

DESEMPENHO DE MÉTODOS CONVENCIONAIS E AUTOMATIZADOS (MALDI-TOF MS E VITEK-2) NA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

PERFORMANCE OF CONVENTIONAL AND AUTOMATED METHODS (MALDI-TOF MS AND VITEK-2) IN YEAST IDENTIFICATION

Janaina Fontes **Ribeiro**¹, Vitor Hugo Jardim **Pereira**², Disley Xavier Rodrigues **Dias**³, Ailton José **Soares**⁴, Andrea Cândida dos Santos **Furtado**⁵, Edna Joana Cláudio **Manrique**⁶.

1. Biomédica, Residente do Programa de Residência Multiprofissional, área de concentração em Infectologia no Hospital Estadual de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad/Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (HDT/ LACEN/SES-GO), Goiânia-Goiás-Brasil. Contato: janainafontesribeiro@gmail.com
2. Biomédico, Residente do Programa de Residência Multiprofissional, área de concentração em Infectologia no Hospital Estadual de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad/Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (HDT/ LACEN/SES-GO), Goiânia-Goiás-Brasil
3. Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Paulista (2011). Especialização em Auditoria e Regulação em Serviços de Saúde pela Faculdade Delta. Coordenadora da seção de Micologia do Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN/SES-GO), Goiânia-Goiás-Brasil
4. Farmacêutico com habilitação em Bioquímica (Análises Clínicas), pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e especialização em Microbiologia (Micologia) pela Universidade Federal de Goiás (UFG)- Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN/SES-GO), Goiânia-Goiás-Brasil
5. Bióloga, pela Universidade Salgado de Oliveira. Assistente de saúde II da seção de Micologia do Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN/SES-GO), Goiânia-Goiás-Brasil
6. Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Goiás. Tutora no Programa de Residência Multiprofissional em Infectologia HDT/LACEN/SES-GO. Professora na Pontifícia Universidade Católica de Goiás (UCG). Coordenadora da Seção de Ensino e Pesquisa do Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN/SES-GO), Goiânia-Goiás-Brasil.

RESUMO

Introdução: *Candida* e *Cryptococcus* são agentes etiológicos frequentes de infecções fúngicas sistêmicas, cuja identificação precisa das espécies é fundamental para o diagnóstico e para a adequada terapia antifúngica. Métodos micológicos convencionais, baseados em provas bioquímicas e morfológicas manuais, podem apresentar tempo de resposta prolongados, o que tem impulsionado a adoção de técnicas automatizadas, como o VITEK® 2 Compact e o MALDI-TOF MS, que possibilitam uma identificação rápida e confiável, otimizando o manejo clínico. **Objetivo:** Avaliar a acurácia de metodologias automatizadas, MALDI-TOF e VITEK-2, e de testes bioquímicos na identificação fúngica de leveduras. **Metodologia:** Estudo analítico transversal quantitativo, com dados de janeiro de 2023 a janeiro de 2024, avaliou a concordância das metodologias automatizadas e as provas bioquímicas convencionais manuais em amostras positivas para crescimento leveduriforme, através do programa Microsoft Office Excel 2013®. **Resultados:** Foram isolados dois gêneros e 11 espécies, totalizando 126 leveduras identificadas pelas três metodologias. Desses, 63 pertenciam ao gênero *Candida* e 63 ao gênero *Cryptococcus*. Todas as amostras foram identificadas em nível de gênero, e 89,68% foram identificadas em nível de espécie pelas técnicas manuais. Pelo sistema VITEK® 2, 96,82% das amostras foram identificadas em nível de gênero e 88,88% em nível de espécie. O MALDI-TOF MS, por sua vez, apresentou desempenho superior, com 100% de identificação em nível de espécie. **Conclusão:** As técnicas bioquímicas convencionais e o VITEK-2 apresentam limitações significativas na identificação dos fungos em questão, ao contrário do MALDI-TOF MS, que mostrou melhor desempenho.

PALAVRAS-CHAVE: Leveduras; *Candida*; *Cryptococcus*; Diagnóstico laboratorial.

ABSTRACT

Introduction: *Candida* and *Cryptococcus* are frequent etiological agents of systemic fungal infections, and accurate species identification is fundamental for diagnosis and appropriate antifungal therapy. Conventional mycological methods, based on manual biochemical and morphological tests, can have prolonged response times, which has driven the adoption of automated techniques, such as VITEK® 2 Compact and MALDI-TOF MS, that allow for rapid and reliable identification, optimizing clinical management. **Objective:** To evaluate the accuracy of automated methodologies, MALDI-TOF and VITEK-2, and biochemical tests in the fungal identification of yeasts. **Methodology:** A quantitative cross-sectional analytical study, with data from January 2023 to January 2024, evaluated the agreement between automated methodologies and conventional manual biochemical tests in samples positive for yeast growth, using Microsoft Office Excel 2013®. **Results:** Two genera and 11 species were isolated, totaling 126

yeasts identified by the three methodologies. Of these, 63 belonged to the genus *Candida* and 63 to the genus *Cryptococcus*. All samples were identified to the genus level, and 89.68% were identified to the species level using manual techniques. Using the VITEK® 2 system, 96.82% of the samples were identified to the genus level and 88.88% to the species level. MALDI-TOF MS, in turn, showed superior performance, with 100% identification at the species level. **Conclusion:** Conventional biochemical techniques and VITEK-2 have significant limitations in identifying the fungi in question, unlike MALDI-TOF MS, which showed better performance.

KEYWORDS: Yeast; *Candida*; *Cryptococcus*; Laboratory Diagnosis.

INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas sistêmicas e oportunistas emergiram como um significativo desafio clínico nas últimas décadas, com aumento exponencial de casos e de taxas de morbimortalidade em ascensão, e consequente impacto socioeconômico¹.

O aumento da prevalência de doenças crônicas, do uso crescente de terapias imunossupressoras e da disseminação de microrganismos resistentes a antifúngicos foi um fator que contribuiu para essa mudança de paradigma. Em particular, a população imunocomprometida, incluindo pacientes oncológicos, transplantados e portadores do HIV, que, consequentemente, apresentam maior susceptibilidade a infecções, pode evoluir para quadros graves e com alta mortalidade, atribuíveis a infecções fúngicas invasivas¹⁻³.

Essa nova realidade impulsionou uma intensificação da vigilância epidemiológica e laboratorial sobre as micoses, reproduzida na primeira Lista de Patógenos Prioritários Fúngicos (FPPL), em outubro de 2022 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os patógenos incluídos foram classificados e categorizados em três grupos de prioridade (crítico, alto e médio), que focam em 19 agentes fúngicos que podem causar infecções fúngicas sistêmicas agudas e subagudas invasivas, para as quais existe resistência a medicamentos ou outros desafios de tratamento e gerenciamento, além de alto risco de mortalidade⁴⁻⁸.

A cultura fúngica, embora seja a mais utilizada em laboratórios de rotina para o diagnóstico de micoses, apresenta limitações significativas, tais como baixa sensibilidade, tempo de resposta prolongado e exigências técnicas laboratoriais específicas^{9,10}. A heterogeneidade fenotípica e genotípica dos fungos patogênicos, aliada à baixa carga fúngica em algumas infecções, contribui para a dificuldade de detecção por métodos convencionais. Além disso, a presença de microbiota contaminante pode comprometer a pureza das culturas e dificultar a identificação do agente etiológico¹¹.

Além disso, o diagnóstico micológico é de grande variabilidade de prazos para a identificação, devido à natureza de crescimento de seus agentes e das outras técnicas empregadas, como pesquisa de antígenos e anticorpos, que envolvem imunodiagnósticos como fixação de complemento e imunodifusão a imunoensaios enzimáticos, exames anatomopatológicos e dispositivos de fluxo lateral¹².

Nesse contexto, as tecnologias automatizadas e moleculares, como o VITEK-2, MALDI-TOF MS e reação em cadeia da polimerase (PCR), revolucionaram o diagnóstico micológico, proporcionando resultados mais rápidos e precisos¹³⁻¹⁵. No entanto, a implementação dessas novas tecnologias em rotina diagnóstica ainda enfrenta desafios, como a padronização dos protocolos, a interpretação dos resultados e a necessidade de profissionais altamente qualificados. Adicionalmente, o alto custo dos equipamentos e reagentes podem limitar a acessibilidade desses testes em muitos laboratórios, além da adaptação e da resistência à mudança de técnicas que permanecem substancialmente há muitos anos^{14,16,17}.

Contudo, a fim de auxiliar na redução do tempo na identificação do microrganismo e na conclusão do diagnóstico, as metodologias automatizadas de identificação mais rápida têm ganhado espaço no mercado laboratorial brasileiro na última década. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a concordância entre as metodologias automatizadas MALDI-TOF MS e VITEK® 2 e as provas bioquímicas convencionais manuais na identificação de leveduras no diagnóstico micológico, bem como verificar a distribuição em frequência relativa e absoluta dos resultados obtidos.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal, realizado com dados obtidos no período de janeiro de 2023 a janeiro de 2024, a partir dos registros de solicitações de exames e dos respectivos resultados de culturas de fungos, arquivados na seção de Micologia de um serviço de vigilância laboratorial estadual.

Foram incluídos no estudo todos os resultados positivos para leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* dos isolados fúngicos, identificados por metodologias bioquímicas convencionais manuais e pelos sistemas automatizados VITEK-2 e MALDI-TOF, durante o período avaliado, e foram excluídos do estudo todos aqueles cujos resultados de identificação fossem fungos filamentosos, que não foram identificados via automação por VITEK-2 e MALDI-TOF, ou que apresentassem resultados inconclusivos.

Como cenário do estudo, a identificação das leveduras clinicamente relevantes iniciou-se pela avaliação macroscópica das colônias, com crescimento entre 36 e 72 horas, utilizando ágar *Sabouraud dextrose* (com e sem cloranfenicol) e ágar *Mycosel*. Posteriormente, provas bioquímicas e morfológicas complementares foram realizadas conforme a suspeita. Para *Candida* spp., empregaram-se *CHROMagar*®, prova do tubo germinativo, formação de clamidósporos em ágar *Corn Meal* e crescimento em caldo *Sabouraud* hipertônico modificado para diferenciação de *C. dubliniensis*. Para *Cryptococcus* spp., utilizaram-se ágar niger para avaliação da produção de melanina, ágar CGB para diferenciação entre *C. gattii* e *C. neoformans* e a prova da urease como identificação presuntiva¹⁸⁻²⁴.

Em complemento aos métodos convencionais, o VITEK® 2 (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO) é um sistema semiautomatizado de identificação microbiológica que utiliza o cartão VITEK ID-YST para a identificação de leveduras clinicamente relevantes e de organismos semelhantes. O sistema baseia-se na leitura de 47 testes bioquímicos fluorescentes, incluindo provas de assimilação de carboidratos, com análise automatizada após incubação de aproximadamente 15 horas. Os perfis obtidos são comparados a um banco de dados contendo mais de 50 espécies de leveduras, resultando na identificação do microrganismo, associada a um nível de confiança expresso em porcentagem^{22,25}.

O VITEK® MS, baseado na técnica de espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), também atua de forma complementar e fundamenta-se na análise de perfis proteicos para a identificação microbiana. A técnica consiste na ionização das proteínas da amostra por laser, seguida da separação dos íons de acordo com a razão massa/carga e o tempo de voo. O espectro gerado é comparado ao banco de dados do equipamento, permitindo a identificação rápida e precisa do microrganismo, igualmente acompanhada de um índice de confiança percentual^{22,26-28}.

Os resultados das distintas metodologias foram comparados e enquadrados em três quesitos, dentre discordâncias e concordâncias, e padrões de identificação. Classificados em discordantes maiores aqueles cujos os resultados fossem discordantes em nível de gênero ou quando o método não ofertou resultado definitivo ou nenhuma identificação; em discordantes menores, quando os resultados fossem discordantes apenas no nível de espécie, e concordantes, quando os resultados entre as metodologias fossem da mesma identificação no nível de gênero e espécie.

Os resultados de cada isolado foram distribuídos e tabulados no programa *Microsoft® Office Excel* 2013, em sequência: MALDI-TOF MS, VITEK 2 e provas bioquímicas manuais, com seus respectivos valores de nível de confiança, para as metodologias automatizadas, e os detalhes observados no diagnóstico das provas manuais. Em seguida, fez-se a construção de tabelas com a média do percentual de nível de confiança, com frequências absolutas e percentuais e com distribuições de discordâncias e padrões de identificação (**Tabela 1**).

Durante o período analisado, um total de 126 agentes leveduriformes, 63 *Candida* spp. e 63 *Cryptococcus* spp., foram identificados por provas bioquímicas e morfológicas manuais, juntamente com as duas técnicas automatizadas (VITEK-2 e MALDI- TOF MS).

O estudo foi conduzido em consonância com a Resolução 466/2012 e normas complementares do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que tratam sobre as recomendações éticas e legais com pesquisas envolvendo seres humanos. Para atender tais normas, esse trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad (CEP- HAA), sob o número do parecer 7.014.186 e CAAE: 81191824.9.0000.0034.

Tabela 1. Distribuição por média dos resultados conforme o nível de confiança emitido por equipamento de acordo com a espécie identificada.

ESPÉCIES	n	VITEK-2 (%)	MALDI TOF MS (%)
<i>Candida albicans</i>	23	96,15%	99,90%
<i>Candida orthopsilosis</i>	4	17,00%	99,90%
<i>Candida parapsilosis</i>	11	95,00%	99,90%
<i>Candida dubliniensis</i>	2	92,95 %	99,90%
<i>Nakaseomyces glabratus</i>	6	83,00%	99,90%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	4	62,00%	99,90%
<i>Clavispora lusitaniae</i>	3	97,00%	99,90%
<i>Candida tropicalis</i>	8	86,00 %	99,90%
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2	97,00%	99,90%
<i>Cryptococcus gattii</i>	5	94,00%	99,90%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	58	92,71%	99,90%
Total	126	81,54%	99,90%

Fonte: Autoria própria.

RESULTADOS

Foram isoladas dois gêneros e 11 espécies, as mais destacadas foram *Cryptococcus neoformans* (58), *C. albicans* (23), *Candida parapsilosis* (11) e *Candida tropicalis* (8) (**Tabela 2**).

Um total de 126/126 (100 %) foram identificados em nível de gênero e 113/126 (89,68%) em nível de espécie, por técnicas manuais. Quatro isolados de *Candida orthopsilosis*, três de *Clavispora lusitaniae* (sin. *Candida lusitaniae*) e duas de *Kluyveromyces marxianus* (sin. *Candida kefyr*) não foram identificados completamente por métodos bioquímicos; dois isolados eram compatíveis fenotipicamente com *C. albicans* na maioria dos testes convencionais, entretanto, com o auxílio de caldo Sabouraud hipertônico modificado e vias automatizadas foram identificadas como *Candida dubliniensis*; e mais duas do gênero *Cryptococcus* spp. apresentaram divergência nas provas técnicas manuais (**Tabela 2**).

Por VITEK-2, foram identificados 122/126 (96,82%) em nível de gênero, quatro amostras não obtiveram identificação de gênero; e 112/126 (88,88%) foram identificados até o nível de espécie, enquanto dez isolados produziram resultados de baixa discriminação (<50%), que exigiram observação suplementar e repetição de testes para a identificação de uma espécie, foram eles: três das espécies *Pichia kudriavzevii* (sin. *Candida krusei*), duas *Kluyveromyces marxianus* (sin. *C. kefyr*), duas *C. orthopsilosis* e três *Cryptococcus neoformans*. Quando comparados com a identificação por MALDI-TOF MS, as 126/126 cepas (100%) foram identificadas em nível de gênero e espécie (**Tabela 2**).

Um total de quatro (3,17%) de discordâncias maiores foram observados pelo VITEK 2, enquanto as metodologias convencionais e MALDI- TOF MS não reproduziram nenhuma discordância nessa caracterização. Em discordâncias menores, 10 (7,93%) e 13 (10,31%) foram vistos, respectivamente pelo VITEK-2 e metodologias convencionais, e novamente

o MALDI-TOF apresentou melhor reprodução de resultados quando comparados com as outras metodologias em estudo (**Tabela 2**).

Na classificação de concordantes, a identificação de *C. albicans*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus gattii* foram compatíveis em todas as metodologias aplicadas. As espécies *Nakaseomyces glabratus* (sin. *C. glabrata*), *Pichia kudriavzevii* (sin. *C. krusei*) e *C. tropicalis* foram concordantes em duas metodologias, métodos convencionais bioquímicos e morfológicos manuais e MALDI-TOF MS. As espécies *C. dubliniensis* e *C. lusitaniae* foram concordantes apenas em metodologias automatizadas (**Tabela 2**).

No nível de espécie, as taxas de discordância de identificação dos dois métodos automatizados foram 0,1% e 11,12% para MALDI-TOF MS e VITEK 2, respectivamente. Em nível de confiança, a distribuição média apresentou uma maior porcentagem confiante para a metodologia MALDI-TOF MS, em comparação com os resultados do VITEK -2 (**Tabela 2**).

Tabela 2. Distribuição dos resultados inigualáveis por MALDI-TOF MS, VITEK 2 e provas bioquímicas

Espécies	n	%	VITEK-2			MALDI-TOF			Provas Bioquímicas		
			Discorda ntes maiores	Discorda ntes menores	Concord antes	Discorda ntes maiores	Discorda ntes menores	Concord antes	Discorda ntes maiores	Discordan tes menores	Concordantes
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Candida albicans</i>	23	18,2 5			23 (18,25)			23 (18,25)			23 (18,25)
<i>Candida orthopsilosis</i>	4	3,17	2 (1,60)	2 (1,60)				4 (3,17)		4 (3,17)	
<i>Candida parapsilosis</i>	11	8,73			11(8,73)			11(8,73)			11(8,73)
<i>Candida dubliniensis</i>	2	1,60			2 (1,60)			2 (1,60)		2 (1,60)	
<i>Nakaseomyces glabratus</i>	6	4,77	1 (0,80)		5 (3,96)			6 (4,77)			6 (4,77)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	4	3,17		3 (2,38)	1 (0,80)			4 (3,17)			4 (3,17)
<i>Clavispora lusitaniae</i>	3	2,38			3 (2,38)			3 (2,38)		3 (2,38)	
<i>Cndida tropicalis</i>	8	6,34	1 (0,80)		7 (5,55)			8 (6,34)			8 (6,34)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2	1,60		2 (1,60)				2 (1,60)		2 (1,60)	
<i>Cryptococcus gattii</i>	5	3,96			5 (3,96)			5 (3,96)			5 (3,96)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	58	46,0 3		3 (2,38)	55 (43,65)			58 (46,03)		2 (1,60)	56 (44,44)
Total	126	100	4 (3,17)	10 (7,94)	112 (88,89)			126 (100)		13 (10,31)	113 (89,69)

Fonte: Autoria própria.

Legenda: Concordante, para a mesma identificação no nível de gênero e espécie; em discordâncias menores, para os resultados discordantes apenas no nível de espécie, mas não no nível de gênero; e em discordâncias maiores, para os resultados discordantes no nível de gênero ou se os resultados do método não foram definitivos ou não forneceram nenhuma identificação.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo buscaram comparar os resultados de três métodos diagnósticos de identificação de leveduras, a saber, a metodologia convencional manual e os sistemas VITEK-2 e MALDI-TOF MS, estes últimos atualmente em crescente uso para diagnóstico micológico de rotina, agregado à prática padrão²⁹⁻³¹.

Entretanto, essas técnicas se complementam, pois a eficácia dos sistemas de identificação automática é significativamente influenciada por diversos fatores intrínsecos aos processos de cultivo e preparação das amostras, tais como as condições de cultivo, caracterizadas pelo tipo de meio de cultura e pelo grau de pureza da colônia, exercem um papel crucial na qualidade dos resultados obtidos^{30,32}. A heterogeneidade do meio e a presença de contaminantes podem gerar espectros

de baixa discriminação ou a não identificação, comprometendo a precisão e a reprodutibilidade das análises, amplamente aplicadas na microbiologia clínica, indústria alimentícia e pesquisa científica^{33,34}.

Além disso, a expertise do operador é um fator determinante na obtenção de resultados confiáveis. A interpretação correta dos dados gerados pelos equipamentos exige um profundo conhecimento das técnicas de cultivo, das características dos microrganismos e dos princípios de funcionamento dos sistemas de identificação^{30,35}.

Embora a cultura continue sendo uma etapa fundamental para a identificação microbiana automatizada, o campo está em constante evolução. Novas tecnologias e abordagens estão sendo desenvolvidas para superar as limitações da cultura tradicional e permitir a detecção e identificação mais rápida e precisa de microrganismos, como a PCR em tempo real e a espectrometria de massas. Nesta última, já trazem estudos que permitem a detecção direta de microrganismos em amostras clínicas, sem a necessidade de prévio cultivo, principalmente para bactérias; contudo, no campo micológico, tamanho avanço ainda não foi alcançado, com taxas de baixa identificação e técnicas de extração em aperfeiçoamento, para oferecer uma detecção mais rápida por hemoculturas e amostras de urina^{36,37}.

Conforme encontrado no estudo em discussão, a identificação por método proteômico foi maior em relação às espécies incomuns de *Candida* spp., especialmente em comparação com a metodologia manual, como a espécie *Kluyveromyces marxianus* (sin. *C. kefyr*), que apresentou conflito nas provas fenotípicas de Cornmeal e Chromagar®, não alcançando a identificação de espécie, e com uma baixa discriminação na identificação pelo VITEK-2, com um nível de confiança de 50% *Candida ciferrii* e 50% *Kluyveromyces marxianus* (sin. *C. kefyr*); situações semelhantes que envolveu espécies mais raras foram destacadas em outros estudos^{38,39}, em que provas fenotípicas foram insuficientes, e como esperado, há uma superioridade no desempenho pelo sistema MALDI-TOF na identificação de leveduras, que varia entre 84 a 99%^{40,41}, a depender do equipamento e das espécies testadas.

Notou-se que, em outro estudo, o sistema VITEK 2 apresentou inconsistências na identificação da espécie de *Cryptococcus*, assim como no presente estudo, o que levou à identificação da espécie *Papiliotrema laurentii* (sin. *Cryptococcus laurentii*), ao invés do *Cryptococcus neoformans*, o qual foi melhor identificado pelas outras duas metodologias³⁵.

Algumas cepas não foram reconhecidas como pertencentes ao complexo de espécies *C. neoformans*, pois elas não produziram melanina⁴²; uma das amostras do presente estudo apresentou divergência semelhante na prova manual de fenoloxidase em ágar niger, o que levou à suspeita de outras espécies de *Cryptococcus*, assim como apresentou resultado conflitante pelas técnicas automatizadas, onde o VITEK 2 identificou com baixa discriminação a espécie *Naganishia albida* (sin. *Cryptococcus albidus*), e o MALDI TOF MS como *C. neoformans*. Vale ressaltar que alguns estudos demonstraram que *Naganishia albida* (sin. *C. albidus*) e *Papiliotrema laurentii* (sin. *C. laurentii*) podem produzir melanina, embora em níveis mais baixos do que os de *C. neoformans* e *C. gattii*, até então isoladas em amostras vegetais e em estudos com camundongos⁴³⁻⁴⁶.

Em nosso estudo, outra amostra identificada e liberada como *Cryptococcus neoformans* pelas técnicas automatizadas, conflitou diante da prova fenotípica em ágar CGB, ao produzir reação positiva; contudo, salienta-se que a cor azul da assimilação de glicina no ágar CGB que indica positividade, é causada por *C. gattii*, enquanto *C. neoformans* não causa uma mudança de cor^{24,47}. Uma reação falso-positiva do meio CGB pode ser causada por isolados de outras espécies de *Cryptococcus* (*C. curvatus*, *P. laurentii* e *C. luteolus*), espécies de *Trichosporon* (*T. asteroides*, *T. asahii*, *T. inkin* e *T. mucoides*), *Geotrichum candidum* e *Candida parapsilosis* e *Candida famata*^{48,49}.

Em nosso estudo, foi observada uma concordância maior que 80% entre as metodologias automatizadas para as espécies *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae* e *Cryptococcus gattii*. A espécie *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*), *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* (sin. *Candida krusei*) e *Cryptococcus neoformans* apresentaram discordâncias de identificação pelo VITEK 2, em desacordo com o que foi descrito em estudo¹⁶, no qual foi obtida concordância na identificação por automatização nas espécies *Nakaseomyces glabratus* (sin. *Candida glabrata*), *Pichia kudriavzevii* (sin. *Candida krusei*) e *Cryptococcus neoformans*, e com outro estudo²⁵, em que todos os isolados de *C. albicans*, *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*), *Pichia kudriavzevii* (sin. *Candida krusei*) foram identificados corretamente.

Em trabalho anterior⁵⁰, pontuou-se que alguns isolados clínicos de *Candida* spp. foram identificados como *C. parapsilosis* pelo VITEK -2, e *Candida orthopsilosis* pelo MALDI TOF MS; posteriormente em um estudo⁵¹ com análises de amostras de animais com suspeita de micoses, fez-se a mesma observação, concluindo que essa divergência deve-se ao fato de que *C. orthopsilosis* ainda não está presente no banco de dados do VITEK 2, situação também observada no presente estudo em discussão com quatro isolados de *C. orthopsilosis* que não foram identificados como tal pelo VITEK-2. Essa situação é justificada pelo fato que a *Candida parapsilosis* identificada tanto pelo VITEK- 2 quanto provas bioquímicas manuais é, na

verdade, um complexo de 3 espécies membros denominados *Candida parapsilosis* sensu stricto (CPSS), *Candida orthopsilosis* (CO) e *Candida metapsilosis* (CM), que podem ser identificadas apenas por métodos moleculares e métodos automatizados, como espectrometria de massa MALDI-TOF MS⁵².

Devido a esses processos de não identificação e baixa discriminação de alguns microrganismos, como *Candida orthopsilosis* e *Pichia kudriavzevii* (sin. *Candida krusei*), as médias de nível de confiança foram baixas, respectivamente 17% e 62%, o que reflete a não confiabilidade dos resultados apresentados, principalmente pelo VITEK 2, nessa situação.

Quando comparados os resultados de MALDI-TOF MS e das metodologias convencionais foi observada concordância de 89,68%. Resultados semelhantes desse estudo foi visto em outro⁵³, no qual o desempenho geral do MALDI-TOF MS foi significativamente melhor do que os sistemas bioquímicos convencionais para identificação correta de leveduras, em que apresentaram altas porcentagens de identificações corretas de espécies 94,7%, e uma concordância em 82,3% com a identificação convencional. Assim como em estudo⁵⁴, que comparou apenas para cepas de *Candida*, e observou-se uma precisão de identificação de 91,80%, enquanto os convencionais de 85,30%. Posteriormente, em outro trabalho³⁸ notou-se que os resultados de automatizados foram mais confiáveis e rápidos do que os manuais bioquímicos, com identificação de 92,98%, enquanto os convencionais de 84,21%.

Similar a outros estudos^{35,55,56}, no processo de comparação de desempenhos do MALDI-TOF MS com o sistema VITEK 2, observou-se que MALDI-TOF MS ofereceu maior precisão de identificação e menores taxas de discordância em nível de espécie, quando comparado ao VITEK 2. Além disso, o MALDI-TOF MS reduziu o tempo de identificação, com subsequente melhoria no diagnóstico e redução no tempo para terapia apropriada^{57,58}.

Contudo, as limitações inerentes a essas tecnologias incluem o custo elevado dos equipamentos, a necessidade de atualização constante dos bancos de dados e a complexidade dos algoritmos de análise⁵⁹. A aquisição e manutenção de sistemas de última geração, como o MALDI-TOF MS, representam um investimento considerável, apesar de estudos relatarem sobre o custo-benefício, que seria compensado em cerca de 3 anos em laboratórios com grande número de amostras, resultando em uma economia de aproximadamente de 74,8% quando comparado com as metodologias tradicionais, observação retrospectiva feita pelo estudo no Laboratório de Microbiologia Clínica e Imunologia (CMIL) nos Hospitais da Universidade da Carolina do Norte (UNCH) após a implementação do MALDI-TOF MS para identificação de rotina de bactérias e leveduras^{60,61}.

O presente estudo possui três principais limitações. A primeira foi a quantidade reduzida de isolados fúngicos analisados, o que resultou em uma baixa variabilidade de espécies. A segunda limitação refere-se ao fato de que, embora os métodos fenotípicos sejam considerados padrão-ouro no serviço em questão, a ausência de um método de referência independente, como processos moleculares e sequenciais, limita a comparação precisa dos resultados. Por fim, a terceira limitação diz respeito à aprovação de que a identificação era correta quando havia concordância entre dois métodos. No entanto, é importante ressaltar que a concordância não garante a precisão do resultado.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que as técnicas bioquímicas convencionais manuais apresentam limitações significativas na identificação precisa de leveduras incomuns na rotina laboratorial. A baixa acurácia dessas metodologias se deve, em grande parte, à variabilidade fenotípica desses microrganismos, às limitações da técnica e à ausência de bancos de dados abrangentes, respectivamente, para as provas bioquímicas e para o VITEK 2.

Nesse contexto, a adoção de abordagens complementares, como a espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) e o sistema VITEK 2, demonstrou ser crucial para a obtenção de diagnósticos mais rápidos e precisos.

Sugere-se, portanto, a realização de estudos comparativos mais abrangentes, envolvendo um maior número de isolados e de diferentes espécies, assim como o uso de técnicas moleculares como referência, com o objetivo de estabelecer um painel amplo de metodologias capazes de atender às demandas diagnósticas de infecções leveduriformes crescentes.

ACESSO ABERTO



Este artigo está licenciado sob Creative Commons Attribution 4.0 International License, que permite o uso, compartilhamento, adaptação, distribuição e reprodução em qualquer meio ou formato, desde que você dê crédito apropriado ao(s) autor(es) original(is) e à fonte, forneça um [link](#) para o Creative Licença Commons e indique se foram feitas alterações. Para mais informações, visite o site creativecommons.org/licenses/by/4.0/

REFERÊNCIAS

1. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3482-6.
2. Casadevall A. Fungal diseases in the 21st century: the near and far horizons. *Pathog Immun* [Internet]. 2018;3(2):183-96. doi:10.20411/pai.v3i2.249
3. Zhao Y, Han X, Li S, He H. Editorial: Invasive fungal diseases: pathogen detection and diagnosis development. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2024;14:1473409. doi:10.3389/fcimb.2024.1473409
4. World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022.
5. Chen SC, Chakrabarti A, Cornely OA, Meis JF, Perfect JR. Informing the World Health Organization fungal priority pathogens list (WHO-FPPL): a collection of systematic reviews. *Med Mycol*. 2024;62(6):myae046.
6. Fisher MC, Denning DW. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(4):211-212.
7. Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2024;24(7):e428-e438. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00692-8.
8. Ikuta KS, Meštrović T, Naghavi M. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis*. 2024;24(5):e268.
9. Malhotra S, Sharma S, Bhatia NJK, Kumar P, Bhatia NK. Recent diagnostic techniques in mycology. *J Med Microb Diagn*. 2014;3:146.
10. Fang W, Wu J, Cheng M, Zhu X, Wei Du M, Chen C, et al. Diagnóstico de infecções fúngicas invasivas: desafios e desenvolvimentos recentes. *J Biomed Sci*. 2023;30(1):42
11. Zhao Y, Ye L, Zhao F, Zhang L, Lu Z, Chu T, et al. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. *Infect Dis Poverty* [Internet]. 2023;12(1):20. doi:10.1186/s40249-023-01073-4
12. Caceres DH, Galarza J, Lindsley MD, Chiller TM. Detection and control of fungal outbreaks. *Mycopathologia* [Internet]. 2020;185(5):741-5. doi:10.1007/s11046-020-00494-1
13. Melhem MS, Bertolotti A, Lucca HR, Silva RB, Meneghin FA, Szesz MW. Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Braz J Microbiol*. 2014;44(4):1257-66.
14. Rychert J. Benefits and limitations of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of microorganisms. *J Infectiol Epidemiol*. 2019;2(4).
15. Elbehiry A, Al-Dahdouh A, Marzban M, Al-Mohammadi SA, Shorman M, Al-Ansari M, et al. How MALDI-TOF mass spectrometry technology contributes to microbial infection control in healthcare settings. *Vaccines* [Internet]. 2022;10(11):1881. doi:10.3390/vaccines10111881
16. Garza-González E, Camacho-Ortiz A, Rodríguez-Noriega E, Esparza-Ahumada S, Flores-Treviño S, Bocanegra-Ibarias P, et al. Comparison of Matrix-assisted MALDI-TOF MS and the Vitek 2 system for routine identificativo of clinically relevant bacteria and yeast. *Ann Clin Lab Sci*. 2020;50(1):119-27
17. Hussain KK, Malavia D, Johnson EM, Littlechild J, Winlove CP, Vollmer F, et al. Biosensors and diagnostics for fungal detection. *J Fungi*. 2020;6(4):349.
18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BR). Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica. Brasília: ANVISA; 2013. 46 p.
19. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018. 1860 p.
20. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 4. ed. São Paulo: Sarvier; 2020.
21. Silveira-Gomes F, Sarmento DN, Espírito-Santo EPT, Souza NO, Pinto TM, Marques da Silva SH, et al. Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(4):457-460.
22. Franco-Duarte R, Cernáková L, Kadam S, Kaushik KS, Salehi B, Bevilacqua A, et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms*. 2019;7(5):130
23. Silva KOG, Dias DXR, Manrique EJC, Theodoro RC, Arantes TD. Emergent fungal disease: application of low-cost phenotypic identification for *Candida auris* laboratory diagnosis. *Rev Patol Trop*. [Internet]. 2025;54(1):1-14. doi: 10.5216/rpt.v54i1.81041
24. Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3669-3672.
25. Meurman O, Koskensalo A, Rantakokko-Jalava K. Evaluation of Vitek 2 for identification of yeasts in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(6):591-593.
26. Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules* [Internet]. 2020;25(20):4775. doi:10.3390/molecules25204775
27. Oviaño M, Rodríguez-Sánchez B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2021;39(4):192-200.
28. Moreira NK, Wilhelm CM, Echevarria AD, Volpato FCZ, Wink PL, Barth AL, et al. Direct detection of KPC peak from positive blood cultures using MALDI-TOF MS: are we there yet? *Antibiotics* [Internet]. 2023;12(3):601. doi:10.3390/antibiotics12030601
29. Posteraro B, Sanguinetti M, Mele F, Vella A, De Carolis E, Fiori B, et al. Are the conventional commercial yeast identification methods still helpful in the era of new clinical microbiology diagnostics? a meta-analysis of their accuracy. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2015;53(8):2439-50. doi:10.1128/JCM.00802-15
30. Robert MG, Cornet M, Hennebique A, Rasamoelina T, Caspar Y, Pondérand L, et al. MALDI-TOF MS in a medical mycology laboratory: on stage and backstage. *Microorganisms*. 2021;9(6):1283.
31. Motteu N, Goemaere, Bladt S, Packeu A. Implementation of MALDI-TOF mass spectrometry to identify fungi from the indoor environment as an added value to the classical morphology-based identification tool. *Front Allergy*. 2022;3:826148.

32. Hou TY, Chiang-ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal.* 2019;27(2):404-414
33. Zhang J, Plowman JE, Tian B, Clerens S, Stephen LW On. An improved method for MALDI-TOF analysis of wine-associated yeasts. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2020;172:105904. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701220300646>
34. Pławińska-Czarnak J, Wódz K, Strzalkowska Z, Zychska M, Nowak T, Kwiecinski A, et al. Comparison of automatic methods MALDI-TOF, VITEK2 and manual methods for the identification of intestinal microbial communities on the example of samples from alpacas (*Vicugna pacos*). *J Vet Res.* 2023;67(3):361-372.
35. Guo L, Ye L, Zhao Q, Ma Y, Yang J, Luo Y. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J Thorac Dis* [Internet]. 2014;6(5):534-8. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.02.18
36. Idevlevich EA, Escola I, Grunastel B, Wullenweber J, Petyers G, Becker K, et al. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014;20(10):1001-6. doi:10.1111/1469-0691.12640
37. Oberoi JK, Wattal C, Goel N, Raveendran R, Datta S, Prasad K. Non-albicans *Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. *Indian J Med Res.* 2012;136(6):997-1003.
38. Meena S, Mohanty A, Kaistha N, Sasirekha U, Meena J. Comparative assessment of Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant yeasts. *Cureus* [Internet]. 2021;13(6):e15607. doi:10.7759/cureus.15607
39. Huang YS, Wang Fu-Der, Chen Yee-Chun, Huang Yu-Tsung, Hsieh Min-Han, Hiilng-Moi, et al. High rates of misidentification of uncommon *Candida* species causing bloodstream infections using conventional phenotypic methods. *J Formos Med Assoc* [Internet]. 2021;120(5):1179-1187. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929664620305507>
40. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3482-6.
41. Mancini N, De Carolis E, Infurnari L, Vella A, Clementi N, Vaccaro L, Ruggeri A, et al. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2453-7.
42. Cordeiro RA, Costa AKF, Brilhante RSN, Lima RAC, Castelo-Branco DSCM, Ribeiro JF, et al. PCR-REA as an important tool for the identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from human and veterinary sources. *Vet Microbiol* [Internet]. 2011;154(1-2):180-4. doi:10.1016/j.vetmic.2011.06.038
43. Pedroso RS, Costa KR, Ferreira JC, Candido RC. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura [Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(5):566-8.
44. Ikeda R, Satoh K, Kuriyama T, Suzuki E, Iwanaga T, Makimura K, et al. Sequence variation in the internal transcribed spacer region of rRNA gene in *Candida guilliermondii* and related species. *J Clin Microbiol.* 2002;40(12):4759-62.
45. Oliveira LSS, Pinto LM, Medeiros MAP, Toffaletti DL, Tenor JL, Barros TF, et al. Comparison of *Cryptococcus gattii*/neoformans species complex to related genera (*Papiliotrema* and *Naganishia*) reveal variances in virulence associated factors and antifungal susceptibility. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021;11:642658. doi:10.3389/fcimb.2021.642658
46. Asadzadeh M, Ahmad S, Khan Z, Verghese S, Joseph L. Molecular identification, genotypic heterogeneity and comparative pathogenicity of environmental isolates of *Papiliotrema laurentii*. *J Med Microbiol.* 2020;69(11):1285-1292.
47. Beardsley J, Dao A, Keighley C, Garnham K, Halliday C, Chen SC, et al. What is new in *Cryptococcus gattii*: from bench to bedside and beyond. *J Fungi.* 2022;9(1):41.
48. McTaggart L, Richardson SE, Seah C, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX, et al. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests, differential media, and DNA sequencing. *J Clin Microbiol.* 2011;49(7):2522-7.
49. Suwantarant N, Watkins T, Lee R, Carroll KC, Zhang SX. False-positive reaction of L-canavanine glycine bromothymol blue medium with *Candida famata*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(4):1308-9.
50. Madhavan A, Sachu A, Sethuraman N, Kumar A, Vasudevapanicker J. Evaluation of Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight Mass spectrometry (MALDI TOF MS) and VITEK 2 in routine microbial identification. *Ghana Med J* [Internet]. 2021;55(4):308-10. doi:10.4314/gmj.v55i4.12
51. Calderón-Hernández J, García-Nieto E, Pinedo-Sánchez R, Echeverría-Correa O, Daza-Giraldo J, Reyes-Barahona S, et al. Evaluation of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* spp. and the detection of antifungal resistance: a systematic review and meta-analysis. *Mycoses.* 2024;67(1):e13996.
52. Samantaray S, Singh R. Evaluation of MALDI-TOF MS for identification of species in the *Candida parapsilosis* complex from candidiasis cases. *J Appl Lab Med.* 2022;7(4):889-900.
53. van Veen SQ, Claas EC, van Belkum A. Evaluation of the Bruker Biotyper MALDI-TOF MS for routine identification of microorganisms. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(12):1622-7.
54. Bonifaz A, Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM, Torres-Guerrero E, Tamayo-Sánchez L, Araiza J. Antifungal efficacy of novel essential oil-based formulations against clinical isolates of *Candida* species. *Mycoses.* 2019;62(10):917-23.
55. Ibraheem HA, Fawzi MM, El-gerby MM. A Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK2 for identification of aerobic gram positive and yeast strains isolated in Clinical Microbiology Laboratory. *Egypt J Med Microbiol.* 2019;28(3):43-8.
56. Belgacem S, Chebil W, Salem SB, Babba O, Mastouri M, Babba H. Identification and antifungal susceptibility profile of uncommon yeast species at Fattouma Bourguiba University Hospital in Tunisia. *Med Mycol.* 2024;62(8).
57. Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2013;51(7):2267-72. doi:10.1128/JCM.00680-13
58. Rychert J, Rabaa MA, Shah M, Jerris R, El R, Al R, et al. Cost-effectiveness of a new diagnostic algorithm incorporating MALDI-TOF mass spectrometry for identification of *Candida* species in a pediatric hospital in India. *J Clin Microbiol.* 2019;57(3):e01479-18.

59. Robert MG, Cornet M, Hennebique A, Rasamoelina T, Caspar Y, Pondérand L, et al. MALDI-TOF MS in a Medical Mycology Laboratory: on stage and backstage. *Microorganisms*. 2021;9(6):1283.
60. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011;49(4):1614-6. doi: 10.1128/JCM.02381-10
61. Tran A, Alby K, Kerr A, Jones M, Gilligan PH. Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2015;53(8):2473-9. doi: 10.1128/JCM.00833-1

DATA DE PUBLICAÇÃO: 20 de fevereiro de 2026