

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

**ESTRATÉGIAS DE IDENTIFICAÇÃO INTEGRADA DE FUNGOS MEDIANTE
MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS E NÃO-MICROBIOLÓGICOS**

LUCAS JARDIM DO NASCIMENTO

**Porto Alegre
2016**

LUCAS JARDIM DO NASCIMENTO

**ESTRATÉGIAS DE IDENTIFICAÇÃO INTEGRADA DE FUNGOS MEDIANTE
MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS E NÃO-MICROBIOLÓGICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção de grau de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

Co-Orientador: Anderson Ramos Carvalho

**Porto Alegre
2016**

AGRADECIMENTOS

A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de meus amáveis e eternos familiares (os quais não especificarei, pois cada um contribuiu de uma forma e sabe o seu grau de importância), que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer a vocês, minha imensa gratidão e sempre amor.

Um agradecimento especial aos meus queridos amigos, ainda que poucos, tiveram sua margem de contribuição imensa em diferentes momentos. Até gostaria de listar cada um nominalmente ao lado de suas contribuições para deixar registrado suas participações, mas seria de grande constrangimento a mim e, por isso, deixo registrado aqui em anonimato meus sentimentos de gratidão a cada uma destas pessoas. Contudo, não poderia deixar de mencionar dois grandes amigos em separado que me auxiliaram mesmo quando estive a ponto de desistir em milhares de momentos e que, entre risos e sermões, me ensinaram a alegria do conhecimento e do lazer. Eles, que mesmo tendo de cometer sacrifícios, nunca me negaram seus tempos, seja para esclarecer dúvidas ou apenas viajar em meus devaneios; eles que acredito ter conhecido na hora e no momento correto; eles a quem tanto devo. É assim que fico sem palavras para melhor expressar minha imensa gratidão a meus dois mentores, amigos e neste momento também orientadores: Anderson e George.

Um muito obrigado a todos.

Lucas Jardim do Nascimento

Uma mente perturbada está sempre ativa, saltitando daqui para lá, sendo difícil de controlar; mas a mente disciplinada é tranquila; portanto, é bom ter sempre a mente sob controle.

Sakyamuni

RESUMO

O presente trabalho consiste em um levantamento de dados sobre técnicas microbiológicas e não-microbiológicas de identificação de espécies fúngicas. Foi realizado com intuito de investigar a situação atual dessas técnicas na rotina laboratorial e de pesquisa. Os dados levantados indicam uma tendência na utilização conjunta de diversas técnicas, de modo a assegurar, ao máximo, a identificação precisa da espécie. Contudo, algumas das técnicas propostas na literatura são onerosas em demasiado para aplicação generalizada. Vários trabalhos relatam a consolidação da técnica fenotípica por FTIR-ATR, geralmente associada a técnicas estatísticas de análise multivariada. As limitações dessa estratégia foram consideradas superáveis, principalmente quando essa inclui a aplicação conjunta de técnicas microbiológicas mais precisas e a validação de métodos.

Palavras-chave: FTIR-ATR, Métodos de identificação microbiológicos, Métodos de identificação não microbiológicos, Análise multivariada.

ABSTRACT

In this work, authors presented a review of scientific data on the identification of fungal species by microbiological and non-microbiological techniques. It focused the current state of some techniques used in clinic routine and research of fungal species. Overall, the need to identify new emerging resistant fungal species -as well the misidentification of preexisting ones- has motivated a broad approach towards the investigation of increasingly more accurate and reliable techniques. In that context, the prevalence of the analytic approach based on the association of different microbiological and non-microbiological techniques was clearly showed all through the last decade. Despite many advantages were linked to Mass Spectrophotometric and Nuclear Magnetic Resonance techniques, in fact both techniques are quite expensive and difficult to insert into the current laboratorial routine. Many authors have been recognized the advantageous use of the phenotypic approach combining Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and multivariate statistic techniques. Despite some restrictions raised by different authors, this analytical approach seem to be reliable, accessible and easily validated, if compared with other instrumental techniques.

Keywords: FTIR-ATR, Methods of microbiological identification, Non-microbiological identification methods, Multivariate analysis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Análise Macro/Micromorfológica (Metodologia Clássica)

1.2 Assimilação e fermentação de compostos

1.3 Enzimaimunoensaio

1.4 PCR

1.5 MALDI-TOF

1.6 FTIR

1.7 Análise Multivariada

2 MATERIAIS E MÉTODOS

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

ANEXO 1 – “Instruções aos Autores” de Brazilian Journal of Microbiology

1 INTRODUÇÃO

A identificação de fungos de forma confiável é uma busca constante na clínica e na pesquisa, sendo necessárias, muitas vezes, informações de mais de uma técnica para que obtenhamos o gênero e espécie de um fungo. No passado, tal informação era obtida apenas através de métodos bioquímicos e morfológicos (atualmente podendo ser considerados como metodologias clássicas). Com o avanço tecnológico, verificou-se um aumento no número de fungos identificados presentes no ecossistema, bem como espécimes que antes eram classificadas de forma errônea devido às limitações das técnicas (Ruhnke et al., 2003; Lopandic et al., 2006; Spencer et al., 2011). Dentre essas metodologias que possibilitam diferir entre espécies mais próximas temos as técnicas genotípicas. Elas executam a identificação genética de um fungo, por se tratar de um grupo de técnicas de alta confiabilidade, dessa maneira podem ser usadas para confirmar resultados obtidos por outras técnicas menos onerosas e que não dispõem de tamanha infalibilidade (Latouche et al., 1997; Sullivan e Coleman, 1998; Ahmad et al., 2002; Freydiere et al., 2001; White et al., 2005; Spencer et al., 2011).

Durante a identificação de um fungo, o uso de um conjunto de técnicas aumenta a confiabilidade dos resultados, assim sendo capaz de garantir que falhas proporcionadas pelas suas variações de natureza analítica sejam reduzidas mediante complementaridade entre resultados de forma a obter uma resposta fidedigna, (Yeo e Wong, 2002; Ruhnke et al., 2003; Perfect 2013; Powers-Fletcher e Hanson, 2016) pois nem sempre as técnicas genotípicas são consideradas a análise “padrão ouro” e geram resultados que isoladamente reproduzem a real identidade do fungo, como é o caso de amostras de infecções no sistema circulatório por espécies de *Candida* em que são consideradas técnicas de cultivo a forma padrão de diagnóstico (Phoompoung e Chayakulkeeree, 2016).

A busca por novas técnicas que venham a complementar ou modificar a forma de diagnóstico clínico vem sendo relatada, pois se sabe que as técnicas atualmente empregadas detêm desvantagens que prejudicam ou limitam a sua empregabilidade (Caliendo et al., 2013; Phoompoung e Chayakulkeeree, 2016; Powers-Fletcher e Hanson, 2016). Uma nova alternativa atualmente empregada no diagnóstico fúngico tem

sido as técnicas espectroscópicas, como a “Ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada a detector espectrofotômetro de massas de tempo de voo” (MALDI-TOF, *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*). Essa técnica é dita por seus usuários como sendo comparável a técnicas genotípicas em sensibilidade (Seng et al., 2009; Cherkaoui et al., 2010; Patel 2015; Cassagne et al., 2016; Baker et al., 2017), apesar de seu elevado preço ainda a inviabilizar para aquisição isolada de uma instituição (Wieser et al. 2012). Em contrapartida, outra técnica atualmente em desenvolvimento com valor de aquisição e implementação mais baixo é “Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier” (FTIR, *Fourier Transform infrared spectroscopy*), que permite diferenciar fungos devido a sua composição estrutural (Bernard e Latgé 2001, Wenning et al., 2002; Naumann 2009; Wenning e Scherer 2013). Tal técnica ainda pode ter suas capacidades analíticas elevadas por acessórios, como “Atenuador de refletância total” (ATR, *Attenuated total reflectance*), e por meio de métodos de análise multivariada, como “Análise de componentes principais” (PCA, *Principal component Analysis*) e “Análise hierárquica de cluster” (HCA, *Hierarchical cluster analysis*) (Smith-Moritz et al. 2011; Santos et al., 2012 ;Ergin et al., 2013; Wenning e Scherer 2013; Pomerantz et al. 2014).

Uma revisão das técnicas utilizadas na composição da identificação fúngica foi realizada para melhor compreensão das técnicas em uso, sendo elas: análises macro/micromorfológica, assimilação e fermentação de compostos, enzima-imunoensaio, reação em cadeia da polimerase, MALDI-TOF (Alexander e Pfaller, 2006; Caliendo et al., 2013). Considerou-se adequada, também, a apresentação de informações semelhantes sobre a técnica de FTIR e análise multivariada que são de importância para as considerações sobre os materiais da revisão.

1.1 Análise Macro/Micromorfológica (Metodologia Clássica)

A análise morfológica é a avaliação inicial da amostra a ser analisada, sendo a primeira etapa a de análise macroscópica a avaliação de características organolépticas da amostra. Dessa maneira, busca-se a conjunção dos dados encontrados com os achados clínicos. A análise microscópica que se segue pode ser feita com um agente de

contraste ou corante para facilitar a identificação de características micromorfológicas e, em alguns casos, exaltar uma dada característica chave na montagem da matriz analítica usada para determinar o resultado (McGinnis 1980; Larone 1987; Abdel-Sater et al., 2016). Baseado no que é analisado nessas etapas, realiza-se um posterior cultivo da amostra para isolamento do fungo em um meio de cultura específico ou inespecífico. Esse cultivo pode ser incubado a diferentes temperaturas e/ou condições de atmosfera, sendo este um fator que pode fornecer mais dados de identificação, pois é sabido que, por exemplo, *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* que, morfológicamente, são muito semelhantes, mas se diferem quanto ao crescimento a 45°C (Pinjon et al., 1998; Ellepola et al., 2003, Resende et al., 2004; ANVISA 2004).

Após um crescimento adequado do fungo, o qual varia de 1 a 30 dias dependendo dos fatores de cultivos e intrínsecos do fungo, são verificados novamente os aspectos macroscópicos do crescimento fúngico, e colônias isoladas são re-cultivadas, desta vez para provas bioquímicas ou complementares. Microscopia pode ser refeita se considerado necessário (McGinnis 1980; Larone 1987).

1.2 Assimilação e fermentação de compostos

Consiste no cultivo de colônias isoladas de fungos em meios específicos, que têm uma composição que, mediante atividade metabólica fúngica, apresenta uma modificação. Ao ser interpretada (geralmente de forma binária), essa modificação leva à composição do conjunto de dados que, por sua vez, leva à identificação. Alguns métodos comerciais relatados para função: os meios Agar cromogênico, Galeria API 20C Aux e Método Vitek YBC (cartão bioquímico para leveduras) (Terrence e Dolan, 1971, Moraes et al. 2010; ANVISA 2004).

O meio ágar cromogênico consiste em um suporte de cultivo fúngico, no qual certos componentes sofrem efeito do metabolismo celular dos fungos durante seu crescimento. Estes metabólitos são pré-desenhados para gerarem alterações de cor na colônia em função do produto formado (ressaltando que pode ocorrer formação de halos ao redor da colônia, coloridos ou não), sendo esta mudança de coloração a responsável pela cor que leva a identificação do fungo ao se comparar com o padrão de cores fornecido pelo fabricante. O uso desse método de isolamento e identificação permite o

trabalho de amostras brutas sem prévio isolamento, contudo deve-se saber ao menos o fungo que se busca, pois há uma ampla variedade de meios, e eles são específicos em nível de gênero e alguns até mesmo de espécie. No entanto, ainda que alguns possam ser mais gerais, seu poder discriminatório também se reduz. As espécies de *Candida* são um exemplo geralmente utilizado na literatura para defender o uso desta técnica (Baumgartner et al.,1996; Freydiere et al., 2001; Cooke et al.,2002; Yucesoy e Marol, 2003).

Os métodos Vitek YBC e galeria API 20 C Aux trabalham por um mecanismo similar ao ágar cromogênico, porém consistem em uma identificação mediante um conjunto de análises bioquímicas, que vão de capacidade de assimilação e fermentação de componentes até a capacidade de crescimento em meios com substâncias estressantes ou nocivas a alguns organismos (citado como exemplo o uso de cicloheximida que, ao ser internalizado pela célula fúngica, leva à inibição de síntese protéica). Esse crescimento leva a uma modificação no meio onde foi inoculado o fungo, e estas alterações, ao serem interpretadas, levam a um conjunto de resultados. Tais resultados quando comparados em uma tabela possibilitam a identificação do fungo (Freydiere et al., 2001; Ahmad et al.,2002; Moraes 2010).

1.3 Enzimaimunoensaio

A técnica, geralmente, consiste na formação de um complexo imunoenzimático que catalisa um substrato no meio, proporcionando a formação de um produto que pode ser dosado, assim avaliando a presença de um antígeno ou anticorpo. A técnica tem diferentes variedades, mas a empregada no diagnóstico fúngico, habitualmente, é o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), que pode ser subdividido em direto, indireto, competitivo e sanduíche (Crowther 2002; Yeo e Wong, 2002; White et al., 2005). Tal técnica é válida para avaliação de exposição prévia ou estágio de infecção por um fungo devido à alta imunogenicidade de seus componentes de parede celular (Yeo e Wong, 2002).

ELISA direto consiste na fixação de um antígeno presente na amostra em uma superfície, onde a posterior ligação de um anticorpo marcado com uma enzima desencadeando a reação; indireta consiste em processo semelhante, porém desta vez o

antígeno já está fixado à superfície e quem se ligará é um anticorpo presente na amostra, a posterior ligação de um anticorpo marcado com uma enzima a este complexo imunológico formado. A técnica sanduíche pode ser baseada tanto na técnica direta como na indireta, com a diferença que a um anticorpo fixado previamente e este se ligará a um antígeno, a partir deste ponto segue a mesma linha de uma das duas metodologias. A competitiva consiste na incubação de anticorpos com a amostra para que assim ele se ligue aos antígenos da amostra, posteriormente estes são transferidos a um meio onde há antígenos fixados a uma superfície, logo todo anticorpo que não se ligou a antígenos da amostra se aderiram aos antígenos na superfície e assim ficaram fixados. Estes poderão desencadear a reação após a remoção dos anticorpos não ligados e adição do substrato, sendo avaliado assim a quantidade de produto formado em comparação a um branco que teve a mesma quantidade de anticorpos adicionados inicialmente (Crowther 2002).

1.4 PCR

A técnica consiste em uma reprodução da reação de amplificação de regiões do DNA que ocorrem *in vivo*, porém *in vitro*, requerendo assim componentes chave para reação como Enzima polimerase (catalisador da reação), Oligonucleotídeos (iniciadores e sinalizadores para enzima polimerase), Tampão (para manter o pH na condição ótima de reação), Cofatores enzimáticos e desoxirribonucleotídeos (substrato da enzima). Tal processo se fundamenta em três pontos: desnaturação por calor das ligações entre as duas fitas de DNA, redução da temperatura para ligação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) às fitas de DNA, e extensão da fita catalisada por uma enzima polimerase. *Primers* são desenhados para terem elevada especificidade pela região de desejo a ser amplificada; a enzima catalisa a amplificação apenas em um sentido. Após ciclos de amplificação destas regiões, é necessária a separação eletroforética dos fragmentos amplificados e comparação com padrão para identificação do fungo (Viljoen et al., 2005).

A técnica tem inúmeras variações desenvolvidas para seu refino ou para agregar uma dada característica necessária. Algumas delas são a amplificação polimórfica aleatória de DNA (RAPD, *random amplified polymorphic DNA*), aninhada (*Nested*), em

tempo real (*real time*), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) e múltiplo (*multiplex*) (Viljoen et al., 2005).

RAPD PCR consiste no uso de oligonucleotídeos inespecíficos de tamanho médio entre 9-10 pares de bases, temperatura menor que a reação geralmente utilizada na técnica de PCR, não sendo requerido conhecer a região a ser amplificada. Estas duas modificações levam a uma amplificação de diversas regiões da fita de DNA por reduzirem a especificidade da reação, proporcionando um grande número de fragmentos que quando separados por eletroforese em gel permitem a identificação, pois a sequência formada por essa separação pode ser atribuído como uma assinatura única a cada fungo (Mehling 1995; Viljoen et al., 2005).

Nested PCR utiliza um processo de dupla amplificação, em que o primeiro *primer* usado é maior e compreende a região de ligação do segundo *primer*, assim permitindo que o produto da primeira amplificação seja utilizado para amplificação da região de oligonucleotídeos. Sendo estas reações que correm em separado, justamente por requerer a formação do produto da primeira amplificação para se poder realizar a segunda. Isso confere maior especificidade à técnica, uma vez que dificilmente existiriam duas regiões na fita de DNA com tamanha similaridade que ambos os grupos de oligonucleotídeos se liguem (Viljoen et al., 2005).

PCR *in real time* consiste em uma técnica de PCR automatizada, sendo necessário um termociclador com detector de fluorescência, no qual a diferença ocorre pela adição de componentes fluorescentes ao DNA. Eles levam a um sinal captado pelo equipamento, que permite a quantificação do número de fitas formadas em tempo real (Viljoen et al., 2005; Oliveira 2010).

RFLP PCR faz uso de endonucleases que clivam o DNA em regiões específicas, em que essas, posteriormente, são separadas, e se pode avaliar o tamanho da região. Organismos distintos apresentaram tamanhos e/ou padrões diferentes de bandas. A detecção pode ser feita posteriormente por um método de hibridização destes fragmentos isolados com sondas radioativas (Viljoen et al., 2005).

PCR *multiplex* permite o uso de mais de um *primer* para realizar a amplificação de mais de uma região de DNA simultaneamente. Essa reação necessita ser realizada por um termociclador, devido ao refino necessário nas alterações de temperatura

reacionais no processo para evitar a dimerização destes oligonucleotídeos (Viljoen et al., 2005).

1.5 MALDI-TOF

O processo automatizado de MALDI consiste na utilização de um laser que fornece energia necessária para ionização e dessorção de uma amostra. Estes fragmentos ionizados são carregados por meio de um campo eletromagnético, o qual, por meio de um detector TOF, consegue distingui-los quanto a sua massa, carga e tempo de voo, devido a uma separação dos fragmentos de acordo com sua movimentação pelo campo eletromagnético (sendo essa dependente da relação massa-carga). A análise do padrão de fragmentação dos componentes exibidos no espectro gera uma assinatura única a cada componente, permitindo a identificação do microrganismo pela análise dos padrões de fragmentação em função do tempo de voo apresentados no espectro. O uso de matriz (componente capaz de absorver a energia fornecida pelo laser facilitando a dessorção da amostra e transferindo esta carga posteriormente para os fragmentos da amostra de forma menos intensa que o laser diretamente) ou uso de uma amostra de componentes isolada do microrganismo (geralmente proteínas, ácidos graxos e açúcares) pode elevar a sensibilidade da técnica (Wiser et al., 2012; Patel 2015).

1.6 FTIR

A espectroscopia de infravermelho foi proposta como metodologia de identificação de microrganismos já em 1911, devido a sua capacidade de produzir dados que relacionam bandas espectrais com a composição da amostra. O processo envolve a análise do comportamento de diferentes grupamentos moleculares que, quando expostos a um feixe de radiação infravermelha em um dado comprimento de onda, promove um sinal ao equipamento que apresenta isso na forma de bandas correspondentes a cada tipo de ligação, sem destruir amostra ou causar alterações em sua composição. Tal fato permite a identificação de fungos através de uma comparação destes dados espectrais, devido às composições diferenciadas de cada fungo, as quais se manifestam no espectro. É necessário muitas vezes a compressão da amostra em pastilhas em Brometo

de Potássio (KBr) para realizar a leitura; este material é dito como “invisível” ao infravermelho e com grau adequado de reflectância. Essa etapa torna-se dispensável quando o equipamento tem acessório ATR com elemento de reflexão interna (IRE, *Internal reflection element*). IRE, por ser composto por um cristal Seleneto de Zinco (ZnSe), permite a realização da análise apenas com a sobreposição da amostra sobre o cristal (ZnSe tem mínima variação do índice de refração interna e irrelevante absorção de radiação infravermelha) (Naumann et al., 1991; Wenning et al., 2002; Naumann et al. 2005; Naumann 2009; Wenning e Scherer 2013).

1.7 Análise Multivariada

Para realizar as análises de múltiplos dados de forma confiável, as técnicas multivariadas são uma alternativa de escolha, as quais podem ser separadas em métodos supervisionados e não supervisionados. As análises sem supervisão são a primeira etapa, por serem de caráter exploratório e não requererem um conhecimento a priori do resultado esperado, e, em caso de haver conhecimento, também é válido para verificar a reprodutibilidade e a separação global dos dados analisados. Geralmente são empregadas como forma de triagem preparatória para métodos supervisionados por permitir verificar pontos “*Overfitting*” ou pontos de ajuste no trabalho com os dados. Os métodos supervisionados, em contrapartida, consiste em um conjunto de dados que possui uma região de dados escolhida e dados de classificação prévia, nos quais as análises serão feitas em relação a isso (Vicini 2005; Camilo e Silva 2009). Os métodos supervisionados geralmente empregados na área microbiológica são redes neurais artificiais (ANN; *Artificial neural networks*) e análise de mínimos quadrados parciais discriminantes (PLSR; *Partial least square regression*) como técnicas supervisionadas. Por outro lado, as técnicas não supervisionadas são: análise de componentes principais (PCA, *Principal component analysis*) e análise hierárquica de cluster (HCA, *Hierarchical cluster analysis*) (Wenning et al., 2002; Wenning e Scherer 2013).

ANN é uma técnica baseada no processo em que é atribuído um conjunto de informações a um sistema, as quais são avaliadas e atribuídas um valor que é proporcional às interconexões pré-estabelecidas entre os dados e as variáveis analisadas. Estes valores servem para compor a matriz analítica que levará a uma resposta do

sistema. A forma simples de explicar tal técnica por metáforas, geralmente, é a própria rede neural cerebral, em que, quando se analisa um dado, o cérebro faz uma série de conexões de informações prévias para compor uma dada resposta (muitas vezes até realizando tarefas que jamais fora ensinado a fazer (Vicini 2005; Camilo e Silva 2009). ANN funciona da mesma maneira, pois, à medida que se alimenta o sistema com dados e se aumenta o número de conexões e componentes matriciais, ele se torna capaz de realizar interpretações mesmo não tendo sido calibrado para isso. A calibração de uma ANN é demorada e requer conhecimento prévio para evitar erros, porém ela tem uma robustez bem maior de análise que os métodos não supervisionados. Costuma ser empregada em microbiologia de forma a evitar classificações erradas e agilizar o processo analítico para dados, pois, uma vez concluída sua calibração, ela se torna uma ferramenta confiável e de fácil uso (Udelhoven et al., 2000; Vicini 2005; Camilo e Silva 2009; Wenning e Scherer 2013).

PLSR é considerada uma das técnicas mais simples dentre as análises de mínimos quadrados parciais, sendo uma simplificação da regressão linear múltipla. Sua utilização consiste em relacionar duas matrizes de dados, sendo capaz de trabalhar com grandes quantidade de dados, ruídos, variáveis incompletas e/ou colineares. Sua robustez se eleva à medida que o número de variáveis e observações são adicionados. Diferente de redes neurais, o exemplo aqui é mais complexo: sendo a técnica de Relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR, *quantitative structure-activity relationship*) que, a partir de um componente de eixo X, tenta obter uma variação multidimensional na qual explique a variância do eixo Y nesta mesma avaliação espacial, dessa forma atribuindo, a partir de valores conhecidos de propriedades físico-químicas conhecidas, a provável alteração gerada pela adição, remoção ou modificação de um grupamento molecular (Wold et al., 2001; Wenning e Scherer 2013).

PCA Consiste em uma técnica matemática estatística de identificar padrões de dados, expressando os mesmo de tal maneira a enfatizar semelhanças e diferenças. Podendo ser representado na forma de um plano cartesiano que distribui espacialmente os dados de acordo com seu nível de correlação, desta forma setorizando os dados analisados e facilitando sua interpretação e definição de importância mediante a análise. Tal fator é possível a partir da criação de matrizes derivadas dos dados originais se

valendo de variáveis sintéticas. Estas não excluem dados e sim os resume em uma combinação dos dados originais. Sendo essa construção de novas variáveis dependentes da variância dos dados, autovalores e autovetores (Vicini 2005;Shin et al.2009; Camilo e Silva 2009; Santos et al.,2012).

HCA consiste em uma realização de associações capazes de levar a um dendrograma, no qual as amostras semelhantes são agrupadas entre si em função das variáveis de escolha. Sua interpretação básica está na distância entre as amostras, em que quanto maior a similaridade, menor as distâncias entre as mesmas. Existe uma grande quantidade de formas de realizar a aplicação desta análise e é necessário testar qual melhor se adapta ao modelo desejado; sendo a que representa de forma mais verdadeira a realidade dos dados analisados (Neto e Moita 1998;Vicini 2005; Camilo e Silva 2009, Santos et al.,2012).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente revisão realizou o levantamento de dados da bibliografia relacionada à identificação de fungos no cenário atual. Para isso, buscou-se nas bases de dados Scielo, Scopus, Science Direct, Google Acadêmico e PubMed. O período de revisão compreende-se entre ano de 1991 até 2016, sendo o critério de escolha dos materiais selecionados não apenas o assunto, como também sua representatividade para elucidação do conteúdo abordado pelo mesmo. Uma análise crítica de cada documento presente neste período de tempo seria muito dispendiosa, sendo assim realizada uma coleta amostral de documentos de acordo com título e resumo pertinentes ao trabalho, até o ponto de se explicar de forma superficial os fatores necessários para comparação de técnicas consagradas de identificação fúngica e a técnica de FTIR.

Os termos empregados na busca foram utilizados tanto em português como inglês, sendo as palavras-chave: IR, FTIR, MALDI, MALDI-TOF, PCR, Real time PCR, Nested PCR, Multiplex PCR, Agar Cromogênico, Enzimaimunoensaio, ELISA, HCA, PCA, PLSR, ANN, identificação quimiométrica de fungos, identificação de fungos de importância clínica, identificação fenotípica de fungos, identificação genotípica de fungos, vantagens e desvantagens das técnicas de identificação fúngica, identificação de espécies de *Candida*, fungos de importância clínica, análise multivariada empregada em microbiologia, métodos de cultivo para identificação fúngica, métodos não dependentes de cultivo para identificação fúngica, identificação direta de leveduras, e caracterização espectroscópica de fungos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise bioquímica por assimilação e fermentação de substâncias em conjunto com análise morfológica continua sendo empregada na rotina de identificação fúngica, devido ao seu custo baixo de implementação e consagração por tempo de uso. Ainda que tenha um tempo de execução longo e consuma um espaço significativo devido ao volume espacial do somatório de análise no caso da cultura, não deve ser utilizada para diagnose sem prévio isolamento (Moraes et al.,2010; ANVISA 2016). Contudo, com o avanço das técnicas atuais de identificação fúngica, pode-se evidenciar classificações equivocadas feitas por essas técnicas, devido a sua baixa sensibilidade em diferenciar algumas espécies fúngicas muito semelhantes fenotipicamente. Sendo sugerido o uso de técnicas complementares a sua utilização ou até mesmo técnicas mais sensíveis, evitando assim um resultado impreciso (Latouche et al.,1997; Prillinger et al., 1999; Lopandic et al., 2006; Spencer et al.,2011; Caliendo et al., 2013; Arendrup et al.,2015).

Metodologias que relatam ter a capacidade de dirimir erros de distinção entre espécies, ou ao menos ter uma sensibilidade maior que a dos métodos clássicos, não imperiosamente devem ser não cultiváveis e fenotípicas. Análises utilizando a tecnologia cromogênica em cultivo de ágar têm sido aceitas como método de isolamento e identificação de espécies de *Candidas* e alguns outros fungos com sucesso. Todavia, para alguns fungos isolados que passaram por processos de congelamento e degelo, podem vir a ter a cor apresentada no meio prejudicada, porém não é uma metodologia tida como barata ou de uso rotineiro mesmo diante de sua fácil leitura do resultado (Baumgartner et al., 1996; Cooke et al., 2002;Yucesoy e Marol, 2003; Crocco et al., 2004). Outra tecnologia que busca reduzir o tempo de diferenciação entre fungos e ampliar sua sensibilidade são os kits de ensaio bioquímicos. Apesar de sua agilidade em produzir resultados e facilidade de interpretação, eles não são uma opção recomendada em relação ao uso de meios cromogênicos, por não permitirem o uso de fungos não isolados e têm interpretação subjetiva em alguns casos, e até mesmo classificação duvidosa, principalmente, quando comparada com PCR. Estudos realizados com dois kits ID 32C e ViteK apresentaram resultados divergentes entre si e,

em alguns casos, até divergentes em relação ao PCR. Tal fator foi observado na diferenciação de espécies de *Candida* de importância clínica (Latouche et al.,1997; Turenne et al., 1999; Ahmad et al., 2002; Spencer et al., 2011). Alguns pesquisadores, entretanto, defendem que sua classificação possa ser usada como referência de identificações fenotípicas em conjunto a outra técnica, utilizando-os como referência para análises de sensibilidade de técnicas cromogênicas, fluorimétricas (Freydiere et al.,2001) e FTIR (Maquelin et al., 2003). Sua aplicabilidade em ensaios de rotina também acaba por ser dispendiosa, devido ao custo de cada kit, em função do número de análises permitida a ser executada com o mesmo, o que dificulta seu uso.

Algumas técnicas acessórias utilizadas para ampliar a confiabilidade de resultados obtidos são as imunoenzimáticas, que, apesar de, isoladamente, não trazerem resultados de identificação, podem trazer informações que auxiliem na identificação devido a uma detecção. Um exemplo disto é a união em alguns casos de ELISA à técnica de PCR ou outra com poder de identificação, a qual, após ser executada, ainda deixa dúvidas quanto à correta espécie do fungo (Yeo e Wong, 2002; Ruhnke et al., 2003; White et al., 2005; Barnes et al., 2013; Nenoff et al., 2014; Power-Fletcher e Hanson, 2016). O uso de técnicas imunológicas também tem a capacidade de avaliar a exposição prévia ou aguda de um dado fungo em um hospedeiro, sendo de suma importância em alguns casos de infecção invasiva na corrente sanguínea (Ruhnke et al., 2003; White et al.2005).

A técnica genotípica PCR e suas variáveis têm sido consideradas o padrão na confirmação de uma espécie fúngica devido a seu poder discriminatório e base de dados em constante evolução que sustenta sua (Viljoen et al.,2005; Moraes et al., 2010). Contudo, as técnicas genotípicas para alguns fungos, como espécies de *Aspergillus*, tendem a ter limitações em sua aplicabilidade, que variam em relação ao poder discriminatório, reprodutibilidade, custo, facilidade de uso e interpretabilidade (Spencer et al., 2011; Fredricks et al. 2005). Esses parâmetros, contudo, muitas vezes são esquecidos diante da necessidade, mesmo com elevado custo da técnica e alta complexidade de realização, pois sua sensibilidade elevada, em muitas variações da técnica, vem a ser muito atrativa, como na diferenciação de espécies de *Cryptococcus* (Latouche et al.,1997; Turenne et al., 1999; Leal 2006), espécies de *Candida* e outros

fungos clinicamente importantes como *Aspergillus* (Turenne et al.,1999; Freydiere et al., 2001; Lopandic et al., 2006; Arendrup et al. 2015).

Buscando uma alternativa de realizar uma análise mais rápida e com sensibilidade similar às genotípicas, surgiram as técnicas espectroscópicas, sendo a técnica resultante deste processo a MALDI-TOF. Essa técnica espectroscópica foi utilizada na diferenciação de bactérias, sendo posteriormente adaptada a leveduras fúngicas com sucesso (Bizzini e Greub, 2010; Tan et al.,2012; Wieser et al., 2012; Patel 2015; Cassagne et al.,2016). A técnica tem alta robustez e capacidade de trabalhar com amostras brutas, diferentemente de técnicas genotípicas que requerem cultivo e isolamento em sua maioria, em detrimento de seu elevado custo de aquisição que é estimado em US \$ 200.000 (Wieser et al., 2012). Ele tem a capacidade de evoluir seu software e, por meio de um sistema inteligente, personalizar-se em relação ao local de implementação (Cassagne et al.,2015).Mesmo com seu baixo custo de análise e tempo (6 minutos de análise a €2.44 de custo total), após aquisição do equipamento, fácil treinamento de uso e interpretação, ele tende a ser dispendioso demais para laboratórios pequenos (Seng et al., 2009; Cherkaoui et al., 2010). O custo de análise anual é relatado como US\$ 5.400 em relação aos US\$ 30.525 de quando são utilizadas técnicas clássicas, sendo atribuída essa redução à eliminação de prova de tubo germinativo e assimilações (Patel 2015).

Dentro das alternativas fenotípicas existe a FTIR, uma técnica desenvolvida para identificação de moléculas que detém potencial para diferenciação de microrganismos. A técnica de FTIR já foi empregada com sucesso para análise de dados para diferenciação de bactérias por comparação espectral, devido a regiões específicas de assinatura de cada microrganismo. Tal técnica gera divergência entre pesquisadores em função do uso de espectro total (Naumann et al., 1991;Grewal et al., 2015) ou regiões específicas (Udelhoven et al.,2000; Corte et al., 2010; Salman et al.,2010; San-blas et al.,2011, Santos et al. 2012) do mesmo para tal metodologia. Certos aparatos vêm a ser complementares à técnica, facilitando seu emprego e capacidade de redução de fatores intrínsecos do equipamento, como uso do acessório ATR que reduz a quase zero o número de etapas de preparo de amostra e ruído (Marques et al., 2014).

Seu baixo custo de aquisição torna a técnica empregada como método de fácil implementação na rotina, uma vez que realizada a elaboração de um protocolo padrão de análise, inicia-se a construção de uma biblioteca espectral, apontada por muitos como o ponto chave para execução da técnica em maior âmbito (Kummerle et al., 1998; Bastert et al., 1999; Udelhoven et al., 2000.; Wenning et al., 2002; Maquelin et al., 2003; Davis e Mauer, 2010; Wenning e Scherer 2013; Ergin et al., 2013; Lecellier et al., 2015; Gaydou et al., 2015). Quanto ao processamento dos dados obtidos por tal técnica, há divergências entre autores quanto utilizar somente a sobreposição espectral, somente a análise estatística dos dados ou realizar ambas as técnicas. De acordo com o conteúdo dos artigos selecionados, 65% faziam uso de algum tipo de análise multivariada, sendo 72% deles sobre fungos e 68 % se valiam de seleção de regiões espectrais para isto. Em sua maioria, o grau de sensibilidade da técnica era utilizada para diferenciação de espécies, não só fúngicas como bacterianas também (Helm et al., 1991; Naumann et al., 1991; Kummerle et al., 1998; Bastert et al., 1999; Kirschner et al., 2001; Mariey et al., 2001; Wenning et al., 2002; Sandt et al., 2002; Ngo-thi et al., 2003; Maquelin et al., 2003; Whittaker et al., 2003; Naumann et al., 2005; Erukhimovitch et al., 2005; Fischer et al., 2006; Naumann 2008; Corte et al., 2010; Davis e Mauer 2010; Salman et al., 2010; Santos et al., 2010; Shapaval et al., 2010; San-Blas et al., 2011; Santos et al., 2012; Ergin et al., 2013; Erukhimovitch et al., 2013; Shapaval et al., 2013; Wenning e Scherer 2013; Marques et al., 2014; Lecellier et al., 2014; Pomerantz et al., 2014; Gaydou et al., 2015; Grewal et al., 2015; Lecellier et al., 2015; Zimmermann et al., 2015; Costa et al., 2016; Grangeteau et al., 2016).

4 CONCLUSÃO

Esta revisão avaliou que técnicas de fermentação e assimilação conjuntas a análises microscópicas e macroscópicas tem uma faixa de erro grande, sendo necessário uso destas junto a técnicas mais sensíveis atualmente. As técnicas imunológicas com poder de detecção se mostraram capazes de complementar parcialmente as técnicas anteriores para uma triagem ou esclarecimento de dúvida, mas não são capazes de, isoladamente, oferecer um resultado confiável. Os métodos de cultivo em meio

cromogênico tem capacidade de auxiliar neste resultado e até atribuir resultados corretos para amostras frescas em alguns casos. No entanto, microrganismos isolados que passaram por congelamento demonstraram um problema visível de identificação por tal método devido a modificações metabólicas. Os kits de testes bioquímicos são outra opção para confirmação destes resultados, contudo apresentaram falhas de identificação e acabam por ter de ser usados com certas ressalvas e cuidados.

Técnicas genotípicas de sequenciamento ainda são amplamente empregadas como teste confirmatório de um microrganismo. Em espécies fúngicas, a amplificação de regiões específicas do DNA fúngico tende a ser a forma padrão de identificação por serem sensíveis e reprodutíveis. Em contrapartida, técnicas fenotípicas como MALDI-TOF tem se mostrado capaz de diferenciar níveis considerados próximos a genotipagem. Contudo ambas as técnicas, PCR e MALDI-TOF, são muito onerosas para serem amplamente empregadas na rotina, tanto a nível de pesquisa quanto a nível clínico. Na busca de uma metodologia mais simples e barata, tais vantagens se apresentaram no equipamento de FTIR-ATR por apresentar baixo processamento de amostra, análise rápida e sensibilidade elevada quando associada ao processamento de dados estatísticos por análise multivariada.

A técnica de FTIR-ATR apresentou algumas limitações superáveis, como falta de uma metodologia de execução validada; bem como biblioteca espectral disponível para comparação de dados. Sendo então levantadas como perspectivas futuras a este trabalho, a elaboração de um protocolo confiável e reprodutível para análises feitas com FTIR-ATR, assim como a utilização de métodos consagrados para calibração de métodos supervisionados a partir de métodos não supervisionados. Isto sendo realizado com intuito de criar uma biblioteca espectral que facilite a empregabilidade na rotina da técnica de FTIR-ATR. O uso das técnicas de análise multivariada, empregadas pela maioria dos autores, levam a resultados mais precisos ao converter uma grande quantidade de variáveis em dados mais fáceis de visualizar e trabalhar como o exemplo do uso da análise por PCA e HCA. Desta forma, conclui-se que as técnicas estatísticas são fundamentais para o trabalho adequado dos dados da técnica. A possibilidade de unir dados de outras técnicas a torna interessante para perspectivas futuras como a construção de uma super matriz que engloba mais de uma metodologia de identificação, a fim de aumentar a confiabilidade do resultado e reduzir custo de análise.

Ressalta-se que o objetivo de tal técnica não é substituir as demais, sendo abordada como técnica complementar às já existentes, porém não sendo como ensaios imunológicos que apresentam poder a nível de detecção e sim com capacidade de identificação. É levantado que o futuro da técnica de identificação de microrganismos deve se valer de mais de uma técnica de identificação para haver confiabilidade de resultados e ainda reduzir as chances de erros inerentes de técnicas isoladas, assim como da identificação de substâncias puras.

REFERÊNCIAS

1. Abdel-Sater MA, Moubasher AH, Soliman Z, (2016) Identification of three yeast species using the conventional and internal transcribed spacer region sequencing methods as first or second global record from human superficial infections. *Mycoses: Dianosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*59: 652-661.
2. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU, (2002)Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: Comparison with Culture, Antigen Detection, and Biochemical Methods for Species Identification. *Journal Of Clinical Microbiology*40: 2483-2489.
3. Alexander BD, Pfaller MA, (2006) Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses.*Clinical Infectious Diseases*43: 15–27.
4. Agência de vigilância sanitária.2004. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Disponível em:http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/microbiologia/mod_7_2004.pdf: Acessado em 26 setembro 2016.
5. Arendrup MK, Posteraro B, Sanguinetti M, Guinea J,(2015) The State-of-the-Art Mycology Laboratory: Visions of the Future. *Currente management of fungal infections*9: 37-51.
6. Baker TC, Han J, Borchers CH, (2017) Recent advancements in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Current opinion in biotechnology*43: 62-69.
7. Barnes RA, Stoking K, Browden S, Poynton MH, White PL, (2013) Prevention and diagnosis of invasive fungal disease in high-risk patients within an integrative care pathway. *Jounal of infection*67: 206-214.
8. Bastert J, Korting HC, Traenkle P, Schmalreck AF, (1999) Identification of dermatophytes by Fourier transforminfrared spectroscopy (FT-IR). *Mycoses*42: 525-528.

9. Baumgartner C, Freydiere A, Gille Y, (1996) Direct Identification and Recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida Plates. *Journal of clinical microbiology*34: 454-456.
10. Bernard M, Latgé JP, (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and Biosynthesis. *Medical Mycology*39: 9-17.
11. Bizzini A, Greub G, (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Journal microbiology and infection*16:1614-1619.
12. Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, Hanson KE, May L, Quinn TC, Tenover FC, Alland D, Blaschke AJ, Bonomo RA, Carroll KC, Ferraro MJ, Hirschhorn LR, Joseph WP, Karchmer T, Macintyre AT, Reller LB, Jackson AF, (2013) Better test, better care: Improved diagnostic for infectious diseases. *Clinical Infectious diseases*57: 139-170.
13. Camilo C A, Silva JC, (2009) Mineração de dados: conceitos, tarefas, métodos e ferramentas. Relatório técnico, Instituto de Informática da Universidade federal de Goiás, 29p.
14. Cassagne C, Normand A, Ollivier C, Ranque S, Piarroux R, (2016) Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses diagnosis, therapy and prophylaxis of fungal diseases*59: 678-690.
15. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girad M, Francois P, Scherenzel J, (2010) Comparison two matrix-assted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with convencional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *Journal of clinical microbiology*48: 1169-1175.
16. Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC, (2002) New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida* spp. *Applied and environmental microbiology*68: 3622-3627.
17. Corte L, Rellini P, Roscini L, Fatichenti F, Cardinali G, (2010) Development of a novel, FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) based, yeast bioassay for toxicity testing and stress response study. *Analytica Chimica Acta*659: 258-265.

18. Costa FSL, Silva PP, Morais CLM, Arantes TD, Milan EP, Theodoro RC, Lima KMG, (2016) Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy as a new technology for discrimination between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Analytical Methods*8: 7107-7115.
19. Crocco EI, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, Zaitz C, (2004) Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais Identification of *Candida* species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with superficial candidiasis. *Anais brasileiros de dermatologia*79: 689-697.
20. Crowther JR, (2002) *The ELISA Guidebook*. Humana Press, Totowa, New jersey.
21. Davis R, Mauer LJ, (2010) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*2: 1582-1594.
22. Ellepola ANB, Hurst SF, Elie CM, Morrison CJ, (2003) Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral microbiology immunology*18: 379-388.
23. Ergin Ç., Ikjit M, Gok Y, Ozel MF, Çon AG, Kabay N, Soyleyci S, Dogen A, (2013) Fourier transform infrared spectral evaluation for the differentiation of clinically relevant *Trichophyton* species. *Journal of microbiological methods*93: 218-223.
24. Erukhimovitch V, Pavlov V, Talyshinsky M, Souprun Y, Huleihel M, (2005) FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*37: 1105–1108.
25. Erukhimovitch V, Huleihil M, Huleihel M, (2013) Identification of Contaminated Cells with Viruses, Bacteria, or Fungi by Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. *Journal of Spectroscopy*2013: 1-6.

26. Fischer G, Braum S, Thissen R, Dott W, (2006) FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of microbiological methods*64: 63-77.
27. Fredricks DN, Smith C, Meier A, (2005) Comparison of six DNA extraction Methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology*43: 5122-5128.
28. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P, (2001) Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Medical mycology*39: 9-33.
29. Gaydou V, Lecellier A, Toubas D, Mounier J, Castrec L, Barbier G, Ablain W, Manfait M, Sockalingum GD, (2015) Assessing the discrimination potential of linear and non-linear supervised chemometric methods on a filamentous fungi FTIR spectral database. *Analytical Methods*7:766-778.
30. Grangeteau C, Gerhard D, Terrat S, Dequiedt S, Alexandre H, Guilloux-Benatier M, Wallbrunn CV, Rousseaux S, (2016) FT-IR spectroscopy: A powerful tool for studying the inter-and intraspecific biodiversity of cultivable non-saccharomyces yeasts isolated from grape must. *Journal of microbiological methods*121: 50-58.
31. Grewal MK, Jaiswal P, Jha SN, (2015) Detection of poultry meat specific bacteria using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Journal Food of science Technology*52: 3859-3869.
32. Helm D, Labischinski H, Naumann D, Schallehn G, (1991) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology*137: 69-79.
33. Kirschner C, Maquelin K, Pina P, Ngo-Thi NA, Choo-Smith LP, Sockalingum GD, Sandt C, Ami D, Orsini F, Doglia SM, Allouch P, Mainfait M, Puppels GJ, Naumann D, (2001) Classification and Identification of Enterococci: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. *Journal of clinical microbiology*39: 1763-1770.
34. Kummerle M, Scherer S, Seiler H, (1998) Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental microbiology*64: 2207-2214.

35. Larone DH, (1987) Medically important fungi. A guide to identification. 2 ed. Maryland, Harper.
36. Latouche GN, Daniel HM, Lee OC, Mitchell TG, Sorrell TC, Meyer W, (1997) comparison of use phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. *Journal of clinical microbiology*35: 3171-3180.
37. Leal LA, (2006). Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica. Dissertação de mestrado, Programa de pós graduação em biologia celular e molecular da universidade federal do rio grande do sul. Porto alegre,RS, Brazil. p.100.
38. Lecellier A, Mounier J, Gaydou V, Castrec L, Barbier G, Ablain W, Manfait M, Toubas D, Sockalingum GD, (2014) Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *International Journal of food microbiology*168-169: 32-41.
39. Lopandic K, Zelger S, Banzsky LK, Eliskases-Lechner F, Prllinger H, (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques.*Food Microbiology*23: 341-350.
40. Maquelin K, Kirschener C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, Vreeswijk TV, Stammler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Pippels GJ, (2003) Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of clinical microbiology*41: 324-329.
41. Mariey L, Signolle JP, Amiel C, Travert J, (2001) Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational spectroscopy*26: 151-159.
42. Marques AS, Melo MCN, Cidral TA, Lima KMG, (2014) Feature selection strategies for identification of *Staphylococcus aureus* recovered in blood cultures using FT-IR spectroscopy successive projections algorithm for variable selection: A case study. *Journal of microbiologic methods*98: 26-30.

43. McGinnis MR, (1980)-Laboratory Handbook of Medical Mycology. Academic press, New York, EUA.
44. Mehling A, Wehmeier UF, Piepersberg W, (1995) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. FEMS microbiology letters128: 119-125.
45. Moraes, A.M.L.; Paes, R. A.; Holanda, V.L.(2010);Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde vol.4, p.399-496.
46. Naumann D, helm D, Labischinski H, (1991) Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature351: 81-82.
47. Naumann A, Navarro-Gonzalez M, Peddireddi S, Kues U, Polle A, (2005) Fourier transform infrared microscopy and imaging: Detection of fungi in wood. Fungal genetics and biology42: 829-835.
48. Naumann A, (2009) A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. Analyst134: 1215-1223.
49. Nenoff P, Kruger C, Schaller J, Ginter-Hanselemayer G, Schulte-Beerbuhl R, Tietz H, (2014) Mycology-an update part 2: Dermatomyces: Clinical picture and diagnostics. Journal of the german society of dermatology12: 749-777.
50. Neto JMM, Moita CG, (1998) Uma introdução á análise exploratória de dados multivariados. Quimica Nova21: 467-469.
51. Ngo-thi NA, Kirschner C, Naumann D, (2003) Characterization and identification of microorganisms by FT-IR Microspectrometry. Journal of molecular structure661-662: 371-380.
52. Oliveira TMS, (2010) PCR em tempo real: Métodos e aplicações. Aveiro,Brasil, 111p. (M.Sc. Dissertation.Universidade de aveiro, departamento de biologia).
53. Patel R, (2015) MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clinical Chemistry61: 100-111.
54. Perfect JR, (2013) Fungal diagnosis: How do we do it and can we do better?. Current medical research & opinion29: 3-11.
55. Phoompoung P, Chayakulkeeree M, (2016) Recent progress in the diagnosis of pathogenic candida species in blood culture. Mycopathologia181: 363-369.

56. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D, (1998) Simple, inexpensive reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of clinical microbiology*36: 2093-2095.
57. Pomerantz A, Cohen Y, Shufan E, Ben-Naim Y, Mordechai S, Salman A, Huleihel M,(2014) Characterization of *Phytophthora infestans* resistance to mefenoxam using FTIR spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*141: 206-314.
58. Powers-Fletcher MV, Hanson KE, (2016) Nonculture Diagnostics in Fungal Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*30: 37–49.
59. Prillinger H, Molnár O, Eliskases-Lechner F, Lopándic K, (1999) Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek*75: 267-283.
60. Resende JCP, Franco GR, Rosa CA, Hahn RCm Hamdan JS, (2004) Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. isolated from hospitalized patients. *Rev. Iberoam Micol*21: 24-28.
61. Ruhnke M, Bohme A, Buchheidt D, Donhuijsn K, Einsele H, Enzensber R, Glasmacher A, Gumble H, Heussel CP, Karthaus M, Lambrecht E, Sudhoff T, Szelényi H, (2003) Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology. *Annals of Hematology*82: 141–148.
62. Salman A, Tsrer L, Pomerantz A, Moreh R, Mordechai S, Huleihel M, (2010) FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogens. *Spectroscopy*24: 261-267.
63. San-Blas E, Guerra M, Portillo E, Esteves I, Cubillán N, Alvarado Y, (2011) ATR/FTIR characterization of *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis indica*. *Vibrational Spectroscopy*57: 220-228.
64. Sandt CL, Sockaligum GD, Toubas D, Aubert D, Lapan H, Lepouse C, Jaussaud M, Leon A, Pinon JM, Manfait M, (2002) Comparing FTIR and RAPD Techniques in the Typing of *C. albicans* in a Clinical Set-Up. *Biomedical vibrational spectroscopy II*4614: 1-11.
65. Santos C, Fraga ME, Kozakiewicz Z, Lima N, (2010) Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*161: 168-175.

66. Santos PM, Cardoso MAG, Khouri S, Paula Júnior AR, Uehara M, Sakane KK , (2012) Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. *Braz. J. Biom. Eng*28: 398-409
67. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D, (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical infectious diseases*49: 543-551.
68. Shapaval V, Schmitt J, Moretro T, Suso HP, Skaar I, Asli AW, Lillehaug D, Kohler A, (2013) Characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy. *Journal of applied microbiology*114: 788-796.
69. Shapaval V, Moretro T, Suso HP, Asli AW, Schmitt J, Lillehaug D, Martens H, Bocker U, Kohler A, (2010) A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. *Journal of BIOPHOTONICS*3: 512-521.
70. Shin E, Craft BD, Pegg RB, Phillips DR, Eitenmiller RR,(2009) Chemometric approach to fatty acid profiles in runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). *Food Chemistry*119: 1262-1270.
71. Smith-Moritz AM, Chern M, Lao J, Sze-To WH, Heazlewood JL, Ronald PC, Vega-Sanchez M, (2011) Combining multivariate analysis and monosaccharide composition modeling to identify plant cell wall variations by Fourier Transform Near Infrared spectroscopy. *Plant methods*7: 1-13.
72. Spencer J, Rawling S, Stratford M, Steels H, Novodvorska M, Archer DB, Chandra S, (2011) Yeast identification: reassessment of assimilation tests as sole universal identifiers. *Letters in applied Microbiology*53: 503-508.
73. Sullivan D, Coleman D, (1998) *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *Journal of clinical microbiology*36: 329-334.
74. Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC, (2012) Prospective Evaluation of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System in a Hospital Clinical Microbiology Laboratory for Identification of Bacteria and Yeasts: a Bench-by-Bench Study

- for Assessing the Impact on Time to Identification and Cost-Effectiveness. *journal of clinical microbiology*50: 3301-3308.
75. Terrence C, Dolan MD, (1971) A practical approach to identification of Yeast-like organisms, *American Journal of Clinical Pathology*55:580-590.
 76. Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM, (1999) Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and automated fluorescent capillary electrophoresis system. *journal of clinical microbiology*37: 1846-1851.
 77. Udelhoven T, Naumann E, Schmitt J, (2000) Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. *Applied spectroscopy*54: 1471-1479.
 78. Vicini L, (2009); Análise multivariada da teoria à prática. Monografia de especialização-Universidade Federal de Santa maria. Santa Maria, RS, Brasil, 215 p.
 79. Viljoen G.J, Nel LH, Crowther JR, (2005); *Molecular Diagnostic PCR handbook*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
 80. Wenning M, Seiler H, Scherer S, (2002) Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*68: 4717–4721.
 81. Zimmermann B, Tkalec Z, Mesic A, Kohler A, (2015) Characterizing Aeroallergens by infrared spectroscopy of fungal spores and pollen. *PloS One*10: 1-22.
 82. Wenning M, Scherer S, (2013) Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Applied Microbiology and Biotechnology*16: 7111-7120.
 83. White PL, Archer AE, Barnes RA, (2005) Comparison of Non-Culture-Based Methods for Detection of Systemic Fungal Infections, with an Emphasis on Invasive Candida Infections *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*43: 2181–2187.
 84. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S, (2012) MALDI-TOD MS in microbiological diagnostics- identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied microbiology and biotechnology*93: 965-974.

85. Whittaker P, Mossoba MM, Al-Khaldi S, Fry FS, Dunkel VC, Tall BD, Yurawecz MP, (2003) Identification of foodborne bacteria by infrared spectroscopy using cellular fatty acid methyl esters. *Journal of microbiological methods*55 :709-716.
86. Wold S, Sjostrom M, Eriksson L, (2001) PLS-regression: a basic toll of chemometrics. *Chemometrics and intelligent labotatory sistems*58: 109-130.
87. Yeo SF, Wong B, (2022)Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections.*Clinical Microbiology Reviews*15: 465-484.
88. Yucesoy M, Marol S, (2003) Performance of CHROMAGAR candida and BIGGY agar for identification of yeast species. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*2: 1-7.

ANEXO 1 – “Instruções aos Autores” de Brazilian Journal of Microbiology

Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Título resumido
- Resumo (200 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts:
<http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors:
julian.gross@pharm.ox.ac.uk
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar

adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *BIOSIS*. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

1. **Artigos de Periódicos**

2. Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in

premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol*37:101-107.

3. **Artigos ou Capítulos de Livro**

4. Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.*

5. **Livros**

6. Montville TJ, Matthews KR (2005) *Food Microbiology - an introduction.* ASM Press, Washington, D.C.

7. **Patentes**

8. Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

9. **Teses e Dissertações**

10. Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

11. **Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**

12. Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

13. **Publicações na Web**

14. Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

15. **Webpage**

16. U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)