

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**ANA CAROLINA GROEHS**

**Avaliação do sistema MALDI-TOF MS como metodologia para a identificação  
de espécies de *Rhodotorula* spp.: uma revisão da literatura**

Porto Alegre

2021

ANA CAROLINA GROEHS

**Avaliação do sistema MALDI-TOF MS como metodologia para a identificação de espécies de *Rhodotorula* spp.: uma revisão da literatura**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do grau farmacêutico pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Renata Pereira Limberger

Co-orientadora: Adelina Mezzari

Porto Alegre

2021

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha querida família, minha mãe, Rosângela, minha segunda mãe, Suzéte, e minha namorada, Nicolle, pela paciência, apoio e incentivo durante todo esse período. Graças a vocês, a conclusão dessa etapa está sendo possível.

À minha fiel companheira de estudos e amiga, Deise, pelo companheirismo, motivação e ajuda nos melhores, mas também nos momentos mais difíceis da graduação. E à minha “escudeira” Mayana, pelo imenso auxílio, incentivo e por me fazer amar cada dia mais a nossa profissão.

Aos meus amigos, pela compreensão, apoio e admiração pela minha caminhada durante todos esses anos.

A todos os incríveis profissionais que contribuíram para a minha formação durante os estágios, farmacêuticos do HCPA, farmacêuticos da Farmácia Popular do Brasil e farmacêuticos e químicos da Polícia Federal do Rio Grande do Sul.

Às minhas orientadoras, Renata e Adelina, contribuindo para a minha formação e evolução pessoal e profissional. Obrigada por me incentivar e acreditar tanto na minha capacidade.

À equipe LabTóxico e aos professores e profissionais UFRGS dedicados a meu ensino de forma tão especial. O prazer de concluir a graduação nessa universidade é imensurável!

## RESUMO

A maioria dos fungos não-*candida* não eram considerados patógenos até poucos anos atrás, mas esse cenário está mudando e entre os gêneros que estão emergindo está *Rhodotorula*: uma levedura que tem atingido principalmente pacientes imunocomprometidos e portadores de cateteres de uso venoso central. Os métodos mais comuns na rotina de análise de micro-organismos são cultura e bioquímica, seguido de técnicas moleculares, exigindo mais de 48 horas para visualização dos resultados em ambos os casos. Diante da necessidade de resultados mais rápidos a fim de realizar a escolha da terapia correta para o paciente, MALDI-TOF MS vem como uma ferramenta revolucionária, pois através dele é possível obter a identificação correta em menos de 3 horas e em alguns casos em até 20 minutos. No caso de leveduras, há a necessidade de uma etapa pré-analítica muito importante: extração de proteínas; essa técnica pode ser feita por métodos diversos. O objetivo dessa revisão da literatura é abordar aspectos de identificação de espécies de *Rhodotorula* por MALDI-TOF MS entre os anos 2000 e 2020, traçando uma linha do tempo para que seja possível observar o avanço da técnica, assim como explicar os métodos de extração mais utilizados, os tipos de amostras onde esse micro-organismo foi isolado e as espécies que foram encontradas. Baseado nisso, apesar da necessidade de enriquecimento das espectrotescas, os resultados obtidos foram otimistas, visto que 86% dos estudos foram capazes de identificar *Rhodotorula* por MALDI e desses, 81,1% conseguiu identificar a nível de espécie, sendo que a predominante foi *R. mucilaginosa*.

**Palavras-chave:** *Rhodotorula*. MALDI-TOF MS. Identificação. Espectrometria de massas.

## ABSTRACT

Most non-candida fungi were not considered pathogens until a few years ago, but this scenario is changing and among the genus that are emerging is *Rhodotorula*: a yeast that has mainly affected immunocompromised patients and patients with catheters in use central venous. The most common methods in the routine of microorganism analysis are culture and biochemistry, followed by molecular techniques, requiring more than 48 hours to visualize the results in both cases. In view of the need for faster results in order to choose the right therapy for the patient, MALDI-TOF MS comes as a revolutionary tool, because it is possible to obtain the correct identification in less than 3 hours and in some cases up to 20 minutes. In the case of yeasts, there is a need for a very important pre-analytical step: protein extraction; this technique can be done by different methods. The objective of this literature review is to address aspects of *Rhodotorula* species identification by MALDI-TOF MS between the years 2000 and 2020, tracing a timeline so that it is possible to observe the advancement of the technique, as well as to explain the most efficient extraction methods used, the types of samples where this microorganism was isolated and the species that were found. Based on this, despite the need to enrich the library of spectral data, the results obtained were optimistic, since 86% of the studies were able to identify *Rhodotorula* by MALDI and of these, 81.1% managed to identify at a species level, which the predominant was *R. mucilaginosa*.

**Keywords:** *Rhodotorula*. MALDI-TOF MS. Identification. Mass spectrometry.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 OBJETIVO</b> .....	10
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	11
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	12
4.1 Identificação de <i>Rhodotorula</i> spp.....	13
4.2 Métodos de extração para análise por MALDI-TOF MS .....	15
4.3 Resultados obtidos por MALDI-TOF MS e pontuações .....	17
4.4 Variabilidade de amostras .....	20
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>ANEXO A – TABELA DE DADOS DOS ESTUDOS SELECIONADOS</b> .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

Antigamente, as espécies de *Rhodotorula* spp. não eram consideradas ameaças aos seres humanos. Este gênero foi descoberto por Harrison, em 1927, e até 1985 não era identificado como patógeno em humanos (ALMEIDA et al., 2008; PERETZ et al., 2018). Os principais causadores de fungemia eram espécies de *Candida* spp. Nas três últimas décadas, o cenário está mudando e o que antes não era considerado uma grande preocupação, hoje é. Várias espécies estão emergindo em diferentes quadros clínicos e até em diferentes níveis de complexidade, podendo variar de infecções de pele a casos críticos de meningites, ventriculites, septicemias, pneumonias, peritonites, entre outras, principalmente em pacientes imunocomprometidos (KRZSCIANK & MACURA, 2010; ALTUN et al., 2014). A forma mais comum de infecções oportunistas por leveduras é através do uso de cateter venoso central (CVC) durante longos períodos (TUON; ALMEIDA; COSTA, 2007). *R. mucilaginosa* é uma causa de peritonite fúngica em pacientes em diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD). Isso ocorre normalmente devido à colonização saprofítica de cateteres ou máquinas de diálise. Esta espécie é responsável pela maioria das infecções (74 - 79%) seguida por *R. glutinis* (7,7%) (TUON E COSTA, 2008; ARENDRUP et al., 2014).

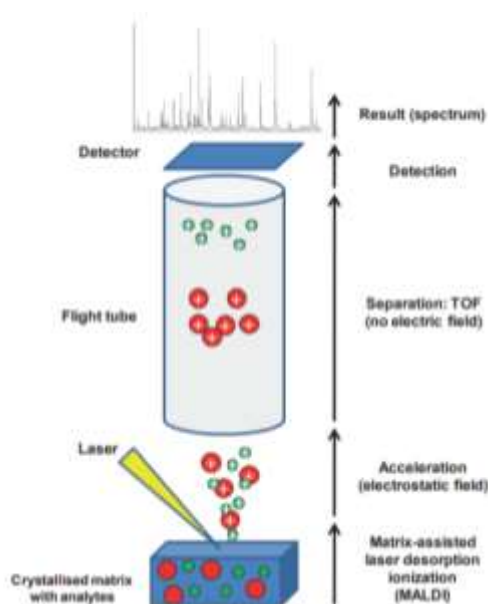
O primeiro caso de infecção por essa levedura foi descrito na década de 1960 nos Estados Unidos (EUA). Uma paciente do sexo feminino, de 47 anos com reumatismo, apresentou endocardite com desfecho fatal (LOURIA; GREENBERG; MOLANDER, 1960; TUON; ALMEIDA; COSTA, 2007). O gênero desse caso não foi descrito.

A rotina de identificação de fungos e leveduras baseia-se em cultura e métodos adicionais bioquímicos. Em algumas situações, métodos moleculares também são utilizados, mas em ambos os casos, o tempo para obtenção e interpretação de resultados é 48h ou mais, dificultando a implantação da terapêutica no paciente.

A espectrometria de massas começou a ser utilizada para identificação de micro-organismos por volta dos anos 1970 (ANHALT; FENSELAU, 1975). Nessa época, não era possível ionizar moléculas grandes ou moléculas não voláteis. Em 1987, Koichi Tanaka e colaboradores desenvolveram uma matriz que foi capaz de promover essa ionização (TANAKA et al., 1988).

O termo MALDI é derivado da língua inglesa: *Mass Assisted Laser Desorption/Ionization*, ou seja, Dessorção/Ionização por laser assistido por matriz. Já a sigla TOF significa *time of flight*, ou seja, tempo de voo. TOF é um tipo de analisador/separador de íons utilizado por esse tipo de espectrometria de massas, onde a diferenciação das moléculas pela sua massa/carga é feita através do seu tempo de voo em um tubo de vácuo. Dessa forma, íons menores chegam mais rapidamente no detector e o tempo de voo de cada partícula é utilizado para calcular a sua massa e formar o espectro de massas, onde o eixo das abcissas é correspondente a razão massa/carga e o eixo das ordenada corresponde a intensidade do sinal (BRANDT; LOCKHART, 2012).

A amostra é depositada sobre uma placa, juntamente com a matriz. Essa mistura é seca e cristalizada para que posteriormente seja bombardeada com laser, onde a energia é absorvida pela matriz, ionizando a amostra. O feixe de laser realiza milhares de disparos, formando milhares de espectros que são acumulados para produzir o espectro final e isso ocorre em uma preparação de alguns milímetros quadrados. Após a ionização, os íons formados são acelerados em um tubo de vácuo por meio de um campo eletrostático até chegarem no detector (final no tubo). Ao contrário de diversos tipos de espectrômetro de massas, MALDI não é associado a unidades cromatográficas (HOFFMANN; STROOBANT, 2016). A Figura 1, de Croxatto (2012), ilustra esse mecanismo.



**Figura 1 - Descrição da técnica MALDI-TOF MS**



A matriz utilizada possui quatro principais funções: (1) rompimento das células e extração de proteínas; (2) separação das moléculas de proteínas que ficam aderidas; (3) extração da placa onde estão aderidas para o estado gasoso através a absorção da energia emitida pelo laser (dessorção das moléculas); (4) doação de H<sup>+</sup> para os íons de carga positiva. A principal matriz empregada é constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

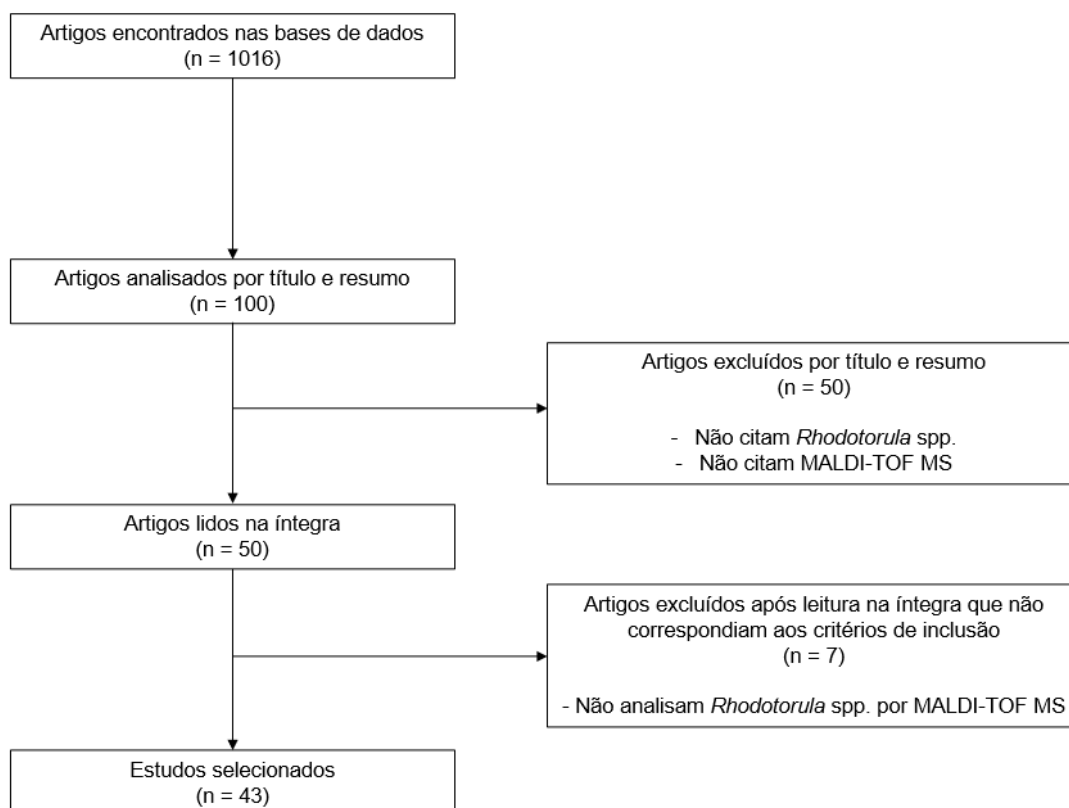
## 2 OBJETIVO

Realizar revisão na literatura sobre a identificação de *Rhodotorula* spp. por MALDI-TOF MS nas bases de dados *Science Direct* e *PubMed* nos últimos vinte anos.

### 3 METODOLOGIA

Uma pesquisa bibliográfica foi realizada abordando a identificação da levedura *Rhodotorula* spp. através de espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS). As palavras-chaves utilizadas foram “*rhodotorula and MALDI*” e “*rhodotorula and mass spectrometry*”. Na busca, foram incluídos artigos de pesquisa, enciclopédias, capítulos de livro e casos clínicos. Artigos de revisão foram excluídos.

Para “*rhodotorula and mass spectrometry*” foram encontrados 777 trabalhos. Já para “*rhodotorula and MALDI*”, foram encontrados 239 trabalhos. Documentos que não utilizassem a ferramenta MALDI-TOF MS e que não citassem o fungo *Rhodotorula* spp. foram excluídos, resultando em 43 trabalhos. Dessa forma, a partir dessa busca, foi realizada a leitura integral dos artigos que se enquadraram no tema do presente trabalho e sua análise com os resultados avaliativos.



**Figura 2 - Fluxograma da seleção de estudos**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A levedura *Rhodotorula* spp. já é causa de infecção no mundo todo, com maior frequência na região da Ásia (MICELI; A DIAZ; A LEE, 2011). As complicações causadas podem ser muito graves. Além disso, a taxa de mortalidade é estimada em 12 a 20% entre os casos de fungemia e fatores de risco como: outras infecções concomitantes, desequilíbrios nutricionais e resistência intrínseca aos antifúngicos podem influenciar no agravamento da doença (ALMEIDA et al., 2008; RAMANA et al., 2013). Em outro estudo, realizado por Almeida (2008), é relatado que este pode ser o terceiro gênero de leveduras mais isolado em hemoculturas. Além disso, pode ser considerado o agente etiológico causador de fungemias em aproximadamente 2% dos casos reportados em diferentes estudos epidemiológicos (KRCMERY et al., 2002; TUON & COSTA, 2008; DUGGAL et al., 2011; AZIE et al., 2012).

*Rhodotorula* spp. é uma levedura que na cultura se apresenta como uma colônia de coloração característica, podendo ser rosa, alaranjada ou coral (Figura 3). Através da observação microscópica da colônia, é possível ver que sua morfologia conta com brotamentos esféricos, alongados ou ovoides, além do desenvolvimento de pseudo-hifa ou hifa verdadeira (HORKÁ et al., 2017; WIRTH, 2011). As suas espécies são basidiomicetas ambientais comuns. O principal componente da sua parede celular é glucomanano (YANG et al., 2011).

Podem ser encontradas em diversos locais, como solo, água de mar e lagos, alimentos (suco de frutas e leite) e até em superfície, como cortinas de chuveiro e escovas de dente. Hoje, o gênero contém 46 espécies, mas somente três foram descritas como patógenos humanos: *R. mucilaginosa* (anteriormente conhecida como *R. rubra*), *R. glutinis* e *R. minuta* (ARENDRUP et al., 2014), sendo que os membros mais importantes, clinicamente, são as espécies *R. mucilaginosa* e *R. glutinis* (BRANDT; LOCKHART, 2012).

A Figura 3, de Ellis (2016), ilustra a cultura de *Rhodotorula mucilaginosa*, demonstrando sua coloração alaranjada característica.



**Figura 3 - Cultura de *Rhodotorula mucilaginosa***

#### **4.1 Identificação de *Rhodotorula* spp.**

É de extrema importância realizar a identificação correta do patógeno para que o manejo terapêutico seja feito da maneira correta, garantindo a melhora do paciente e auxiliando na diminuição da resistência aos antifúngicos (MARTINS et al., 2020).

Os métodos de identificação de fungos convencionais partem do seu isolamento em cultura e se baseiam nas características das colônias, sendo elas fisiológicas e macro/micro morfológicas. Além disso, são realizados métodos bioquímicos para confirmação. Esses tipos de testes exigem tempo, tanto de preparo, quanto de espera para análise dos resultados, visto que é necessário o desenvolvimento da colônia. Ainda, as condições de cultura podem gerar resultados diferentes e inconclusivos (AGUSTINI et al., 2014).

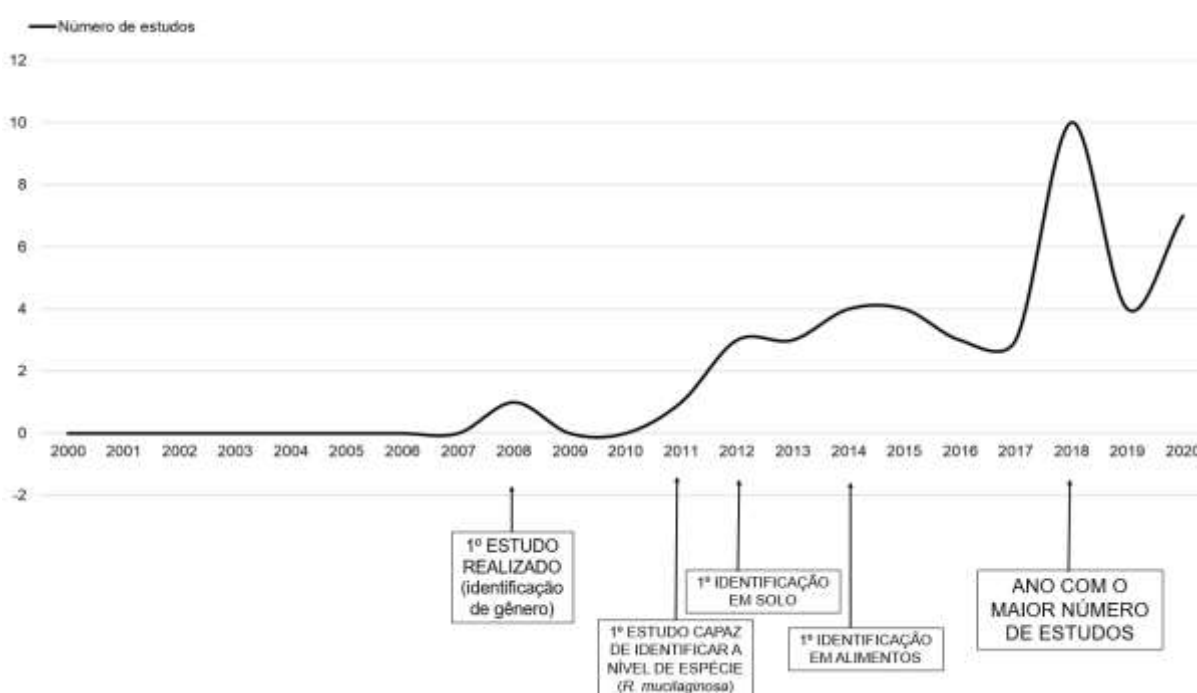
Muitas vezes, para identificação a nível de espécie, se faz necessário o uso de técnicas moleculares, porém, devido ao seu alto custo, esse tipo de ferramenta não está presente na maioria dos laboratórios para análises de rotina, apesar da sua alta confiabilidade (ALMEIDA et al., 2005). Nesse sentido, em muitos casos clínicos, a identificação de espécies requer ampliação da região ITS e/ou sequenciamento D1/D2 (DUBOC DE ALMEIDA et al., 2008; TUON E COSTA, 2008; ARENDRUP et al., 2014).

Visto como uma revolução na identificação de isolados em microbiologia, o uso de MALDI-TOF MS vem sendo explorado nas duas últimas décadas por ser extremamente rápido e fornecer resultados precisos (HÖLL et al., 2016; HILGARTHET al., 2018; LAGIER et al., 2016). Essa técnica evita a necessidade de testes adicionais,

economizando tempo e mão-de-obra (POSTERARO et al., 2015). O método foi inicialmente utilizado para bactérias e depois para leveduras (CASSAGNE et al., 2016; PORTE et al., 2017). Apesar do seu baixo custo por análise, seu custo de aquisição é alto, justificando a sua limitação de uso ainda (AZIM et al., 2015; CRISEO et al., 2015; MATHUR et al., 2014).

O presente estudo buscou artigos desde o ano 2000 até 2020 que relacionassem a correta identificação de *Rhodotorula* com a ferramenta MALDI-TOF MS. Foram selecionados 43 trabalhos durante esses 20 anos, sendo que a última década foi a mais expressiva em número de publicações desse assunto (Figura 4).

Destaca-se que o primeiro estudo realizado com *Rhodotorula* foi em 2008, sendo possível somente a identificação a nível de gênero diretamente do micro-organismo (QIAN et al., 2008). Após, em 2011, Bader e colaboradores conseguiram identificá-la a nível de espécie, sendo *R. mucilaginosa*, também diretamente no micro-organismo. A primeira identificação em amostra ambiental foi em solo, em 2012, por Mao e colaboradores; antes, os estudos realizados só eram em amostras de origem humana ou diretamente na cepa. Já a primeira identificação em alimentos foi realizada por Pavlovic, em 2014. É possível perceber um considerável aumento no número de estudos a partir de 2012, sendo que durante o período da busca, o ano de 2018 foi o maior em número de publicações sobre o assunto.



**Figura 4 - Linha do tempo de publicações**

## 4.2 Métodos de extração para análise por MALDI-TOF MS

Para que seja possível a obtenção de um espectro de massas proveniente de uma amostra de micro-organismo, é necessário realizar a extração das suas proteínas. No caso de leveduras, assim como outras espécies de fungos, há a presença de uma parede celular espessa rica em quitina (SEYFARTH et al., 2012). Por isso, a preparação da amostra é muito importante; é através dela que ocorre a liberação dessas proteínas e geração de sinais característicos com intensidades satisfatórias, formando o espectro de cada cepa.

A presente revisão da literatura buscou conhecer os principais métodos de extração de proteínas, reagentes e procedimentos utilizados. Foram encontrados três métodos principais (descritos abaixo como M1, M2 e M3) já consolidados e especificados por Cassagne (2016) e, em raras situações, outros métodos utilizados como experimentos e testes (descrito como “outros” na tabela 1). Infelizmente, vários artigos não especificaram o método utilizado, sendo esses descritos como “NI” – não informado.

M1: essa técnica foi nomeada de “procedimento de esfregaço” e é a mais simples de todas. Consiste em colocar uma fina camada da colônia na placa de aço MALDI e deixá-la secar ao ar. M1 não foi muito utilizada, visto que não há um procedimento com reagentes que promovam a destruição da parede celular e liberação das proteínas de forma satisfatória (CASSAGNE et al., 2016). Dentre os artigos selecionados para essa revisão, esse método foi o menos utilizado, sendo que somente dois autores optaram pela sua realização (SEYFARTH et al., 2012; GHOSH et al., 2015). O estudo de 2015 testou não exclusivamente M1, mas sim os três métodos.

M2: esse procedimento de preparação consiste na extração das proteínas pela ação do ácido fórmico. Ele possui variações, pois alguns autores optaram por aplicar uma fina camada de colônia diretamente na placa de aço MALDI, deixar secar e, em seguida, cobrir a amostra com ácido fórmico 70% e deixar secar ao ar novamente (ANNA et al., 2020; CASSAGNE et al., 2016). Já outros autores, preferiram realizar essa mistura de colônia com ácido fórmico antes de aplicar na placa: em um tubo com ácido fórmico, é adicionado uma quantidade de colônia e procede-se a agitação e sonicação. O sobrenadante, então, é adicionado à placa e seco ao ar (MARTINS et al., 2020). Nesse caso, 12 dos 43 autores optaram por utilizar esse método, sendo

que 9 procederam a extração em tubo antes de aplicar na placa (MARTINS et al., 2020; DALLUGE; BROWN; CONNELL, 2019; BORGES et al., 2018; TARTOR et al., 2018; RUIZ DE ALEGRÍA PUIG et al., 2018; GALÁN et al., 2015; GHOSH et al., 2015; LOHMANN et al., 2013; BILLE et al., 2012) e 3 a fizeram diretamente na placa (ANNA et al., 2020; SILVA et al., 2020; BADER et al., 2011). Um autor optou por testar as duas variações desse protocolo - em tubo e direto na placa (DEAK et al., 2015).

M3: esse método consiste em uma extração realizada por ácido fórmico/acetoneitrila e etanol: suspende-se uma colônia em um tubo contendo água estéril e adiciona-se álcool etílico anidro. Procede-se a centrifugação e ressuspende-se o pellet em ácido fórmico 70% com acetoneitrila 100%. Centrifuga-se e deposita-se o sobrenadante na placa MALDI para secagem ao ar. Esse tipo de extração foi o mais utilizado, sendo realizado por 18 estudos dos 43 selecionados (PERUZY et al., 2019; CHAGAS BARROS et al., 2019; HUYBEN et al., 2018; KRAKOVÁ et al., 2018; MAZARI et al., 2018; QUINTILLA et al., 2018; RESENDE et al., 2018; SCAPATICCI et al., 2018; MIGUEL et al., 2017; LYAS et al., 2016; GALÁN et al., 2015; RELLOSO et al., 2015; GHOSH et al., 2015; JAMAL et al., 2014; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al., 2014; PAVLOVIC et al., 2014; LOHMANN et al., 2013; BADER et al., 2011).

Alguns outros métodos foram encontrados, mas a sua descrição foi feita de forma isolada em somente um trabalho. Cassagne (2016), por exemplo, testou uma versão modificada de M3, onde o pellet foi incubado com ácido fórmico antes da adição de acetoneitrila por 5 minutos e, antes da centrifugação, foi incubado por 5 minutos com acetoneitrila também. Ainda, Ghosh (2015) emulsificou colônias em um tubo contendo água bidestilada estéril. A mistura foi agitada e centrifugada e o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se o procedimento duas vezes até que o sedimento foi resuspenso em água estéril e essa suspensão foi aplicada na placa e seca ao ar.

Alguns trabalhos não explicitaram o método de extração de proteínas utilizado, sendo responsáveis por 9 dos 43 estudos (IDRIS et al., 2020; NONI et al., 2020; COBO; ZARAGOZA; NAVARRO-MARÍ, 2020; FRENKEL et al., 2020; PRIGITANO et al., 2020; XIAO et al., 2018; HORKÁ et al., 2017; GHANI et al., 2014; BELLANGER et al., 2013). Ainda, diversos autores utilizaram mais de um método, sendo explicitado na Tabela 1.

Ao final, independentemente do método de preparação, após as placas estarem secas, a matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em 50% de



acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético (TFA) foi adicionada e seca ao ar também.

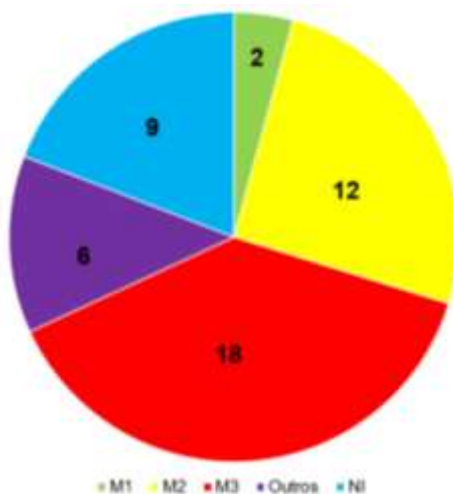


Figura 5 - Métodos de extração

#### 4.3 Resultados obtidos por MALDI-TOF MS e pontuações

Dos 43 artigos que buscaram identificar a levedura *Rhodotorula* spp., através do MALDI-TOF MS, 37 trabalhos conseguiram realmente fazer a identificação. Destes, alguns foram capazes de realizar a nível de gênero e outros a nível de espécie: 30 estudos conseguiram identificar o micro-organismo a nível de espécie e 7 somente a nível de gênero, conforme a figura abaixo.

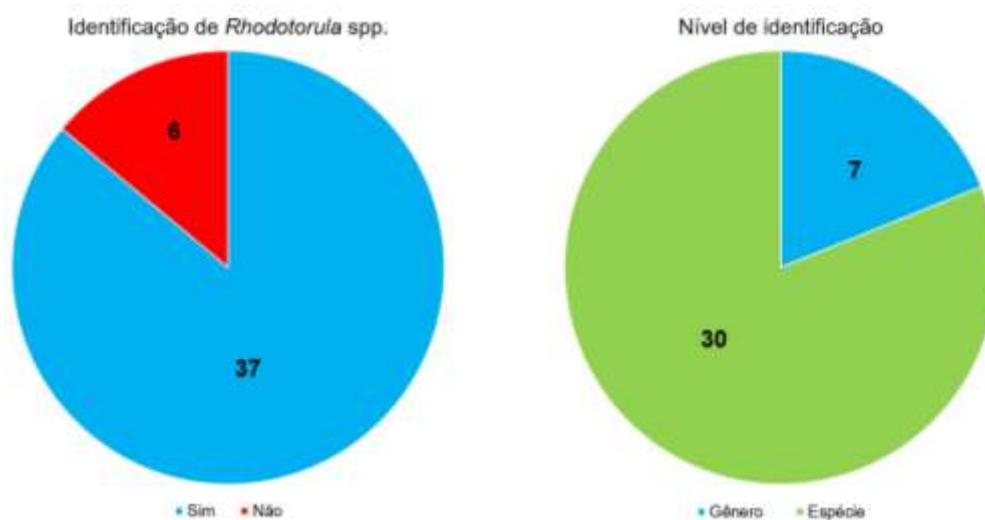


Figura 6 - Resultados de identificação

Acredita-se que há dois principais motivos para 14% dos autores não conseguirem realizar a identificação. O primeiro deles é a falta de espectros de referência no banco de dados, não fornecendo a similaridade em um nível seguro de identidade. E o segundo motivo pode ser relacionado ao método de extração ou a sua própria execução. Não é possível eleger o “pior método” baseado nos resultados dessa revisão, visto que entre esses 6 estudos negativos, um utilizou M2 e M3 e não conseguiu identificar (GALÁN et al., 2015), um não especificou o protocolo utilizado na fase pré-analítica (COBO; ZARAGOZA; NAVARRO-MARÍ, 2020) e dois utilizaram outros métodos (GOURIET et al., 2016; YONETANI et al., 2016).

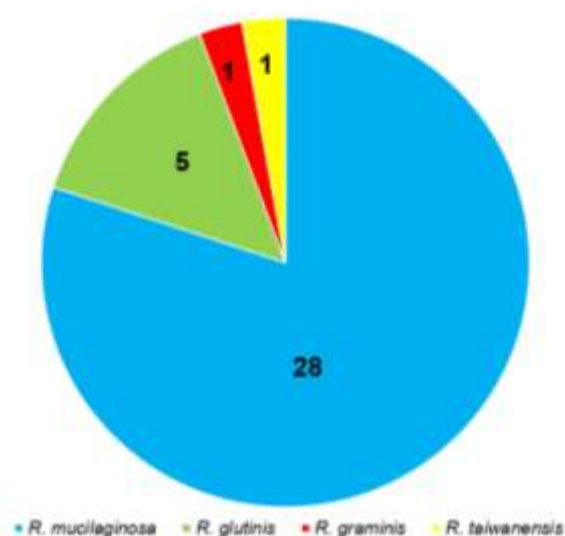
A confiabilidade da identificação realizada por MALDI é representada por pontuações, isto é, um log variando entre 2,0 e 2,3 significa uma identificação segura de gênero e provável de espécie; entre 1,7 e 2,0 significa em uma identificação provável de gênero e valores abaixo de 1,7 significam que não há semelhança entre o espectro obtido em comparação com o banco de dados do sistema (ANNA et al., 2020; JEONG et al., 2016; GHOSH et al., 2015; PAVLOVIC et al., 2014; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al., 2014; SENG et al., 2009). Alguns equipamentos, como BioTyper, por exemplo, associam cores aos logs obtidos, sendo que verde é relacionado com pontuações entre 2,0 e 2,3, amarelo com valores entre 1,7 e 2,0 e vermelho com pontuações abaixo de 1,7 (CHAGAS BARROS et al., 2019). Ainda, existe outro mecanismo para representar a confiabilidade dos resultados: no sistema VITEK, são expressos em porcentagem relacionadas com cores. Verde significa valores acima de 90% de identidade, amarelo corresponde a 85 - 89,9% e branco corresponde a valores abaixo de 85% (JAMAL et al., 2014).

Alguns autores argumentam a favor da redução da pontuação limite para o para 1,8 ou até mesmo para 1,7 sem afetar a identificação precisa, diminuindo a necessidade de etapas de extração (JAMAL et al., 2014). Entretanto, há relatos contra a diminuição da pontuação indicando que pode acarretar em identificações errôneas (PAVLOVIC et al., 2014), sendo assim, os critérios oficiais permanecem de 2,0 - 2,3; 1,7 - 2,0 e abaixo de 1,7.

Poucos trabalhos relatam a pontuação obtida ao identificar *Rhodotorula* (somente 8) e, dentre esses, três autores trazem pontuações entre 2 e 2,3, indicando uma identificação segura a nível de gênero e provável de espécie e um autor traz um log abaixo de 1,7, indicando uma identificação não confiável, apesar de ter tratado

como gênero *Rhodotorula* spp. mesmo assim. Os demais fornecem pontuações que representam um resultado provável a nível de gênero.

Dos 30 estudos que conseguiram identificar o micro-organismo a nível de espécie, 28 se tratava de *R. mucilaginosa*, sendo a responsável pela maioria. Em seguida, a segunda espécie mais identificada foi *R. glutinis*, com 5 trabalhos relatando-a. Por fim, duas outras espécies foram identificadas, cada uma em somente um estudo: *R. graminis* e *R. taiwanensis* (Figura 7). Em alguns estudos, mais de um tipo de espécie foi identificada.



**Figura 7 - Espécies identificadas**

A ilustração (Figura 8) do espectro obtido por Chagas Barros (2019) com pontuação equivalente a 2,016, indica identificação de *R. glutinis*. Essa levedura foi isolada de amostra de alimentos (laticínios, peixes e carnes) pelo método M3 (descrito em 4.2). Já a Figura 9, de Horká (2017) ilustra o espectro de *R. mucilaginosa* obtido diretamente de uma cepa sem método de extração especificado.

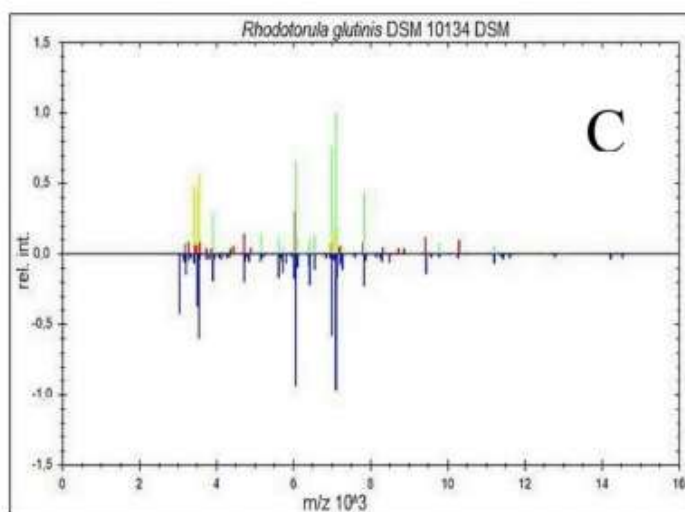


Figura 8 - Espectro de *R. glutinis*

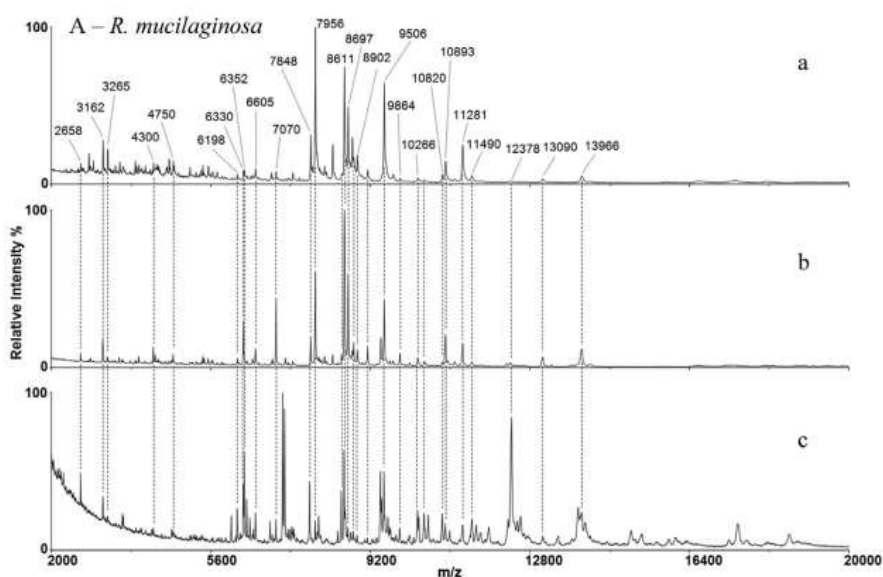


Figura 9 - Espectro de *R. mucilaginosa*

#### 4.4 Variabilidade de amostras

As espécies de *Rhodotorula* estão presentes nos mais diversos ambientes e superfícies, como solo, ar ambiente, alimentos e em seres humanos, colonizando pele, escarro, urina, fezes e sangue. Alguns autores relatam o isolamento de *R. mucilaginosa* até em locais pouco favoráveis, como profundezas de mares, ambientes

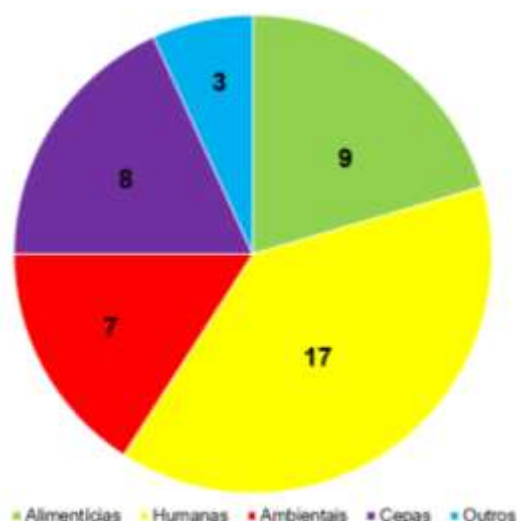
aquáticos com alta temperatura e hipersalinos (Mar Morto em Israel) e até águas poluídas por resíduos domésticos. No presente trabalho, dos 43 artigos selecionados, 7 deles isolaram *Rhodotorula* em amostras ambientais: um deles em efluente industrial (LYAS et al., 2016), um no solo (MAO et al., 2012), um em areia da praia (FRENKEL et al., 2020), um em gelo sobre o solo (DALLUGE; BROWN; CONNELL, 2019), dois em água (MAZARI et al., 2018; GHANI et al., 2014) e um em amostras clínicas e ambientais, não detalhando qual (BELLANGER et al., 2013).

A levedura também se faz presente em amostras alimentícias, como frutas, sucos, laticínios, embutidos, defumados, crustáceos, entre outros. O consumo de alimentos contaminados não parece estar ligado a infecções oportunistas, nesse caso, mas há uma certa preocupação principalmente com os pacientes imunocomprometidos. Foram encontrados 9 trabalhos relatando seu isolamento tanto em bebidas, quanto em comidas: o mais recente estudo, isolou o micro-organismo em grãos de café (MARTINS et al., 2020). Em 2019, foram isoladas em carne de javali (PERUZY et al., 2019) e em laticínios, carne e peixe (CHAGAS BARROS et al., 2019). Em 2018, há relatos de isolamento em peixes (TARTOR et al., 2018; HUYBEN et al., 2018), alimentos em geral (QUINTILLA et al., 2018) e um tipo de bebida chinesa (RESENDE et al., 2018). Antes, em 2017, houve um isolamento em cacau (MIGUEL et al., 2017) e, em 2014, um relato em alimentos em geral também (PAVLOVIC et al., 2014).

Com relação a isolamentos provenientes de amostras biológicas, a presente revisão encontrou 17 artigos. Superfícies e fluidos humanos foram as amostras relatadas em 7 trabalhos de forma geral (XIAO et al., 2018; SCAPATICCI et al., 2018; GOURIET et al., 2016; GALÁN et al., 2015; RELLOSO et al., 2015; JAMAL et al., 2014; LOHMANN et al., 2013), além disso, mais especificamente, um trabalho relatou o isolamento em amostra de soro com IgE proveniente do pólen de uma espécie de árvore (*Ailanthus altissima*) (MOUSAVI et al., 2017). Ainda, 2 autores realizaram o isolamento em sangue (NONI et al., 2020; COBO; ZARAGOZA; NAVARRO-MARÍ, 2020), 1 em unha (IDRIS et al., 2020) e 1 em fezes (BORGES et al., 2018). A levedura também foi identificada em hemoculturas positivas em 4 casos (PRIGITANO et al., 2020; RUIZ DE ALEGRÍA PUIG et al., 2018; YONETANI et al., 2016; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al., 2014). Por fim, um autor descreveu a suas amostras como “isolados clínicos e ambientais”, não explicitando quais eram esses isolados, como já citado anteriormente (BELLANGER et al., 2013). Esse tipo de amostra foi incluído na

contagem como “ambiente” e como “humano” também. Ainda, se tratando de identificação de *Rhodotorula* diretamente em cepas (não especificando a sua procedência), foram encontrados 8 estudos (HORKÁ et al., 2017; DEAK et al., 2015; GHOSH et al., 2015; WANG et al., 2013; BILLE et al., 2012; SEYFARTH et al., 2012; BADER et al., 2011; QIAN et al., 2008).

Além disso, mais dois tipos de amostras foram descritos em 3 estudos: papel (ANNA et al., 2020; KRAKOVÁ et al., 2018) e orofaringe de gavião (SILVA et al., 2020), demonstrando a diversidade de locais e sítios que esse micro-organismo pode realmente ser encontrado. Como já citado anteriormente, *Rhodotorula* tem emergido como patógeno oportunista por sua capacidade de colonizar e infectar pacientes mais suscetíveis. Acredita-se que um fator agravante seja sua alta afinidade por plástico, possibilitando o seu crescimento em superfícies usadas no cotidiano, como cortinas de chuveiro e até escovas de dente. Além disso, alguns equipamentos médicos também são incluídos, como máquina de hemodiálise, por exemplo, comprovando a necessidade de identificação rápida do micro-organismo (PFALLER; DIEKEMA, 2004). A ilustração abaixo (Figura 10) demonstra a variabilidade de amostras, divididas por classes, nos 43 artigos selecionados para o presente estudo. Salienta-se que o estudo de Bellanger e colaboradores, de 2013, foi inserido na classe de amostras humanas e na classe de amostras ambientais, pois se tratava de “isolados clínicos e ambientais”.



**Figura 10 - Tipos de amostras**

## 5 CONCLUSÃO

Através dessa revisão da literatura, realizada com estudos entre os anos 2000 e 2020, foi possível concluir que a espectrometria de massas por MALDI-TOF está em ascensão. A técnica está disponível a mais de 30 anos, mas somente a partir de 2008 começou a ser aplicada em laboratórios clínicos. Essa ferramenta, que anteriormente estava sendo utilizada somente para espécies bacterianas, hoje em dia já está apta para aplicação em leveduras, mostrando um alto grau de especificidade, logo, confiabilidade dos seus resultados, pois dos 43 estudos selecionados, 37 conseguiram realizar a identificação da levedura *Rhodotorula*, correspondendo a 86%.

Um fator limitante é a falta de dados espectrais nos bancos de dados comerciais para que seja possível a comparação do obtido com o de referência. Dessa forma, há conflito de resultados, pois espécies diferentes apresentam proteínas iguais sendo detectadas, ou seja, são identificadas como o mesmo micro-organismo devido à falta de espectros de referência. É provável que parte dos 14% de estudos que não foram capazes de realizar a identificação da levedura de forma correta possuam como justificativa essa deficiência de espectros comparativos. Em contrapartida, acredita-se que com a ampliação do uso desse método de análise, as espectrotecas sejam alimentadas cada vez de forma mais rápida, possibilitando um desempenho melhor.

MALDI-TOF MS ainda não possui o potencial de identificar colônias mistas e estudos relataram que algumas das espécies mais problemáticas para identificação eram as de leveduras vermelhas, como *Rhodotorula* spp., *Rhodospidium* spp., *Sporobolomyces* spp., pois os pigmentos carotenoides da sua parede celular dificultam a extração das proteínas, porém novas ferramentas e tecnologias estão sendo estudadas para que esse tipo de complicação seja eliminado.

Podem haver algumas contestações sobre a necessidade de identificar *Rhodotorula* por MALDI, já que é uma levedura de coloração característica, facilmente reconhecida no meio de cultura. Entretanto, em estudos recentes, essa levedura não cresceu em meio de cultura de levedura cromogênico, pois o próprio meio mostrou um efeito inibitório significativo no crescimento das espécies devido a presença dos pigmentos carotenoides presentes na sua parede celular. Já o MALDI se mostrou capaz de identificar *Rhodotorula* em grande parte dos estudos selecionados, sendo capaz de trazer a sua identidade não só a nível de gênero, mas a nível de espécie em

81,1% dos estudos, ou seja, dos 37 artigos que fizeram a identificação, 30 foram a nível de espécie.

Com relação ao tempo de análise, MALDI-TOF MS se mostrou muito vantajoso, pois mesmo com a etapa de extração dos fungos, esse método ainda é mais rápido que os moleculares e muito mais rápido que realizar culturas e testes bioquímicos. Em cerca de 20 minutos é possível visualizar os resultados utilizando MALDI, enquanto são necessárias 48h, ou mais, com os outros métodos.

Como todas as espécies de *Rhodotorula* são resistentes a fluconazol e há relatos de suscetibilidade moderada a equinocandinas, esses medicamentos não devem ser considerados como terapia apropriada. O tratamento de escolha nesse caso é baseado em anfotericina B, seguida de flucitosina. Embora o MALDI seja utilizado principalmente como técnica para identificação rápida, sua contribuição para a escolha direcionada da terapia vem aumentando, pois a correta identificação permite a seleção de antifúngicos, ajudando na diminuição do tempo de internação hospitalar e custos.

Portanto, ainda é necessário que se amplie a espectroteca para que seja possível a obtenção de resultados mais confiáveis, com pontuações mais altas, mas a espectrometria de massas por MALDI-TOF está revolucionando as análises de micro-organismos pela rapidez, precisão, baixo custo por análise e promete ser o método que vai dominar os laboratórios, contribuindo para a escolha da terapia ideal para o paciente de forma rápida e ainda, evitando o uso incorreto de antifúngicos e prevenindo o aumento da resistência aos medicamentos.



## REFERÊNCIAS

- ALBERTYN, J.; POHL, C. H.; VILJOEN, B. C. Rhodotorula. In: **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. p. 291–295.
- ALMEIDA JÚNIOR, J. N. DE. **Padronização da espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de cepas de Trichosporon spp. de importância médica**. p. 33–37, 2014.
- ALVES, K. P. **Realidade e desafios de infecções emergentes por Rhodotorula spp. em pacientes hospitalizados**. 2019.
- ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of Bacteria using Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 219–225, 1975.
- ANNA, W. et al. Microorganisms colonising historical cardboard objects from the Auschwitz-Birkenau State Museum in Oświęcim, Poland and their disinfection with vaporised hydrogen peroxide (VHP). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 152, 2020.
- ARASTEHFAR, A. et al. YEAST PANEL multiplex PCR for identification of clinically important yeast species: stepwise diagnostic strategy, useful for developing countries. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n. 2, p. 112–119, 2019.
- BADER, O. et al. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 9, p. 1359–1365, 2011.
- BARBOSA, M. P. et al. Especialização em microbiologia clínica vantagens e desvantagens de MALDI-TOF MS. 2015.
- BELLANGER, A. P. et al. Inhibitory effect of chromogenic culture media on the growth of rhodotorula: Relevance to the diagnosis of rhodotorula spp. infections. **Apmis**, v. 121, n. 11, p. 1109–1117, 2013.
- BILLE, E. et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, Aspergillus spp. and positive blood cultures. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 11, p. 1117–1125, 2012.
- BORGES, F. M. et al. Fungal Diversity of Human Gut Microbiota Among Eutrophic, Overweight, and Obese Individuals Based on Aerobic Culture-Dependent Approach. **Current Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 726–735, 2018.
- BOUGNOUX, M. E. et al. Identification des levures par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2013, n. 450, p. 63–69, 2013.
- BRANDT, M. E.; LOCKHART, S. R. Recent taxonomic developments with candida

and other opportunistic yeasts. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 3, p. 170–177, 2012.

BUCHAN, B. W.; LEDEBOER, N. A. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1359–1366, 2013.

CASSAGNE, C. et al. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 371–377, 2013.

CASSAGNE, C. et al. Routine identification and mixed species detection in 6,192 clinical yeast isolates. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 256–265, 2016.

CHAGAS BARROS, R. G. et al. Enhancement of phenolic antioxidants production in submerged cultures of endophytic microorganisms isolated from achachairu (*Garcinia humilis*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*) and bacaba (*Oenocarpus bacaba*) fruits. **Lwt**, v. 111, p. 370–377, 2019.

CLARK, A. E. et al. Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 547–603, 2013.

COBO, F.; ZARAGOZA, Ó.; NAVARRO-MARÍ, J. M. *Rhodotorula dairenensis* fungemia in a patient with cancer. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 37, n. 2, p. 63–64, 2020.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 380–407, 2012.

DALLUGE, J. J.; BROWN, E. C.; CONNELL, L. B. Toward a rapid method for the study of biodiversity in cold environments: the characterization of psychrophilic yeasts by MALDI-TOF mass spectrometry. **Extremophiles**, v. 23, n. 4, p. 461–466, 2019.

DEAK, E. et al. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 81, n. 1, p. 27–33, 2015.

ELLIS, D. **Rhodotorula**. *Micologia*. The University of Adelaide. 2016. Disponível em: <<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/yeasts/rhodotorula/>>.

ENGLISH, S. E. et al. Laboratory and field studies on thin paint films. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 52, n. 4, p. 247–253, 2003.

FARIA, L. V. D. E. **Identificação por MALDI-TOF MS de isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* e avaliação do potencial biotecnológico na produção de biosurfactantes**. 2015.

- FRENKEL, M. et al. Fungi in sands of Mediterranean Sea beaches of Israel—Potential relevance to human health and well-being. **Mycoses**, v. 63, n. 11, p. 1255–1261, 2020.
- GALÁN, F. et al. Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 6, p. 372–378, 2015.
- GHANI, N. A. et al. Rhodotorula Mucilaginosa, a quorum quenching yeast exhibiting lactonase activity isolated from a tropical shoreline. **Sensors (Switzerland)**, v. 14, n. 4, p. 6463–6473, 2014.
- GHOSH, A. K. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 4, p. 372–378, 2015.
- GOURIET, F. et al. Evaluation of a new extraction protocol for yeast identification by mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 129, p. 61–65, 2016.
- GUO, R. et al. Earthworms as agents for ecotoxicity in roxarsone-contaminated soil ecosystem: a modeling study of ultrastructure and proteomics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 16, p. 12435–12449, 2015.
- HEATON, P.; PATEL, R. **Mass spectrometry applications in infectious disease and pathogens identification**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.
- HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry Mass spectrometry**. [s.l.: s.n.]. v. 1040. 2016.
- HORKÁ, M. et al. Preparative isoelectric focusing of microorganisms in cellulose-based separation medium and subsequent analysis by CIEF and MALDI-TOF MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 990, p. 185–193, 2017.
- HUYBEN, D. et al. Dietary live yeast and increased water temperature influence the gut microbiota of rainbow trout. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 6, p. 1377–1392, 2018.
- IDER, S. et al. Impact of seasonality and environmental conditions on yeast diversity from camel's milk collected in Algeria. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 3, p. 399–407, 2019.
- IDRIS, N. F. B. et al. Mixed Infection of Toe Nail Caused by Trichosporon asahii and Rhodotorula mucilaginosa. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 373–376, 2020.
- ILYAS, S. et al. Proteomic analysis of an environmental isolate of Rhodotorula mucilaginosa after arsenic and cadmium challenge: Identification of a protein expression signature for heavy metal exposure. **Journal of Proteomics**, v. 141, p. 47–56, 2016.
- IRAZUSTA, V. et al. Proteomic study of the yeast Rhodotorula mucilaginosa RCL-11

under copper stress. **BioMetals**, v. 25, n. 3, p. 517–527, 2012.

JAMAL, W. Y. et al. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 167–170, 2014.

KAČÁNIOVÁ, M. et al. Bacteria and yeasts isolated from different grape varieties. **Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences**, v. 12, n. 1, p. 108–115, 2018.

KAN, G. et al. Copper stress response in yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AN5 isolated from sea ice, Antarctic. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 3, p. 1–18, 2019.

KOK, J. et al. Current status of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. **Pathology**, v. 45, n. 1, p. 4–17, 2013.

KRAKOVÁ, L. et al. Comparison of methods for identification of microbial communities in book collections: Culture-dependent (sequencing and MALDI-TOF MS) and culture-independent (Illumina MiSeq). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 131, p. 51–59, 2018.

KUMAR, A. et al. Characterization of smallest active monomeric penicillin V acylase from new source: A yeast, *Rhodotorula aurantiaca* (NCIM 3425). **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 961–967, 2008.

LOHMANN, C. et al. Comparison between the biflex III-biotyper and the axima-saramis systems for yeast identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1231–1236, 2013.

MADEIRA, G.; ALMEIDA, D. D. E. **Rhodotorula spp. isoladas de hemocultura no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: características clínicas e microbiológicas.** 2005.

MANCINI, N. et al. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass Spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2453–2457, 2013.

MANJI, R. et al. Multi-center evaluation of the VITEK® MS system for mass spectrometric identification of non-Enterobacteriaceae Gram-negative bacilli. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 3, p. 337–346, 2014.

MAO, D. BIN et al. Novel biotransformation of betulin to produce betulone by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, n. 6, p. 825–829, 2012.

MARTINS, P. M. M. et al. Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical

compounds and the quality of fermented coffees. **Food Research International**, v. 129, 2020.

MAZARI, W. et al. Risk assessment for the spread of *Candida* sp. in dental chair unit waterlines using molecular techniques. **International Dental Journal**, v. 68, n. 6, p. 386–392, 2018.

MIGUEL, M. G. DA C. P. et al. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 362–369, 2017.

MILLER, M. B. Molecular diagnosis of infectious diseases. **North Carolina medical journal**, v. 68, n. 2, p. 115–118, 2007.

MOUSAVI, F. et al. Immunoproteomics of tree of heaven (*Ailanthus altissima*) pollen allergens. **Journal of Proteomics**, v. 154, p. 94–101, 2017.

NONI, M. et al. Rare invasive yeast infections in greek neonates and children, a retrospective 12-year study. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–13, 2020.

PARRA-GIRALDO, C. M. et al. First report of sporadic cases of *Candida auris* in Colombia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 69, p. 63–67, 2018.

PAVLOVIC, M. et al. MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106, p. 123–128, 2014.

PENCE, M. A. et al. Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 10, p. 1703–1712, 2014.

PERUZY, M. F. et al. Assessment of microbial communities on freshly killed wild boar meat by MALDI-TOF MS and 16S rRNA amplicon sequencing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, p. 51–60, 2019.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 4419–4431, 2004.

PINTO, A. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

PRAKASH, A. et al. Evidence of genotypic diversity among *Candida auris* isolates by multilocus sequence typing, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and amplified fragment length polymorphism. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 3, 2016.

PRIGITANO, A. et al. Evolution of fungemia in an Italian region. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, 2020.

QIAN, J. et al. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 3, p. 439–449, 2008.

QUINTILLA, R. et al. MALDI-TOF MS as a tool to identify foodborne yeasts and yeast-like fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 109–118, 2018.

RELLOSO, M. S. et al. Estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico Onychomycosis: Multicentre epidemiological, clinical and mycological study. **Rev Iberoam Micol**, v. 29, n. 3, p. 157–163, 2012.

RELLOSO, M. S. et al. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 103–107, 2015.

RESENDE, L. V. et al. Microbial community and physicochemical dynamics during the production of 'Chicha', a traditional beverage of Indigenous people of Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 1–11, 2018.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, 2014.

RUIZ DE ALEGRÍA PUIG, C. et al. Evaluation of the Vitek-MS™ system in the identification of *Candida* isolates from bloodstream infections. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 3, p. 130–133, 2018.

SCAPATICCI, M. et al. Phenotypic typing and epidemiological survey of antifungal resistance of *Candida* species detected in clinical samples of Italian patients in a 17 months' period. **Germs**, v. 8, n. 2, p. 58–66, 2018.

SENG, P. et al. MALDI-TOF-MS applications in clinical microbiology. **Future microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1733–54, 2010.

SEYFARTH, F. et al. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 276–280, 2012.

SILVA, F. A. et al. Antimicrobial Resistance Profile and Biofilm Production of Microorganisms Isolated from Oropharynx of *Rupornis magnirostris* and *Caracara plancus*. **Veterinary Medicine International**, 2020.

TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151–153, 1988.

TARTOR, Y. et al. Yeast species associated with diseased fish: Occurrence, identification, experimental challenges and antifungal susceptibility testing. **Aquaculture**, v. 488, p. 134–144, 2018.

- THEILL, L. et al. Single-tube classical PCR for *Candida auris* and *Candida haemulonii* identification. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 35, n. 2, p. 110–112, 2018.
- VAN VEEN, S. Q.; CLAAS, E. C. J.; KUIJPER, E. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 900–907, 2010.
- VANNELLI, T. et al. Functional expression in *Escherichia coli* of the tyrosine-inducible tyrosine ammonia-lyase enzyme from yeast *Trichosporon cutaneum* for production of p-hydroxycinnamic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 413–422, 2007.
- VERDUGO, F. J. et al. Peritonitis fúngica por. v. 33, n. 2, p. 222–225, 2016.
- WANG, C. et al. Proteomic analysis of a high aluminum tolerant yeast *Rhodotorula taiwanensis* RS1 in response to aluminum stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 10, p. 1969–1975, 2013.
- WIRTH, F. Infecção disseminada por *Rhodotorula* em um modelo experimental em ratos (Infection disseminated by *Rhodotorula* in an experimental model in rats). **Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2011.
- XIAO, M. et al. Five-year China hospital invasive fungal surveillance net (CHIF-NET) study of invasive fungal infections caused by noncandidal yeasts: Species distribution and azole susceptibility. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1659–1667, 2018.
- YANG, F. et al. Purification and characterization of a  $\beta$ -1,3-glucomannanase expressed in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 2, p. 223–228, 2011.
- YONETANI, S. et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 52, p. 37–42, 2016.
- ZHANG, S. X. et al. Multicenter evaluation of a PCR-based digital microfluidics and electrochemical detection system for the rapid identification of 15 fungal pathogens directly from positive blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1–9, 2020.

## ANEXO A – TABELA DE DADOS DOS ESTUDOS SELECIONADOS

ANO	REFERÊNCIA	TIPO DE AMOSTRA	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO DE <i>Rhodotorula</i>	NÍVEL DE IDENTIFICAÇÃO	PONTUAÇÃO	ESPÉCIE
2008	QIAN et al.	Micro-organismo	Outros	Sim	Gênero	NI	–
2011	BADER et al.	Micro-organismo	2 (direto na placa) e 3	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2012	BILLE et al.	Micro-organismo	2	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2012	MAO et al.	Solo	Outros	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2012	SEYFARTH et al.	Micro-organismo	1	Sim	Gênero	NI	–
2013	BELLANGER et al.	Isolados clínicos e ambientais	NI	Sim	Espécie	1,8 - 2,1	<i>R. mucilaginosa</i> e <i>R. glutinis</i>
2013	LOHMANN et al.	Superfícies e fluidos humanos	3	Sim	Espécie	> 1,7	<i>R. mucilaginosa</i>
2013	WANG et al.	Micro-organismo	Outros	Sim	Espécie	NI	<i>R. taiwanensis</i>
2014	JAMAL et al.	Superfícies e fluidos humanos	3	Não	–	–	–
2014	RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al.	Hemocultura	3	Não	–	–	–
2014	PAVLOVIC et al.	Alimentos	3	Sim	Gênero	–	–
2014	GHANI et al.	Água	NI	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2015	GALÁN et al.	Superfícies e fluidos humanos	2 e 3	Não	–	–	–
2015	RELLOSO et al.	Superfícies e fluidos humanos	3	Sim	Espécie	> 2.0	<i>R. mucilaginosa</i>
2015	DEAK et al.	Micro-organismo	2 (direto na placa e em tubo)	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2015	GHOSH et al.	Micro-organismo	1, 2 e 3	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2016	LYAS et al.	Efluente industrial	3	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2016	GOURIET et al.	Superfícies e fluidos humanos	Outros	Não	–	–	–
2016	YONETANI et al.	Hemocultura	Outros	Não	–	–	–
2017	MIGUEL et al.	Cacau	3	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2017	HORKÁ et al.	Micro-organismo	NI	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2017	MOUSAVI et al.	Soro	Outros	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2018	XIAO et al.	Superfícies e fluidos humanos	NI	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2018	SCAPATICCI et al.	Superfícies e fluidos humanos	3	Sim	Espécie	> 1,7	<i>R. mucilaginosa</i>
2018	BORGES et al.	Fezes	2	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2018	MAZARI et al.	Água	3	Sim	Gênero	NI	–
2018	RESENDE et al.	Bebida chinesa	3	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2018	HUYBEN et al.	Peixe	3	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i> e <i>R. graminis</i>
2018	KRAKOVÁ et al.	Papel	3	Sim	Espécie	2,000 - 2,299	<i>R. mucilaginosa</i>
2018	TARTOR et al.	Peixe	2	Sim	Gênero	NI	–
2018	QUINTILLA et al.	Alimentos	3	Sim	Gênero	< 1.7	–
2018	RUIZ DE ALEGRÍA PUIG et al.	Hemocultura	2	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2019	PRIGITANO et al.	Hemocultura	NI	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2019	DALLUGE et al.	Gelo do solo	2	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2019	PERUZY et al.	Carne de javali	3	Sim	Gênero	NI	–
2019	CHAGAS BARROS et al.	Laticínios, carne e peixe	3	Sim	Espécie	2	<i>R. glutinis</i>
2020	IDRIS et al.	Unha	NI	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2020	NONI et al.	Sangue	NI	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2020	COBO et al.	Sangue	NI	Não	–	–	–
2020	FRENKEL et al.	Areia de praia	NI	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i> e <i>R. glutinis</i>
2020	SILVA et al.	Orofaringe de gavião	2 (direto na placa)	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i> e <i>R. glutinis</i>
2020	MARTINS et al.	Grãos de café	2	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i>
2020	ANNA et al.	Papel	2 (direto na placa)	Sim	Espécie	NI	<i>R. mucilaginosa</i> e <i>R. glutinis</i>