVD. Sendo assim, *A. tamari* é outra espécie críptica que deve ter perfis espectrais incluídos na biblioteca comercial, para melhorar o desempenho de identificação de espécies de *Aspergillus* da Seção Flavi. Dentre as espécies da Seção Nigri, destaca-se *A. tubingensis* que também ainda não havia sido analisada no VITEK MS®, e de forma similar à *A. tamari*, não teve identificação de gênero e espécie pela biblioteca IVD.

A construção de bibliotecas de ER *in-house* tem se mostrado necessária para melhor desempenho da EM MALDI-TOF para identificação de fungos filamentosos (Cassagne *et al*., 2011; Lau *et al.*, 2013). Uma das primeiras versões da biblioteca de ER de fungos filamentosos da Bruker (Bruker Daltonics), apresentou menos de 1% de identificações corretas ao ser avaliada por pesquisadores do *National Institutes of Health* dos EUA (Lau *et al*., 2013). Neste mesmo estudo, a biblioteca *in-house* apresentou 88.9% de identificações corretas para os 421 fungos filamentosos analisados.

A maior biblioteca de ER para fungos filamentosos foi construída pelo grupo francês chefiado pelo já mencionado Professor Renaud Piarroux. Tal biblioteca contém 11.851 espectros de 938 espécies, incluindo espécies crípticas de *Aspergillus* (Normand *et al*., 2017). De maneira pioneira, a biblioteca está disponível *online* (*MSI web*) e usuários dos equipamentos da Bruker podem ter acesso e analisar remotamente espectros de massa, e submetê-los para identificação (Normand *et al*., 2017). Em recente análise multicêntrica, o sistema MSI web foi avaliado para identificação de 5018 isolados de *Aspergillus*, com 99,6% de acertos para espécies não-crípticas e 66,1% para espécies crípticas (Imbert *et al*., 2019). Os erros de identificação de espécies

crípticas foram relacionados a espécies filogeneticamente próximas (ex. *A. tennesseensis* e *A. creber* da Seção Versicolores). Entretanto, não houve cruzamento de identificação de espécies crípticas com não-crípticas (Imbert *et al*., 2019). Apesar da casuística menor do presente estudo, os resultados foram similares aos obtidos através do sistema *MSI web*, com 62,5% de identificações corretas de espécies crípticas. McMullen e colaboradores avaliaram o sistema VITEK MS® para identificação de fungos filamentosos e também construíram uma biblioteca *in-house* (sem dados quanto ao número e espécies dos ERs). Neste estudo, entre 18 espécies crípticas de *Aspergillus*, apenas oito tiveram identificação correta (44,4%) (McMullen *et al*., 2016). O desempenho inferior apresentado por esses autores em comparação aos resultados deste estudo, pode ser explicado por limitações como uso restrito de apenas um protocolo de extração de proteínas, e pela biblioteca de ER com poucos representantes de espécies crípticas de *Aspergillus*.

7. CONCLUSÕES

A identificação de espécies crípticas de *Aspergillus* tem relevância clínica e a EM MALDI-TOF pode ser uma alternativa aos métodos moleculares.

A adoção de protocolos de extração de proteínas alternativos ao recomendado pelo fabricante é necessária para melhor o desempenho da técnica.

A otimização da biblioteca comercial de ER do VITEK MS® através da inclusão de perfis espectrais de mais espécies crípticas se faz necessária.

Algumas espécies crípticas de *Aspergillus* podem apresentar identificações ambíguas com espécies filogeneticamente próximas. Porém espécies não-crípticas são discriminadas das crípticas, de maneira eficaz pela EM MALDI-TOF.

8. ANEXO

Anexo A. Aprovação do comitê de ética em pesquisa.

MEDICINA
USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/02/2016, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **040/16** intitulado **"VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES CRÍPTICAS DE ASPERGILLUS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA"** apresentado pelo **Departamento de DERMATOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "e").

Pesquisador (a) Responsável: Gilda Maria Barbaro Del Negro
Pesquisador (a) Executante: Fernanda Marques Américo

CEP-FMUSP, 19 de Fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep@fmusp.br

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature,** v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634793 >.

ALANIO, A. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant Aspergillus species. **Clin Microbiol Infect,** v. 17, n. 5, p. 750-5, May 2011. ISSN 1469-0691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673266 >.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M. Current section and species complex concepts in Aspergillus: recommendations for routine daily practice. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1273, p. 18-24, Dec 2012. ISSN 1749-6632. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23230833 >.

ALDOORY, Y. The mycology of the Aspergilli. In: ALDOORY, Y. e WAGNER, G. E. (Ed.). **Aspergillosis**. Springfield: Charles C Thomas, 1985. p.7-24.

ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Anal. Chem**., v. 47, p. 219–225, 1975.

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

BADDLEY, J. W. et al. Patterns of susceptibility of Aspergillus isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. **J Clin Microbiol,** v. 47, n. 10, p. 3271-5, Oct 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19692558 >.

BALAJEE, S. A.; GRIBSKOV J.L; HANLEY E.; NICKLE D.; MARR K.A. Aspergillus lentulus sp. nov., a new sibling species of A. fumigatus. **Eukaryot Cell,** v. 4, n. 3, p. 625-32, Mar 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755924 >.

BALAJEE, S. A.; MARR, K. A. Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. **Future Microbiol,** v. 1, n. 4, p. 435-45, Dec 2006. ISSN 1746-0921. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17661634 >.

BASTOS VR, **SANTOS DW**, **PADOVAN AC**, **MELO AS**, **MAZZOLIN MDE A**, **CAMARGO LF**, **COLOMBO AL**. Early invasive pulmonary aspergillosis in a kidney transplant recipient caused by Aspergillus lentulus: first Brazilian report. **Mycopathologia. 2015** Apr;179(3-4):299-305. doi: 10.1007/s11046-014-9840-7. Epub 2014 Dec 17.

BEISSWENGER, C.; HESS, C.; BALS, R. Aspergillus fumigatus conidia induce interferon-β signalling in respiratory epithelial cells. **Eur Respir J,** v. 39, n. 2, p. 411-8, Feb 2012. ISSN 1399-3003. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778165 >.

BENNETT, J. W. An Overview of the Genus Aspergillus. In: MACHIDA , M. e GOMI , K. (Ed.). ***Aspergillus*: Molecular Biology and Genomics**: Caister Academic Press, v.1, 2010. cap. 1, p.1-17.

BONGOMIN F.; GAGO S.; OLADELE R.O.; DENNING D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. J. Fungi. 2017;3:57 doi: 10.3390/jof3040057.

BUCKINGHAM, S. J.; HANSELL, D. M. Aspergillus in the lung: diverse and coincident forms. **Eur Radiol,** v. 13, n. 8, p. 1786-800, Aug 2003. ISSN 0938-7994. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783174 >.

CAMPS, S. M. et al. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in Aspergillus fumigatus during azole therapy: a case study and review of the literature. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 56, n. 1, p. 10-6, Jan 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005994 >.

CARVALHO, L. I. C. **Aspergillus e aspergilose – Desafios no combate da doença .** 2013. 56 p. (Dissertação). Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

CASSAGNE, C. et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **PLoS One,** v. 6, n. 12, p. e28425, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194834 >.

CHEN, H. Y.; CHEN, Y. C. Characterization of intact Penicillium spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom,** v. 19, n. 23, p. 3564-8, 2005. ISSN 0951-4198. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16276495 >.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S. Comparison of two matrixassisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. **J Clin Microbiol**., v. 48., p. 1169–1175, 2010.

CHMIEL, J. F. ; AKSAMIT, T. R., CHOTIRMALL, S. H., DASENBROOK, E. C., ELBORN, J. S., LIPUMA, J. J., RANGANATHAN, S. C., WATERS, V. J. AND RATJEN, F. A.: Antibiotic management of lung infections in cystic fibrosis. I. The microbiome, methicillin-resistant Staphylococcus aureus, gram-negative bacteria, and multiple infections. *Ann Am Thorac Soc*, 11(7), 1120-9 (2014) DOI:10.1513/AnnalsATS.201402-050AS

CLAYDON, M. A.; DAVEY, S. N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D. B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nat. Biotechnol.** v. 14., p. 1584–1586, 1996.

DAGENAIS, T. R.; KELLER, N. P. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. **Clin Microbiol Rev,** v. 22, n. 3, p. 447-65, Jul 2009. ISSN 1098-6618. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19597008 >.

DAHL, P. F. Flash of the Cathode Rays: A History of J. J. Thomson's Electron; **Institute of Physics Publishing**: Bristol, U.K., 1997.

DE ALMEIDA JUNIOR, JOÃO NOBREGA. Padronização da espectrometria de massas MALDI-TOF para identificação de cepas de *Trichosporon* spp. de importância médica São Paulo (2014). Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

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, May 2012. ISSN 1469-0691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883662 >.

DE HOOG, G. S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 3rd ed. Utrecht , The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011.

DE RESPINIS, S. et al. MALDI-TOF MS of Trichoderma: a model system for the identification of microfungi. **Mycological Progress,** v. 9, p. 79–100, 2010.

DENNING, D.W.; **CADRANEL, J**.; **BEIGELMAN-AUBRY, C**; **ADER, F**; **CHAKRABARTI, A**.; **BLOT S**, **ULLMANN, A.J**.; **DIMOPOULOS, G**.; **LANGE, C**.; **European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases and European Respiratory Society**. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. European Respiratory Journal 2016 47: 45-68; DOI: 10.1183/13993003.00583-2015

DUPONT D, **NORMAND AC**, **PERSAT F**, **HENDRICKX M**, **PIARROUX R**, **WALLON M**. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of moulds in the routine microbiology laboratory. **Clin Microbiol Infect. 2018** Oct 28. pii: S1198-743X(18)30716-X. doi: 10.1016/j.cmi.**2018**.10.013.

EIGNER, U.; HOLFELDER, M.; OBERDORFER, K.; BETZ-WILD, U.; BERTSCH, D.; FAHR, A. M. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionizationtime- of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. **Clin Lab**., v. 55., p. 289–296, 2009.

FENN, J. B. Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began. **J. Biomol**. **Tech**., v. 13., p. 101–118, 2002.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrom Rev**., v. 20., p.157–171, 2001.

FERREIRA W.; SOUSA J. Microbiologia. Micoses subcutâneas e sistémicas. 2, pp. 329 – 342. Lidel – Edições Técnicas, 2000.

GAUTIER, M.; NORMAND, A. C.; RANQUE, S. Previously unknown species of Aspergillus. **Clin Microbiol Infect,** v. 22, n. 8, p. 662-9, Aug 2016. ISSN 1469-0691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27263029 >.

GAUTIER M.; **RANQUE S**.; **NORMAND A.C**.; **BECKER P**.; **PACKEU A**.; **CASSAGNE C**.; **L'OLLIVIER C**.; **HENDRICKX M**.; **PIARROUX R**. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. **Clin Microbiol Infect.** 2014 Dec;20(12):1366-71. doi: 10.1111/1469-0691.12750. Epub 2014 Dec 12**.**

GEISER, D. M.; Klich M.A.; Frisvad J.C.; Peterson S.W.; Varga J.; Samson R.A.; The current status of species recognition and identification in Aspergillus. **Stud Mycol,** v. 59, p. 1-10, 2007. ISSN 0166-0616. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18490947 >.

GEISER, D. M. Sexual structures in Aspergillus: morphology, importance and genomics. **Med Mycol,** v. 47 Suppl 1, p. S21-6, 2009. ISSN 1460-2709. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18608901 >.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C.; MILLINGTON, M. A.; DENNING, D.W.; COLOMBO, A.L.; PASQUALOTTO, A.C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. v. 59, p 145-150 Issue 3, 2016. Disponível em: < **https://doi.org/10.1111/myc.12427** >

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, Feb 2003. ISSN 1474-1776. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563305 >.

GRENFELL R.C.; DA SILVA JUNIOR A.R.; DEL NEGRO G.M.; MUNHOZ, R.B.; GIMENES V.M.; ASSIS D.M.; ROCKSTROH A.C.; MOTTA A.L.; ROSSI F.; JULIANO L., BENARD G., DE ALMEIDA JÚNIOR J.N.; Identification of Candida haemulonii Complex Species: Use of ClinProTools (TM) to Overcome Limitations of the Bruker Biotyper(TM), VITEK MS(TM) IVD, and VITEK MS(TM) RUO Databases. Front Microbiol. Jun 16;7:940. doi: 10.3389/fmicb.2016.00940. eCollection 2016.

HETTICK, J. M. et al. Discrimination of Penicillium isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Rapid Commun Mass Spectrom,** v. 22, n. 16, p. 2555-60, Aug 2008. ISSN 0951-4198. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18646251 >.

HOPE, W. W.; WALSH, T. J.; DENNING, D. W. The invasive and saprophytic syndromes due to Aspergillus spp. **Med Mycol,** v. 43 Suppl 1, p. S207-38, May 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110814 >.

HOWARD, S. J. Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. **Mycopathologia,** v. 178, n. 5-6, p. 435-9, Dec 2014. ISSN 1573-0832. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24969615 >.

HUANG, Y. et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for the identification of clinical filamentous fungi. **World J Microbiol Biotechnol,** v. 33, n. 7, p. 142, Jul 2017. ISSN 1573-0972. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28608323 >.

IMBERT S[-], **NORMAND A.C**[-], **GABRIEL F**., **CASSAING S**., **BONNAL C**., **COSTA D**., **LACHAUD L**[-], **HASSEINE L**., **KRISTENSEN L**., **SCHUTTLER C**., **RABERIN H**., **BRUN S**., **HENDRICKX M**., **STUBBE D**., **PIARROUX R**., **FEKKAR A**. Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of cryptic and rare species of Aspergillus by MALDI-TOF. **Med Mycol.** 2019 Jan 25. doi: 10.1093/mmy/myz004.

JACOBS, F. et al. An observational efficacy and safety analysis of the treatment of acute invasive aspergillosis using voriconazole. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 31, n. 6, p. 1173-9, Jun 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971820 >.

JENKS, J. D.; HOENIGL, M. Treatment of Aspergillosis. **J Fungi (Basel),** v. 4, n. 3, Aug 2018. ISSN 2309-608X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30126229 >.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; HILLENKAMP, F. Influence of the wavelength in highirradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. **Anal Chem**., v. 57., p. 2935–2939, 1985.

KLICH, M. A. Biogeography of Aspergillus species in soil and litter. **Mycologia,** v. 94, n. 1, p. 21-7, 2002 Jan-Feb 2002. ISSN 0027-5514. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156474 >.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs. North Ryde**:** 197 p. 1988.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet,** v. 359, n. 9312, p. 1135-44, Mar 2002. ISSN 0140-6736. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943280 >.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. **Eur Respir Rev,** v. 20, n. 121, p. 156-74, Sep 2011. ISSN 1600-0617. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881144 >.

KRIJGSHELD, P. et al. Development in Aspergillus. **Stud Mycol,** v. 74, n. 1, p. 1-29, Mar 2013. ISSN 0166-0616. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450714 >.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p. ISBN 85-7378-123-8.

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, Feb 2014. ISSN 1469-0691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594150 >.

LAMOTH, F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice . Mini review Front. Microbiol., 17 May 2016 | Disponível em <**https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00683** >

LASS-FLÖRL, C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO A.; CUENCA-ESTRELLA M.; PERKHOFER S.; RODRIGUEZ-TUDELA J.L.; In vitro activities of various antifungal drugs against Aspergillus terreus: Global assessment using the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 53, n. 2, p. 794-5, Feb 2009. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064891 >.

LATGÉ J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 12:2, pp. 310–350. (1999)

LATGÉ J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*. 9:8, pp. 382-389. (2001)

LAU, A. F.; DRAKE S.K.; CALHOUN L.B.; HENDERSON C.M.; ZELAZNY A.M. 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, Mar 2013. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269728 >.

LUO, G.; MITCHELL, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol,** v. 40, n. 8, p. 2860-5, Aug 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149343 >.

MARINACH-PATRICE, C.; LETHUILLIER A.; MARLY A.; BROSSAS J.Y.; GENÉ J.; SYMOENS F.; DATRY A.; GUARRO J.; MAZIER D.; HENNEQUIN C. Use of mass spectrometry to identify clinical Fusarium isolates. **Clin Microbiol Infect,** v. 15, n. 7, p. 634-42, Jul 2009. ISSN 1469-0691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19456834 >.

MASIH, A.; SINGH P.K.; KATHURIA S.; AGARWAL K.; MEIS J.F.; CHOWDHARY A. Identification by Molecular Methods and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Antifungal Susceptibility Profiles of Clinically Significant Rare Aspergillus Species in a Referral Chest Hospital in Delhi,

India. **J Clin Microbiol,** v. 54, n. 9, p. 2354-64, Sep 2016. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27413188 >.

MAVRIDOU, E.; BRÜGGEMANN R.J.; MELCHERS W.J.; MOUTON J.W.; VERWEIJ P.E . Efficacy of posaconazole against three clinical Aspergillus fumigatus isolates with mutations in the cyp51A gene. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 54, n. 2, p. 860-5, Feb 2010. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917751 >.

MCCARTHY, D. S.; PEPYS, J. Pulmonary aspergilloma: Clinical immunology. **Clinical Allergy,** v. 3, p. 57-70, 1973.

MCCORMICK, A.; LOEFFLER, J.; EBEL, F. Aspergillus fumigatus: contours of an opportunistic human pathogen. **Cell Microbiol,** v. 12, n. 11, p. 1535-43, Nov 2010. ISSN 1462-5822. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716206 >.

MCMULLEN A.R., **WALLACE M.A**., **PINCUS D.H**., **WILKEY K**., **BURNHAM C.A**. Evaluation of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Clinically Relevant Filamentous Fungi. **J Clin Microbiol.** 2016 Aug;54(8):2068-73. doi: 10.1128/JCM.00825-16. Epub 2016 May 25.

MURRAY , P. R.; ROSSENTHAL , K. S.; PFALLER , M. A. **Microbiologia : Médica**. 5ª ed. Elsevier, 2006.

NEGRI C.E.; GONÇALVES S.S.; XAFRANSKI H.; BERGAMASCO M.D.; AQUINO V.R.; CASTRO P.T.; COLOMBO A.L. Cryptic and rare Aspergillus species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. J Clin Microbiol. 2014 Oct;52(10):3633-40. doi: 10.1128/JCM.01582-14. Epub 2014 Jul 30. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078909.

NORMAND,A.C.; BECKER, P.B.; GABRIEL, F.; CASSAGNE, C.C.; ACCOCEBERRY, A I.; GARI-TOUSSAINT, C.M.; HASSEINE, D L.; DE GEYTER, D D. E; PIERARD, D. ; SURMONT, E I. ; DJENAD, F F. ; DONNADIEU, A J. L.; PIARROUX, G M. ; RANQUE, H S.; HENDRICKX, A M. ; PIARROUXA, B.R. Validation of a New Web Application for Identification of Fungi by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. vol 55 Issue 9 Journal of Clinical Microbiology. 2017. **DOI:** 10.1128/JCM.00263-17

PARAMYTHIOTOU, E.; FRANTZESKAKI F.; FLEVARI A.; ARMAGANIDIS A.; DIMOPOULOS G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules,** v. 19, n. 1, p. 1085-119, Jan 2014. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24445340 >.

PARK, J. H.; SHIN J.H.; CHOI M.J.; CHOI J.U.; PARK Y.J.; JANG S.J.; WON E.J.; KIM S.H.; KEE S.J.; SHIN M.G.; SUH S.P. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-fight mass spectrometry for identification of 345 clinical isolates of Aspergillus species from 11 Korean hospitals: comparison with molecular

identification. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 87, n. 1, p. 28-31, Jan 2017. ISSN 1879-0070. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28336134 >.

PASQUALOTTO, A. C. **Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention**. Porto Alegre: Springer Science+Business Media B.V., 2010. 1027 p. ISBN 978-90-481-2407-7.

PATTERSON T.F., **THOMPSON G.R. 3**rd, **DENNING D.W.**, **FISHMAN J.A.**, **HADLEY S.**, **HERBRECHT R.**, **KONTOYIANNIS D.P.**, **MARR K.A.**, **MORRISON V.A.**, **NGUYEN M.H.**, **SEGAL B.H.**, **STEINBACH W.J.**, **STEVENS D.A.**, **WALSH T.J.**, **WINGARD J.R.**, **YOUNG J.A.**, **BENNETT J.E**. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.** 2016 Aug 15;63(4):e1-e60. doi: 10.1093/cid/ciw326. Epub 2016 Jun 29.

POSTERARO B, DE CAROLIS E, VELLA A, SANGUINETTI M. maldi tof mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. expert rev proteomics. 2013;10:151–64).

RAJA, N. S.; SINGH, N. N. Disseminated invasive aspergillosis in an apparently immunocompetent host. **J Microbiol Immunol Infect,** v. 39, n. 1, p. 73-7, Feb 2006. ISSN 1684-1182. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16440127 >.

RANQUE, S.; NORMAND A.C.; CASSAGNE C.; MURAT J.B.; BOURGEOIS N.; DALLE F.; GARI-TOUSSAINT M.; FOURQUET P.; HENDRICKX M.; PIARROUX R. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. **Mycoses,** v. 57, n. 3, p. 135-40, Mar 2014. ISSN 1439-0507. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895114 >.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The Genus Aspergillus**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 686 p.

RICHARDSON M.D.; JOHNSON E.M. Fungal infection. In: Opportunistic fungal infections. [S.l.]: Blackwell Science; 2000. p.30-6.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D. W. Fungal Infection: Diagnosis and Management. 3rd ed. Victoria: Blackwell Publishing, 2003. ISBN 0-443-07937-4.

RUPF, S.; BREITUNG, K.; SCHELLENBERGER, W.; MERTE, K.; KNEIST, S.; ESCHRICH, K. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Oral Microbiol Immunol., v. 20., p. 267–273, 2005.

RYCHERT J., **SLECHTA E.S**., **BARKER A.P**., **MIRANDA E**., **BABADY N.E**., **TANG Y.W**., **GIBAS C**., **WIEDERHOLD N**., **SUTTON D**., **HANSON K.E**. Multicenter Evaluation of the Vitek MS v3.0 System for the Identification of Filamentous Fungi. **J Clin Microbiol.** 2018 Jan 24;56(2). pii: e01353-17. doi: 10.1128/JCM.01353-17. Print 2018 Feb.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: CSH, 1989. 1546 p. ISBN 0879693096.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in Aspergillus? **Med Mycol,** v. 47 Suppl 1, p. S13-20, 2009. ISSN 1460-2709. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255907 >.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **J Clin Microbiol,** v. 55, n. 2, p. 369-379, Feb 2017. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27807151 >.

SCHULTHESS B., **BLOEMBERG G.V**., **ZBINDEN R**., **BÖTTGER E.C**., **HOMBACH M**. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. **J Clin Microbiol.** 2014 Apr;52(4):1089-97. doi: 10.1128/JCM.02399-13. Epub 2014 Jan 22.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin Infect Dis**., v. 49., p. 543–551, 2009.

SHAW, E. I.; MOURA H.; WOOLFITT A.R.; OSPINA M.; THOMPSON H.A.; BARR J.R. Identification of biomarkers of whole Coxiella burnetii phase I by MALDI-TOF mass spectrometry. **Anal Chem,** v. 76, n. 14, p. 4017-22, Jul 2004. ISSN 0003-2700. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253637 >.

SLEIMAN, S.; HALLIDAY C.L.; CHAPMAN B.; BROWN M.; NITSCHKE J.; LAU A.F.; CHEN S.C. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Aspergillus, Scedosporium, and Fusarium spp. in the Australian Clinical Setting. **J Clin Microbiol,** v. 54, n. 8, p. 2182-6, Aug 2016. ISSN 1098-660X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27252460 >.

TAKAZONO, T.; IZUMIKAWA, K. Recent Advances in Diagnosing Chronic Pulmonary Aspergillosis. **Front Microbiol,** v. 9, p. 1810, 2018. ISSN 1664-302X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30174658 >.

VALENTE, JRS. Estudo molecular de estirpes de Aspergillus fumigatus isolados em aviários e em aves diagnosticadas com aspergilose. Possíveis implicações na Saúde Pública. FCT: DCTB - Dissertações de Mestrado 2014. http://hdl.handle.net/10362/13814

VAN DER LINDEN, J. W.; JANSEN R.R.; BRESTERS D.; VISSER C.E.; GEERLINGS S.E.; KUIJPER E.J.; MELCHERS W.J.; VERWEIJ P.E. Azole-resistant central nervous system aspergillosis. **Clin Infect Dis,** v. 48, n. 8, p. 1111-3, Apr 2009. ISSN 1537-6591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19272019 >.

YII, A. C.; KOH M.S.; LAPPERRE T.S.; TAN G.L.; CHOTIRMALL S.H. The emergence of. **Front Biosci (Schol Ed),** v. 9, p. 127-138, 01 2017. ISSN 1945-0524. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27814579 >.

ZHU, M.; GENG, J. J.; WANG, M. Clinical application of ITS and β- tubulin gene sequencing in the identification of Aspergillus spp. **Chinese Journal of Laboratory Medicine**, p. 353–357, 2011.