

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS

MESTRADO PROFISSIONAL EM PESQUISA CLÍNICA

GABRIELA SOUZA DE CASTRO

**PADRONIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI TOF MS PARA A  
IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE FUNGOS LEVEDURIFORMES A PARTIR DE  
HEMOCULTURAS POSITIVAS**

Rio de Janeiro

2021

GABRIELA SOUZA DE CASTRO

**PADRONIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI TOF MS PARA A  
IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE FUNGOS LEVEDURIFORMES A PARTIR DE  
HEMOCULTURAS POSITIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica.

Orientadoras:

Prof. Dra. Simone da Costa Cruz Silva

Prof. Dra. Cassiana da Costa Ferreira  
Leite

Rio de Janeiro

2021

Castro, Gabriela Souza de.

Padronização da espectrometria de massa MALDI TOF MS para a identificação rápida de fungos leveduriformes a partir de hemoculturas positivas / Gabriela Souza de Castro. - Rio de Janeiro, 2021.

91 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2021.

Orientadora: Simone da Costa Cruz Silva.

Co-orientadora: Cassiana da Costa Ferreira Leite.

Bibliografia: f. 67-80

1. Infecção de corrente sanguínea. 2. Diagnóstico. 3. MALDI-TOF MS. 4. Espectrometria de massa. 5. Fungos leveduriformes. I. Título.

Dedico este trabalho a minha amada mãe, Márcia Nascimento,  
principal incentivadora e apoiadora de todo o progresso da minha vida acadêmica e  
profissional.

Ao meu esposo, Rodrigo Fernandes,  
por todo o incentivo e apoio durante a elaboração da dissertação, sempre com muito  
companheirismo, paciência e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho só foi possível com a colaboração de diversas pessoas, sendo assim, sem alguma ordem particular, expresso meus agradecimentos:

À Professora Doutora Simone da Costa Cruz Silva, pelo acolhimento desde o início do Programa do Mestrado Profissional, como orientadora sempre disponível e solícita para ajudar nos momentos cruciais da elaboração da dissertação com suas considerações e sugestões primordiais.

À Professora Doutora Cassiana da Costa Ferreira Leite, uma das principais incentivadoras deste trabalho, a quem devo a competência e carinho com os quais me orientou. Sempre disponível para discussões em detrimento da melhoria da dissertação, que muito contribuiu com suas considerações e sugestões.

Ao Estatístico Julio Silva, da Plataforma de Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, por todo o auxílio no tratamento estatístico dos dados do estudo. Sempre disponível e solícito para dúvidas e esclarecimentos.

Ao Gerente de Operações de Microbiologia Clínica – Rede D’Or, Msc Pedro F. Del Peloso, um dos incentivadores para realização do curso de Mestrado Profissional, a quem dedico admiração profissional e pessoal, e gratidão por todo apoio nesta jornada.

À equipe de Microbiologia do Laboratório Richet Medicina e Diagnóstico, em especial aqueles vinculados diretamente a rotina de trabalho, a qual precisei me ausentar durante o período das aulas, por toda a dedicação e companheirismo demonstrados, muitas vezes ultrapassando os limites da obrigação profissional.

Ao meu esposo, Rodrigo Fernandes, por todo o apoio transmitido ao longo do curso de Mestrado Profissional, com paciência e companheirismo, compartilhando as angústias e alegrias durante momentos do estudo. Sempre solícito para sugestões e contribuições.

À minha família, por sempre me incentivar no crescimento profissional, e durante muitos momentos soube compreender todas as minhas ausências e faltas de dedicação.

CASTRO, G.S. PADRONIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI TOF MS PARA A IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE FUNGOS LEVEDURIFORMES A PARTIR DE HEMOCULTURAS POSITIVAS. Rio de Janeiro, 2021. 91 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

## RESUMO

As infecções de corrente sanguínea causadas por fungos são de difícil diagnóstico e estão associadas à elevada morbidade e mortalidade constituindo um grave problema de saúde pública. A hemocultura é o padrão de referência para o diagnóstico. A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI TOF - MS) é uma técnica promissora na identificação de microrganismos diretamente do caldo de hemocultura a partir da detecção de positividade, sendo possível conhecer o patógeno infeccioso em aproximadamente uma hora. O estudo teve como objetivo avaliar a aplicabilidade do protocolo de diagnóstico rápido por MALDI TOF-MS em infecções de corrente sanguínea por fungos leveduriformes. Um total de 232 hemoculturas foram avaliadas através de uma análise retrospectiva de banco de dados, oriundas de 95 pacientes ambulatoriais e hospitalares da Rede D'Or São Luiz entre os anos de 2012 e 2018. Aliquotas das hemoculturas foram submetidas à técnica do protocolo rápido, consistindo em processos de centrifugação e lavagem de sedimento, e em concomitância subcultivadas em meios de cultura. Para determinação da identificação, os espectros testes foram comparados às cepas de referência, gerando diferentes pontuações de escore. *C. parapsilosis* foi a espécie predominante no estudo. 38,7% dos isolados foram identificados com pontuações de escore  $\geq 1.7$  pelo protocolo rápido e 100 por cento pelo subcultivo. O valor da mediana do escore foi de 1.6 para o protocolo rápido e 2.0 para o subcultivo. *C. tropicalis* obteve a maior proporção de acerto no protocolo rápido. No ano de 2016 foram observadas as maiores pontuações de escore para o protocolo rápido, com cerca de 70 por cento. Em conclusão, a análise retrospectiva da aplicação do protocolo rápido demonstrou a identificação direta do patógeno clínico em 38,7% dos casos de fungemia, sendo estes notificados em 40 minutos após a positividade da hemocultura. A vantagem da identificação precoce evidenciou a otimização do diagnóstico clínico em pelo menos 24 horas.

**Palavras-chave:** Infecções de Corrente Sanguínea, Diagnóstico, MALDI-TOF MS, Fungos leveduriformes

CASTRO, G.S. STANDARDIZATION OF MASS SPECTROMETRY MALDI-TOF MS FOR RAPID DIAGNOSIS OF YEAST FUNGUS FROM POSITIVE HEMOCULTURES. Rio de Janeiro, 2021. 91 f. Dissertation (Professional Master in Clinical Research in Infectious Diseases) - National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

## ABSTRACT

Bloodstream infections caused by fungi are difficult to diagnose and are associated with high morbidity and mortality, constituting a serious public health problem. Blood culture is the reference standard for diagnosis. Matrix-assisted time-of-flight laser desorption and ionization mass spectrometry (MALDI TOF - MS) is a promising technique in the identification of microorganisms directly from the blood culture broth from the detection of positivity, making it possible to know the infectious pathogen in approximately one hour. The study aimed to assess the applicability of the rapid diagnosis protocol by MALDI TOF-MS in bloodstream infections caused by yeast fungi. A total of 232 blood cultures were evaluated through a retrospective database analysis, from 95 outpatients and hospitals of Rede D'Or São Luiz between the years 2012 and 2018. Blood culture aliquots were submitted to the rapid protocol technique, consisting of centrifugation and sediment washing processes, and concomitance subcultured in culture media. To determine the identification, the test spectra were compared to the reference strains, generating different score values. *C. parapsilosis* was the predominant species in the study. 38.7% of the isolates were identified with a score  $\geq 1.7$  by the rapid protocol and 100 percent by subculture. The median value of the score was 1.6 for the rapid protocol and 2.0 for the subculture. *C. tropicalis* obtained the highest proportion of correct answers in the rapid protocol. In 2016, the highest score values for the rapid protocol were observed, with about 70 percent. In conclusion, the retrospective analysis of the application of the rapid protocol demonstrated direct identification of the clinical pathogen in 38.7% of fungemia cases, which were notified within 40 minutes of positive blood culture. The advantage of early identification showed the optimization of clinical diagnosis in at least 24 hours.

Keyword: Bloodstream Infections, Diagnosis, MALDI-TOF MS, Yeast fungus

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS E TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinais de crescimento em frascos de hemocultura. (A) Formação de filme na superfície; (B) Produção de gás; (C) Turbidez (garrafa esquerda: sem crescimento; garrafa direita: turbidez).....	30
Figura 2 - Representação esquemática das etapas de processamentos das hemoculturas .....	31
Figura 3 - Representação esquemática das etapas de processamento das hemoculturas positivas por metodologia automatizada. ....	33
Figura 4 - Princípios básicos da técnica de MALDI-TOF MS.....	34
Figura 5 - Representação esquemática das etapas de identificação de microrganismos através da metodologia de MALDI-TOF MS .....	35
Figura 6 - Fluxo de trabalho de identificação direta em hemoculturas positivas usando a técnica de MALDI-TOF MS. ....	43

### LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição de indicações clínicas registradas nos prontuários eletrônicos. ....	46
Gráfico 2 - Histograma de frequência dos escores por tipo de metodologia.....	50
Gráfico 3 - Boxplot dos escores por tipo de metodologia. ....	51
Gráfico 4 - Proporção de acertos por tipo de metodologia.....	52
Gráfico 5 - Proporção de acertos do protocolo rápido por isolamento.....	53
Gráfico 6 - Proporção de pontuação de escore tipo de metodologia e ano. ....	54
Gráfico 7 - Valores médios dos escores por tipo de ano e metodologia. ....	55
Gráfico 8 - Boxplot dos valores de escores do protocolo rápido por histórico de pacientes....	56

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes e unidades de atendimento. ....	45
Tabela 2 - Estratificação do perfil fenotípico das hemoculturas por ano .....	48
Tabela 3 - Frequência Absoluta e Relativa do Perfil Fenotípico das Hemoculturas por Unidade de Atendimento. ....	49



## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCD	– Anfotericina em Dispersão Coloidal
ABLC	– Anfotericina em Complexo Lipídico
AIDS	– Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome)
AMIB	– Associação de Medicina Intensiva Brasileira
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	– Infusão-Cérebro-Coração (Brain-Heart-Infusion)
BTS	– Padrão de Teste Bacteriano (Bacterial Test Standard)
CCIH	– Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CECIH	– Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar
COVID-19	– Coronavirus Disease 2019
CGD	– Doença Granulomatosa Crônica
CHCA	– Ácido $\alpha$ -Ciano-4-Hidroxicinâmico
CMBCS	– Sistema de Monitoramento Contínuo de Hemocultura (Continuous Monitoring Blood Culture System)
CMCIH	– Coordenação Municipal de Controle de Infecção Hospitalar
CPIH	– Controle e Prevenção de Infecção Hospitalar
CVC	– Cateter Venoso Central
d-AmB	– Anfotericina-B deoxicolato
DPOC	– Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
HIV	– Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus)

HSCT – Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas (Hematopoietic Stem Cell Transplantation)

IAV – Infecção de Acesso Vascular

ICS – Infecções da Corrente Sanguínea

IH – Infecção Hospitalar

IHI – Instituto de Melhoria da Saúde (Institute for Healthcare Improvement)

IL-18 – Interleucina 18

IL-6 – Interleucina 6

IPCS – Infecção Primária da Corrente Sanguínea

IPCS-CVC – Infecção Primária da Corrente Sanguínea – Cateter Venoso Central

IRAS – Infecções Relacionas à Assistência à Saúde

L-AmB – Anfotericina Lipossomal

MALDI-TOF – Ionização e Dessorção a Laser assistida por Matriz - Tempo de Voo (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight)

MPAS – Ministério da Previdência e Assistência Social

MSP – Perfil de Espectro Principal (Main Spectra Profile)

NPT – Nutrição Parenteral Total

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Proteína C Reativa

PROGRESS – Promovendo a Excelência em Pesquisa Global em Sepse Grave (Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis)

RPM – Rotação por Minuto

SARS-CoV-2 – Coronavirus 2 da Síndrome Respiratória Aguda (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)

- SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
- SPREAD – Banco de Dados de Avaliação de Prevalência de Sepsis (Sepsis Prevalence Assessment Database)
- SUS – Sistema Único de Saúde
- TAT – Tempo de Resposta (Turnaround Time)
- TSB – Caldo Soja Trypticaseína (Tryptic Soy Broth)
- USI – Unidade Semi Intensiva
- UTI – Unidade de Terapia Intensiva
- UTIP – Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	– Beta
$^{\circ}\text{C}$	– Grau Celsius
$\text{CO}_2$	– Gás Carbônico
$>$	– Maior
$<$	– Menor
$\geq$	– Menor ou Igual
$<$	– Menor
$\%$	– Porcentagem
$n^{\circ}$	– Número
mL	– Mililitro
mm	– Milímetro
m/z	– Relação Massa/Carga
$\mu\text{l}$	– Microlitro
Da	– Dalton (Medida de Massa Atômica)
Hz	– Hertz (Medida de Frequência)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
1.1	INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE - IRAS .....	15
1.2	SEPSE .....	17
1.3	INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA .....	18
1.4	INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA POR FUNGOS .....	20
1.4.1	Fungos Leveduriformes .....	21
1.4.2	Fungos Filamentosos .....	25
1.5	TERAPIA ANTIFÚNGICA .....	26
1.6	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....	28
1.6.1	Hemocultura por Métodos Tradicionais (Convencional) .....	30
1.6.2	Hemocultura Automatizada .....	32
1.7	IONIZAÇÃO E DESSORÇÃO DE MATRIZ ASSISTIDA POR LASER – TEMPO DE VOO / MALDI-TOF MS .....	33
2	JUSTIFICATIVA .....	37
3	OBJETIVOS .....	38
3.1	OBJETIVO GERAL .....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
4	MÉTODO .....	39
4.1	DESENHO DO ESTUDO .....	39
4.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	39
4.2.1	Critérios de Inclusão .....	39
4.2.2	Critérios de Exclusão .....	39
4.2.3	Aspectos Éticos .....	40
4.3	PROCEDIMENTOS DO ESTUDO .....	40
4.3.1	Pacientes e Hemoculturas .....	40
4.3.2	MALDI-TOF MS após Isolamento Fúngico em Meio de Cultura .....	41
4.3.3	MALDI-TOF MS Direto do Frasco de Hemocultura Positiva para Levedura .....	41
4.3.4	Análise MALDI-TOF MS .....	42
4.3.5	Bancos de Dados .....	44
4.3.6	Análise Estatística .....	44
5	RESULTADOS .....	45
5.1	POPULAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS .....	45
5.2	DIAGNÓSTICO DE ATENDIMENTO E /OU INTERNAÇÃO .....	45
5.3	HEMOCULTURAS .....	46
5.3.1	Estratificação de Identificação de Espécies por Ano de Ocorrência .....	47
5.3.2	Identificação das Espécies das Hemoculturas por Unidade de Atendimento .....	48
5.4	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE IDENTIFICAÇÃO ENTRE O PROTOCOLO RÁPIDO E O SUBCULTIVO MICROBIOLÓGICO .....	49

5.4.1	Frequência de Escores de MALDI-TOF MS por Tipo de Metodologia .....	49
5.4.2	Pontuação dos Escores de MALDI-TOF MS por Tipo de Metodologia.....	50
5.4.3	Proporção de Acertos por Tipo de Metodologia .....	51
5.4.4	Proporção de Acertos do Protocolo Rápido .....	52
5.4.5	Proporção de Pontuação de Escore por Tipo de Metodologia e Ano.....	53
5.4.6	Média de Escores por Tipo de Metodologia e Ano.....	54
5.5	IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO RÁPIDO E CORRELAÇÃO COM HISTÓRICO CLÍNICO .....	55
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÃO .....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
	APÊNDICES .....	79
	APÊNDICE A - TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE.....	79
	APÊNDICE B – TERMO DE ANUÊNCIA INSTITUCIONAL.....	80
	APÊNDICE C - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP.....	82
	APÊNDICE D - CARTILHA DE TRABALHO .....	89
	ANEXOS .....	90
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....	90

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE - IRAS

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde – IRAS – são classificadas como eventos pontuais ou sistêmicos resultantes da presença de um microrganismo adquirido durante procedimento hospitalar ou ambulatorial, que não estava presente ou em período de incubação durante a admissão do paciente (SILVA; OLIVEIRA, 2018). São determinadas, de acordo com a Portaria nº 2.616 do Ministério da Saúde do Brasil, como eventos infecciosos que surgem após 72 horas de internação, ou anteriormente, devendo ser relacionada a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos realizados no paciente, podendo ser identificada também após a alta hospitalar ou infecções ocupacionais em trabalhadores da saúde (GOMES et al., 2020).

Os agentes patogênicos associados às IRAS podem ser de origem endógena, em geral aqueles que pertencem à microbiota normal, ou exógena, como por exemplo possíveis fontes de infecção associadas a manipulação dos pacientes, visitantes, equipamentos de assistência à saúde e dispositivos médicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

As IRAS representam uma temática significativa na segurança do paciente, acometendo milhares de indivíduos em escala mundial, sendo uma das principais causas de complicações e óbitos em pacientes hospitalizados (FARIAS; GAMA, 2020). Impactam diretamente no tempo de internação em unidades de terapia intensiva, na elevação de custos relacionados à assistência médica e no aumento da morbidade e mortalidade nos serviços de saúde (ANVISA, 2017a).

O elevado risco de mortalidade relacionado às IRAS está diretamente associado a fatores como doença de base do paciente, ao sítio de infecção, procedimentos invasivos para fins de diagnóstico e terapêutico, a adequação à terapia e ao perfil de sensibilidade dos microrganismos frente aos antimicrobianos (SOUZA et al., 2015). Em pacientes pediátricos e idosos são consideradas um importante agravo à saúde devido a fragilidade imunológica relacionada à idade, ampliando a mortalidade e morbidade e representando um fator limitante à vida (LEONCIO et al., 2019).

As medidas de prevenção de IRAS devem ser adotadas pelas instituições de assistência à saúde de âmbito hospitalar, domiciliar e assistência a pacientes crônicos (CDC, DISEASE CONTROL AND PREVENTION., 2016). A adoção de programas de controle e higiene

contínuos pode prevenir cerca de 20 a 30 por cento das IRAS (ECDC, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL., 2016).

No Brasil, a determinação pelo controle e prevenção das IRAS, inicialmente denominada infecção hospitalar (IH), teve início em meados da década de 1970, através do Ministério da Previdência e Assistência Social (MPAS) com o estabelecimento dos Conselhos de Controle e Prevenção de Infecção Hospitalar (CPIH). Na década de 1980, houve crescimento exponencial das atuações governamentais nas práticas eficientes de controle e prevenção com a publicação de portarias e decretos. Em 1999, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, objetivando a coordenação nacional de controle e prevenção de infecções (OLIVEIRA; SILVA; LACERDA, 2016).

A Anvisa é responsável pela definição e fiscalização do cumprimento de normas, critérios e os métodos para o controle e prevenção das IRAS no Brasil, através da utilização de parâmetros relacionados à vigilância epidemiológica a eventos adversos evitáveis. Estas ações possibilitam a identificação do perfil endêmico das instituições de saúde, assim como o monitoramento de situações infecciosas de risco e o estabelecimento de um sistema de indicadores nacionais (ANVISA, 2017).

De acordo com a Portaria GM/MS nº 2.616/1998, a vigilância epidemiológica das IRAS é realizada através de monitoramento ativo, sistemático e contínuo sendo um dos pontos centrais de atuação das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH). Através desse monitoramento é possível conhecer a realidade epidemiológica da instituição de saúde, identificar padrões de resistência microbiana, além de identificar surtos antes de sua propagação (ANVISA, 2017b).

A vigilância epidemiológica objetiva principalmente a promoção de informações que possam ser utilizadas pelas instituições de saúde para melhoria contínua de processos, estabelecendo planos de prevenção e controle de infecções (ANVISA, 2017a). O trabalho em conjunto das Agências de Saúde Pública de âmbito Federal, como a ANVISA, Estadual (Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar – CECIH), Municipal (Coordenação Municipal de Controle de Infecção Hospitalar – CMCIH) e instituições de saúde (Comissão de Controle de Infecção Hospitalar – CCIH) é primordial para implantação e expansão de um programa de vigilância efetivo e prevenção das IRAS (ANVISA, 2016).

Associado ao trabalho de vigilância epidemiológica, outras estratégias são utilizadas como medidas de prevenção e controle das IRAS, conhecidas como *bundles*, sendo caracterizadas pela introdução de melhores práticas baseadas em evidências, configurando uma



série de propostas de melhorias na execução simultânea de diversos procedimentos relacionados à assistência à saúde (JARDIM et al., 2013). O termo *bundles*, contextualizado como “pacotes”, foi desenvolvido pelo *Institute for Healthcare Improvement* (IHI, EUA) visando a melhoria dos processos de cuidados intensivos, objetivando altos níveis de confiabilidade nos processos de assistência à saúde. Essas práticas consistem na melhoria do trabalho em grupo e comunicação com equipes multidisciplinares, melhoria de infraestrutura, além de medição contínua e vigilância de processos, criando condições necessárias para uma assistência segura (RESAR R et al., 2012).

## 1.2 SEPSE

A Sepsé é caracterizada por um conjunto de manifestações clínicas graves, em decorrência de resposta imunológica frente a um agente infeccioso podendo ter como consequência disfunções de órgãos vitais, sendo a principal causa de morte por infecção, configurada por fatores patogênicos e fatores relacionados ao hospedeiro (SINGER et al., 2016). A Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica – SIRS pode estar presente ou não em um quadro clínico de sepsé, mas seu diagnóstico pode ser utilizado para identificação de pacientes com infecção, ou ainda aqueles que apresentam risco de sepsé ou choque séptico (ILAS, 2018).

O diagnóstico da sepsé é proposto pela correlação entre os achados clínicos e laboratoriais inespecíficos, e posteriormente pelo isolamento do agente etiológico em diferentes amostras clínicas. Exames de imagem também estão associados ao diagnóstico, e são utilizados para acompanhamento da evolução do tratamento. Marcadores biológicos podem estar associados à clínica, como proteína C reativa (PCR), procalcitonina, interleucina 6 (IL-6) e interleucina 18 (IL-18), estando associadas ao diagnóstico e classificação de gravidade da sepsé (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

A cada ano, 18 milhões de pessoas são acometidas no mundo pela sepsé, representando até 50 por cento do índice de mortalidade, ou seja, o número de mortes registradas. Atualmente é a principal causa de mortalidade nas Unidades de Terapia Intensiva – UTI. A média mundial de letalidade está em torno de 40 por cento, ou seja, a proporção entre o número de mortes e o número total de doentes acometidos. Entretanto no Brasil este índice pode atingir até 65 por cento dos casos (ILAS, 2018; PILECKY et al., 2019).

No cenário brasileiro, a incidência anual de sepse estimada é de 600.000 mil casos por ano, sendo a taxa de mortalidade de 55,7% de acordo com o estudo SPREAD – *Sepsis Prevalence Assessment Database* (Banco de Dados de Avaliação de Prevalência de Sepse), e de 57,4% de acordo com o estudo PROGRESS – *Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis* (Promovendo a Excelência em Pesquisa Global em Sepse Grave). A sepse adquirida em ambiente hospitalar está associada a desfechos piores, incluindo maior mortalidade e tempo de internação, quando comparado a sepse adquirida na comunidade (WESTPHAL et al., 2019).

A ocorrência de internações no Sistema Único de Saúde – SUS – relacionadas à sepse aumentou 50,5% entre o período de 2006 a 2015. A taxa de mortalidade por sepse foi de 46,3%. Este índice em hospitais públicos chega a 55,5% sendo superior às instituições privadas, onde essa estatística é de 37 por cento. O diagnóstico e tratamento tardio da sepse e a falta de recursos nos hospitais públicos são fatores que contribuem para essa diferença (QUINTANO NEIRA; HAMACHER; JAPIASSÚ, 2018).

### 1.3 INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA

As Infecções de Corrente Sanguínea (ICS) são consideradas como uma das principais IRAS que acometem indivíduos hospitalizados, sendo esta condição diretamente relacionada ao aumento de morbidade e mortalidade, e ainda na elevação de custos na assistência médica no Brasil (ANVISA, 2010).

São frequentemente relacionadas à assistência à saúde, acometendo pacientes com quadro clínico crítico, classificada como a terceira infecção mais comum em unidades de terapia intensiva. Em nível mundial, representam 15,1% do total de infecções em UTI, e no Brasil, 10,1% (BRIXNER et al., 2019).

As ICS são determinadas pela positividade de hemoculturas oriundas de pacientes com manifestações sistêmicas de infecção, podendo ter origem secundária já evidenciada ou ainda primária quando a fonte infecciosa não é conhecida. Refletem 40 por cento dos casos de sepse e choque séptico adquiridos na comunidade e no âmbito hospitalar e cerca de 20 por cento dos casos adquiridos na UTI (TIMSIT et al., 2020) .

Quando originadas de focos nosocomiais podem estar associadas ao uso de cateteres intravasculares, infecções do trato urinário, infecções respiratórias, infecções gastrointestinais, feridas, além do uso de terapia medicamentosa prolongada (MATHUR et al., 2014). Na UTI,

fatores como estado crítico de admissão, permanência prolongada, imunossupressão, eventos cirúrgicos e utilização de dispositivos ou procedimentos invasivos são os principais fatores de risco associados as ICS (PROWLE et al., 2011).

Clinicamente, as ICS são divididas em Infecção Primária da Corrente Sanguínea (IPCS), apresentando comprometimento sistêmico, bacteremia ou sepse, sem foco primário identificável, ou ainda infecção relacionada ao acesso vascular (IAV), ocorrendo no sítio de inserção do cateter. As apresentações clínicas e medidas terapêuticas são distintas, sendo de extrema importância a avaliação de sinais infecciosos, presença de hemocultura positiva e envolvimento de dispositivos vasculares (ANVISA, 2009).

Na população neonatal, as IPCS representam um elevado risco de morbidade e mortalidade. Estão associadas à inserção e manutenção de cateteres venosos centrais (CVC), sendo uma das complicações mais frequentes para estes pacientes no meio hospitalar. A introdução precoce de alimentação enteral, amamentação, tempo de internação reduzido e boas práticas de manejo clínico são primordiais para a redução de incidência de infecção (SILVA et al., 2017). Fatores de risco inerentes à condição desta população, como imunidade inata e adaptativa imatura, são determinantes para infecções graves e de longa permanência, além de uso de dispositivos invasivos, procedimentos de intubação, hiperalimentação e imunossupressão (WATTAL; GOEL, 2020).

A condição de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) expressa elevada incidência e mortalidade em ICS, sendo este atualmente um motivo frequente de internação. Patologias crônicas e uso prolongado de medicamentos configuram fatores de alto risco para esta condição, além de fatores particulares, tais como alteração da imunidade mediada por células, disfunção de linfócitos B e deficiência de neutrófilos (TARAMASSO; TATARELLI; DI BIAGIO, 2016).

O cenário epidemiológico das ICS se modificou nos últimos 40 anos. Fatores como o aumento da expectativa de vida populacional, o aparecimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, avanços na prática de saúde como transplante de células estaminais hematopoiéticas e transplantes de órgãos sólidos, terapias imunossupressoras e o aumento de procedimentos invasivos em ambiente hospitalar foram determinantes para essa modificação. (MCMULLEN; WILEN; BURNHAM, 2017).

Atualmente, as ICS são um problema grave no manejo dos pacientes, com agravamento devido a pandemia de COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) originada em Wuhan, na China. Em 31 de dezembro de 2019, foram observados indivíduos que apresentavam casos de

pneumonia causados pelo Coronavírus do tipo 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2). As manifestações clínicas variam de infecção assintomática a pneumonia viral grave necessitando de tratamento em UTI (GUISADO-GIL et al., 2020; RIPA et al., 2021).

As medidas de prevenção e controle de infecção durante a assistência aos pacientes com COVID-19 são recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). As infecções secundárias bacterianas e fúngicas apresentam elevada incidência nesta população, associadas principalmente à desregulação imunológica em COVID-19 grave, uso extensivo de antimicrobianos e baixa adesão às medidas de controle e prevenção de infecção (CATALDO et al., 2020).

A incidência de ICS em pacientes diagnosticados com COVID-19 é alta devido aos períodos prolongados de internação. Indivíduos em estado crítico apresentam risco aumentado para ICS, especialmente após o sétimo dia de internação na UTI. O diagnóstico pode se tornar complexo, devido a utilização de fármacos anti-inflamatórios no combate à doença, resultando em episódios ausentes de febre e redução de marcadores inflamatórios (BUETTI et al., 2021; GIACOBBE et al., 2020).

Um recente estudo descreve cinco episódios de fungemia associados a *Trichosporon asahii* em pacientes gravemente enfermos com COVID-19, sendo três evoluindo a óbito nos primeiros quatorze dias após o diagnóstico de fungemia. A imunossupressão prolongada em decorrência de corticosteróides e terapia antimicrobiana está associada a danos multiorgânicos, propiciando superinfecções por patógenos oportunistas (NOBREGA DE ALMEIDA et al., 2021).

#### 1.4 INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA POR FUNGOS

Os fungos são microrganismos eucariotos distribuídos no meio ambiente em vida livre, encontrados principalmente nas formas filamentosas e leveduriformes. Alguns fazem parte da microbiota normal do homem, sendo organismos comensais, enquanto outros possuem caráter patogênico provocando infecções superficiais ou profundas, através de infecções externas, ou ainda infecções oportunistas provocada pela fragilidade imunológica do hospedeiro (GOERING et al., 2014).

Nas últimas três décadas, foi observado aumento exponencial no número de ICS ocasionadas por fungos. O crescimento de terapia antifúngica, seja de ordem empírica ou profilática, configurou significativa mudança no perfil epidemiológico. Agentes

imunossupressores também representam fatores predisponentes para esta condição (BURNHAM et al., 2017; LINDBERG et al., 2019).

As ICS causadas por fungos são de difícil diagnóstico e estão associadas à elevada morbidade e mortalidade constituindo um grave problema de saúde pública (MENEZES et al., 2013). Dentre os fatores de risco para infecções em decorrência destes patógenos estão incluídos: tempo de internação prolongado em UTI, infecção bacteriana prévia, uso de cateter venoso central, nutrição parenteral e imunossupressão (OLIVEIRA et al., 2014).

As ICS nosocomiais ocasionadas por fungos são uma problemática crescente nos hospitais terciários em todo mundo, estando associadas ao uso progressivo de antibióticos de amplo espectro, cateter venoso central e dispositivos de longa permanência. *Candida spp.* é o gênero mais comum dentre os fungos, e o quarto isolado mais comum responsável pelas ICS em pacientes internados (BHATT et al., 2015).

O índice de mortalidade entre pacientes que adquirem fungemia nosocomial é alto, com taxas que variam de 50 a 80 por cento, sendo o principal fator atribuído à ausência ou inadequação de terapia antifúngica preliminar (CASTRO et al., 2016).

A permanência prolongada em UTI e a presença de doença de base são os principais fatores predisponentes para fungemia. O uso de dispositivos intravasculares, antibioticoterapia bacteriana, doenças oncológicas e transplantes, nutrição parenteral e cirurgia abdominal também são importantes fatores de risco (MORA CARPIO; CLIMACO, 2019).

Indivíduos imunossuprimidos por fatores relacionados à neoplasias hematológicas, agranulocitose e transplante alogêncio apresentam predisposição para as ICS por fungos, sendo esta condição uma das principais causas de morte destes pacientes (SALGÜERO FERNÁNDEZ et al., 2019).

A candidemia configura as ICS ocasionadas por fungos predominantes e mais comuns em indivíduos hospitalizados, sendo observada como a quarta causa de fungemia em UTI. A taxa de mortalidade é alta atingindo cerca de 50 por cento dos casos, sendo os pacientes pediátricos ou idosos mais acometidos por esta infecção (MORA CARPIO; CLIMACO, 2021).

#### **1.4.1 Fungos Leveduriformes**

O gênero *Candida* é o principal envolvido em infecções da corrente sanguínea relacionada a fungos leveduriformes. *Candida albicans* é a espécie mais isolada em todo o mundo no ambiente hospitalar, entretanto as espécies não-*albicans* também são importante

causa de preocupação, já que podem apresentar perfil de susceptibilidade reduzido aos antifúngicos (SASSO et al., 2017).

A candidemia adquirida por via endógena representa a maioria dos casos infecciosos, devido à translocação do microrganismo através do trato gastrointestinal, colonizado por espécies de *Candida*. Em geral, os eventos de candidemia são precedidos por um processo de colonização, sendo considerado um fator de risco para esta infecção (COLOMBO et al., 2013).

Dentre os principais fatores de risco para candidemia estão doença grave, malignidade hematológica, transplante de órgãos sólidos, baixo peso ao nascer, prematuridade, tumores de órgãos sólidos, nutrição parenteral, hemodiálise, cirurgia abdominal e quimioterapia (KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

Espécies deste gênero são frequentemente isoladas em pacientes imunocomprometidos que receberam antibioticoterapia de amplo espectro, nutrição parenteral, cateteres intravasculares ou insuficiência renal, ou ainda pacientes com longo tempo de internação hospitalar (MARTINEZ; WOLK, 2016).

Existem pelo menos 15 espécies do gênero *Candida* associadas à ICS, dentre estas cinco têm destaque representando >90% do total de casos: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (PAPPAS et al., 2015; ZHANG et al., 2019).

A incidência global de ICS por *Candida* varia de 0,3 a 5 por 1000 admissões hospitalares de acordo com localidade geográfica, epidemiologia local e fatores demográficos. O índice de mortalidade em 30 dias entre os pacientes que apresentaram candidemia variou entre 22 e 70 por cento (ZENG et al., 2020). A sepse relacionada à candidemia tem a mortalidade mais alta em comparação a patógenos bacterianos, chegando a 63,5% em choque séptico. A administração da terapia antifúngica nas primeiras 24 horas dos episódios de choque é primordial para estes pacientes, sendo observada uma taxa de mortalidade de 97,6% para pacientes sem tratamento adequado (IDELEVICH et al., 2014).

Nas últimas décadas houve uma mudança no perfil de distribuição das espécies, sendo *C. albicans* o patógeno isolado com maior frequência, entretanto foi observada diminuição de sua incidência frente às espécies não-albicans. *C.glabrata* apresenta maior relevância no norte da Europa, Estados Unidos e Canadá e *C.parapsilosis* no sul da Europa, Ásia e América do Sul (PINTO-MAGALHÃES et al., 2019).

*C. parapsilosis* em geral está associada a contaminação de origem exógena, sendo isolada principalmente em pacientes neonatos e adultos jovens. Sua colonização em

dispositivos médicos é a principal fonte de candidemia associada a cateter venoso central. *C. tropicalis* e *C. krusei* em geral acometem pacientes idosos maiores de 65 anos, sendo malignidades hematológicas, tumores sólidos, procedimentos cirúrgicos abdominais de grande porte e uso prolongado de corticoides fatores de risco para esta infecção (QUINDÓS, 2014).

*C. glabrata* pode representar até 29% do total de infecções de corrente sanguínea por *Candida*. Tem caráter oportunista, acometendo indivíduos idosos, pacientes diabéticos e transplantados de órgãos sólidos. Apresenta susceptibilidade reduzida aos antifúngicos azólicos e resistência emergente às equinocandinas, tornando o tratamento clínico complexo (KUMAR et al., 2019).

*C. glabrata* é frequentemente associada à infecção em adultos mais velhos, já *C. parapsilosis* ocorre em maior número em pacientes pediátricos, incluindo neonatos. A colonização de *C. parapsilosis* em mãos de profissionais de saúde tem sido relatada, representando um importante fator de risco em relação ao manejo do paciente e infecção hospitalar (MCMULLEN; WILEN; BURNHAM, 2017).

A incidência de diferentes espécies pode estar associada à distribuição geográfica. Estudos no Norte Europeu e os Estados Unidos relatam alto número de casos associados a *C. glabrata* e um baixo número associado a *C. parapsilosis*. Em contrapartida, relatórios do Brasil e Espanha demonstram maior número de casos associados a *C. parapsilosis* e menos casos por *C. glabrata* (GUINEA, 2014).

*Candida auris* é um patógeno com perfil de multirresistência emergido recentemente, isolado pela primeira vez no Japão em 2009 no conduto auditivo externo de um paciente internado (SATO et al., 2009). Atualmente já foi relatado em diversos países em todos os continentes, com exceção da Antártica. Sua transmissibilidade em ambientes hospitalares e habilidade na formação de biofilme estão relacionadas a surtos hospitalares (LONE; AHMAD, 2019). No Brasil, o primeiro caso de *C.auris* foi identificado em Salvador, sendo a cepa isolada em um paciente internado por complicações da COVID-19 (DE ALMEIDA et al., 2021).

O perfil epidemiológico das infecções fúngicas por leveduras está se modificando, sendo observados outros patógenos emergentes. Essas alterações podem estar associadas a intervenções médicas, como o uso de agentes antifúngicos profiláticos, podendo desencadear perfis de imunossupressão no hospedeiro (NUCCI; MARR, 2005).

O gênero *Cryptococcus* tem alguns dos patógenos mais comuns associados a doença fúngica invasiva adquirida na comunidade, representando cerca de 55 por cento dos casos de infecção da corrente sanguínea (ARENDRUP et al., 2014). Os fungos do complexo

*Cryptococcus neoformans*, em geral associado a indivíduos imunocomprometidos, e *Cryptococcus gattii*, associados a pacientes imunocompetentes, são leveduras encapsuladas de distribuição cosmopolita. A criptococose ocorre de forma sistêmica sendo subaguda ou crônica e é potencialmente fatal (AGUIAR et al., 2017).

O gênero *Trichosporon* é comumente associado a quadros clínicos de fungemia em pacientes com doenças neoplásicas hematológicas. A espécie frequentemente associada a esta condição é o *Trichosporon asahii*. Este gênero apresenta resistência intrínseca às equinocandinas e baixa susceptibilidade aos polienos, sendo o uso precoce do antifúngico baseado em testes de sensibilidade determinante para o sucesso de tratamento (FEUGRAY et al., 2019).

As espécies do gênero *Rhodotorula* são patógenos emergentes, capazes de causar doença invasiva, principalmente fungemia. Acometem principalmente pacientes imunossuprimidos com uso de cateter venoso central e pacientes oncológicos (NUNES et al., 2013).

A espécie *Exophiala dermatitidis* apresenta diagnóstico difícil. É um fungo demáceo e de crescimento lento, sendo sua principal fonte de infecção os dispositivos de acesso através da formação de biofilme. Pacientes que estão em regime de quimioterapia estão mais propensos a esta infecção (YOSHIDA et al., 2019).

A espécie *Arxulla adenivorans* acomete pacientes imunocomprometidos, em especial aqueles que apresentam doença pulmonar grave com exacerbações refratárias ao tratamento. Esta levedura é utilizada como organismo transgênico na produção de café e chá, porém pode assumir caráter oportunista (ROEHMEL et al., 2015).

A espécie *Kodamaea ohmeri* é reconhecida como patógeno oportunista emergente, capaz de causar infecções invasivas em pacientes com condições clínicas especiais, como prematuridade, imunossupressão, válvulas protéticas, dispositivos médicos invasivos e períodos longos de internação. Diabetes e doenças malignas também representam fatores de risco para esta infecção. A mortalidade a este agente etiológico pode chegar a 50 por cento de fatalidades nos casos clínicos (VIVAS et al., 2016).

As infecções invasivas por *Geotrichum capitatum* são raras, e acometem especialmente pacientes com neoplasias hematológicas, principalmente aqueles que apresentam neutropenia grave. Dentre os fatores de risco associados a esta infecção estão o uso de antibióticos de amplo espectro e neutropenia profunda e prolongada. A taxa de mortalidade pode variar de 50 a 70 por cento (BEN NEJI et al., 2019; SAGHROUNI et al., 2012).



O gênero *Malassezia* pode ser associado a surtos nosocomiais em pacientes imunocomprometidos. A fungemia ocorre principalmente em pacientes sob nutrição parenteral total (NPT) e pacientes com longos tempos de internação em UTI. Também representa um risco para prematuros e bebês com baixo peso ao nascer (IATTA et al., 2018; VELEGRAKI et al., 2015).

Algumas espécies do gênero *Pseudozyma* são patogênicas, raras, associadas à fungemia. Foram relatados nos últimos 10 anos casos raros de infecção invasiva associados a este gênero. Fatores de risco como imunossupressão, doenças neoplásicas e uso de dispositivos médicos invasivos são associados a esta infecção. As espécies apresentam resistência intrínseca à caspofungina e apresentam susceptibilidade diminuída ao fluconazol (HERB et al., 2015).

As espécies do gênero *Saccharomyces* são utilizadas como probióticos para o tratamento de diarreia por uso de antibióticos e melhora em quadros de doença inflamatória intestinal. Podem ser consideradas patogênicas em pacientes debilitados ou imunossuprimidos, principalmente quando estes probióticos são administrados. A infecção pode ocorrer por translocação intestinal ou contaminação do cateter venoso central, sendo este último um fator de risco para esta infecção (ROMANIO et al., 2017).

O gênero *Saprochaete* representam patógenos fúngicos oportunistas raros associados a doenças raras invasivas. Pacientes com neoplasias hematológicas representam um grupo de risco. A fungemia ocasionada por estas espécies é uma infecção emergente associada a alta mortalidade e baixa susceptibilidade ao fluconazol e equinocandinas (ÖZDEMIR et al., 2017). O gênero *Sporobolomyces* é considerado um patógeno raro. Acomete principalmente pacientes imunossuprimidos, episódios de sepse bacteriana, uso de terapia de corticosteroides, abuso de drogas intravenosas, alcoolismo e hemodiálise. Pode estar associado com a presença doméstica de aves e mamíferos. Além de fungemia, está relacionado a infecções invasivas incluindo dermatite, infecção cerebral, encefalite, infecção ocular e linfadenite (DAMJI; MUKHERJI; MUSSANI, 2019; FRANCO RODRÍGUEZ et al., 2010).

#### **1.4.2 Fungos Filamentosos**

As ICS fúngicas ocasionadas por fungos filamentosos apresentam cenário progressivo. Pacientes receptores de transplante de órgão sólido, portadores de doenças neoplásicas, transplantados de células-tronco hematopoiéticas, portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), terapia imunossupressora, doença pulmonar crônica e submetidos a cirurgia

de grande porte estão mais susceptíveis a estas infecções oportunistas (IBÁÑEZ-MARTÍNEZ; RUIZ-GAITÁN; PEMÁN-GARCÍA, 2017).

As vias de entrada dos fungos filamentosos no hospedeiro ocorrem através da inalação de esporos fúngicos ou pela perda da barreira de proteção epidérmica por eventos traumáticos ou perfurocortantes. Os principais gêneros envolvidos em infecções oportunistas são *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Acremonium sp.* e *Penicillium sp.*. Os grupos de zigomicetos e feo-hifomicetos também apresentam caráter infeccioso oportunista (ANVISA, 2004).

As infecções fúngicas invasivas associadas a estes patógenos estão sendo progressivamente relatadas, sendo o aumento da utilização de tratamentos imunossupressores o principal motivo. Os gêneros *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium sp.*, *Scedosporium sp.* e *Lomentospora sp.* são os mais isolados em pacientes imunocomprometidos. As infecções podem variar de acordo com as condições geográficas, climáticas e grau de imunossupressão do hospedeiro (DOUGLAS; CHEN; SLAVIN, 2016; THORNTON, 2020).

## 1.5 TERAPIA ANTIFÚNGICA

A terapia antifúngica aplicada em doenças invasivas é representada por três classes principais de antifúngicos incluindo os azóis, equinocandinas e polienos. Estes podem ter ação fungicida, com o desfecho da morte celular fúngica, ou fungistático, onde o antifúngico interrompe a multiplicação celular, mas não elimina a estrutura fúngica (ARASTEHFAR et al., 2020).

Os azóis são antifúngicos fungistáticos, regularmente utilizados como primeira linha de profilaxia e terapia de infecções fúngicas invasivas em pacientes que apresentam quadro clínico de doença hematológica maligna, doenças autoimunes ou indivíduos transplantados de órgãos ou células tronco hematopoéticas. São classificados em dois grupos: os imidazóis e os triazóis (BENITEZ; CARVER, 2019).

Os triazóis são uma alternativa farmacológica para o tratamento de doenças fúngicas invasivas, sendo estes o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol. Essas drogas alteram a funcionabilidade e a estrutura da parede celular fúngica, inibindo a síntese de esteróis. Representam uma opção para o tratamento de infecções por *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Histoplasma sp.* e *Coccidioides sp.* e fungos da ordem *Mucorales* (NOCUA-BÁEZ et al., 2020). O voriconazol atualmente é utilizado para o tratamento de primeira linha para aspergilose invasiva. Posaconazol é utilizado como segunda

linha de tratamento para aspergilose e mucormicose. O itraconazol é utilizado no tratamento primário da blastomicose, aspergilose e histoplasmose, além do tratamento de candidíase (LEDOUX et al., 2017).

As equinocandinas são representadas pelos antifúngicos caspofungina, micafungina e anidulafungina. Inibem a síntese de 1,3  $\beta$ -D-glucana, componente fundamental para a formação da parede celular fúngica. Esta classe deve ser administrada por via intravenosa, pois não apresentam absorção pela via oral (AZANZA PEREA, 2016). Apresentam ação fungicida para cepas de *Candida* não-*albicans*, incluindo *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*, e ação fungistática para *Aspergillus* sp. *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* sp. e *Zygomycetos* apresentam perfil de resistência frente a esta classe de antifúngico. Apresentam atividade terapêutica dependente da concentração administrada e baixa interação medicamentosa (BELLMANN; SMUSZKIEWICZ, 2017).

A classe dos polienos é representada pelos antifúngicos Anfotericina-B, Nistatina e Natamicina. Esses antifúngicos se ligam ao ergosterol da membrana celular fúngica, aumentando a permeabilidade celular, e conseqüentemente criando a formação de poros na célula, alterando suas funções metabólicas (GREGORI VALDES, 2005). Os polienos possuem atividade microbiana para fungos filamentosos e leveduriformes. A Anfotericina-B é utilizada de maneira sistêmica para infecções invasivas, apresentando largo espectro para candidíase, aspergilose, criptococose, mucormicose, fusariose, blastomicose, histoplasmose, coccidiomicose, esporotricose e feohifomicoses. (MÜLLER; KARA-JOSÉ; CASTRO, 2013).

A Anfotericina-B deoxicolato (d-AmB) foi considerada por muitos anos o padrão de referência para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, sendo utilizada na prática clínica principalmente em instituições com recursos financeiros restritos. A nefrotoxicidade é o principal efeito adverso observado para este fármaco, além de reações agudas infusionais, alterações hematológicas e hepáticas. Formulações lipídicas mais modernas já estão disponíveis, implicando em menores efeitos adversos à terapia antifúngica, como anfotericina lipossomal (L-AmB), anfotericina em dispersão coloidal (ABCD) e anfotericina em complexo lipídico (ABLC) (FALCI; PASQUALOTTO, 2015).

A resistência aos antifúngicos ocorre regularmente em tratamentos de longo prazo através de resistência fúngica adquirida, ou ainda características intrínsecas associadas ao perfil fenotípico de cada microrganismo. Comumente, os isolados susceptíveis respondem à terapia antifúngica adequada em cerca de 90% dos casos, enquanto os isolados resistentes respondem ao tratamento em 60 por cento dos casos (ZAVREL; WHITE, 2015).

Os mecanismos de resistência aos antifúngicos são considerados uma questão evolutiva. Dentre os mecanismos moleculares que controlam os perfis de resistência estão as mutações que alteram o gene alvo de ligação do fármaco, a ativação das bombas de efluxo reduzem a concentração do fármaco intracelular, alterações na regulação das vias de resposta ao estresse celular e adaptações a adversidades ambientes relacionadas à plasticidade genômica (ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

A formação de biofilmes fúngicos representa um mecanismo de resistência de grande impacto frente às terapias antifúngicas. Através da formação de comunidades celulares aderidas a uma superfície e entre si, protegidas por uma matriz extracelular, esta estrutura cria uma barreira física que impede a atuação do fármaco, uma vez que este não consegue desempenhar suas atividades farmacológicas. Mecanismos relacionados a superexpressão de bombas de efluxo, alterações genéticas de alvos de drogas, interação do sistema imunológico do hospedeiro-biofilme e proteínas que levam a filamentação também estão relacionados a resistência dos biofilmes (BORGHI; BORGIO; MORACE, 2016).

Conhecidamente, *C. albicans* é o patógeno mais isolado nas ICS e a característica altamente adaptativa permite a esta levedura a capacidade de desenvolver perfis de resistência após a exposição prolongada aos antifúngicos. Mecanismos como formação de biofilme, super expressão de bombas de efluxo, seleção de mutações espontâneas e a capacidade de evadir dos sistemas de defesa são algumas condições que conferem tolerância e resistência antifúngica a esta espécie (COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES, 2020).

## 1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico de ICS é um papel de extrema importância desempenhado pelo setor de Microbiologia Clínica, pois é a partir da identificação do agente infeccioso e caracterização do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos que será selecionada a conduta clínica adequada (FLORIO et al., 2018).

A hemocultura é o padrão de referência para o diagnóstico das ICS. É indicado que a coleta seja realizada antes da antibioticoterapia em pacientes que configuram quadro clínico sugestivo de infecção e que apresentam febre, calafrios, leucocitose, choque séptico ou suspeita de endocardite (LAMY et al., 2016). É a prática laboratorial mais significativa para o diagnóstico e investigação das ICS. O tempo de positividade do exame é utilizado como fator preditivo para condições do prognóstico do paciente, além de avaliar a eficácia da

antibioticoterapia instituída e a carga de microrganismo circulante no organismo (GAVRONSKI; NOGUEIRA, 2020).

A variabilidade na detecção de positividade deste exame está associada a diversos fatores, tais como a exposição anterior à terapia antimicrobiana, metodologia aplicada no monitoramento da hemocultura e foco infeccioso, tendo em vista que este tem relação direta com a carga de microrganismo circulante no sangue (WATTAL; GOEL, 2020).

As amostras devem ser colhidas através de punção venosa em sítios anatômicos distintos. Cada punção representa um conjunto de hemoculturas (aeróbia e anaeróbia). Punções arteriais não aperfeiçoam o isolamento do microrganismo e amostras colhidas de dispositivos intravasculares apresentam maior taxa de contaminação. O volume para cada par deve corresponder entre 20 a 40 ml de sangue. Para lactentes e crianças esse volume é menor, variando de acordo com o peso do paciente e não excedendo 1 por cento do volume total de sangue (KIRN; WEINSTEIN, 2013). É recomendada para identificação do microrganismo uma amostragem de pelo menos dois conjuntos de hemoculturas aeróbias e anaeróbias, colhidas após antisepsia rigorosa da pele (TIMSIT et al., 2020).

O diagnóstico das ICS relacionadas ao cateter deve ser considerado em pacientes que fazem uso destes dispositivos, que apresentem febre, calafrios, sinais de sepse, suspeita de infecção no local do cateter ou isolados em hemocultura persistentes com determinado microrganismo. As práticas laboratoriais aplicadas para confirmação de diagnóstico são a cultura quantitativa da ponta do cateter, ou ainda, quando o mesmo não pode ser retirado, a coleta de hemoculturas seriadas, obtidas simultaneamente do lúmen do cateter e do sangue periférico (CANTÓN-BULNES; GARNACHO-MONTERO, 2019).

O procedimento de higienização das mãos e a utilização de técnicas de assepsia são primordiais para a minimização da contaminação de origem cutânea. A aplicação do antisséptico deve ser realizada através de movimentos circulares na pele de dentro para fora, sendo respeitado o tempo de secagem do antisséptico. Este processo também deve ser realizado nos frascos de coleta antes da inoculação do sangue, para evitar contaminação (RAMIREZ GALLEYMORE; GORDÓN SAHUQUILLO, 2019).

O monitoramento de coleta e a otimização do tempo do transporte das hemoculturas são determinantes no rendimento do diagnóstico. A amostragem deve ser obtida por equipes treinadas, com conhecimentos das fases do processo de coleta a fim de minimizar as possíveis fontes de contaminação (DE PLATO et al., 2019).

### 1.6.1 Hemocultura por Métodos Tradicionais (Convencional)

Os laboratórios de Microbiologia que dispõem de metodologias convencionais, como os métodos manuais, utilizam meios de cultura comerciais para a realização da hemocultura. Dentre os meios disponíveis comercialmente, em geral são utilizados o caldo infusão-cérebro-coração (*Brain Heart Infusion – BHI*) ou caldo caseína digerida de soja (*Tryptic Soy Broth – TSB*) para microrganismos aeróbios, facultativos e leveduras; e caldo Columbia para anaeróbios, que também favorecem o crescimento de microrganismos fastidiosos (ARAÚJO, 2012).

São utilizados métodos tradicionais de diagnóstico, através do acompanhamento diário das amostras cultivadas, sendo elas incubadas em estufa a 37° C. Subcultivos em meios específicos são realizados, a partir de um exame microscópico, e posteriormente, a identificação do microrganismo eventualmente presente através do crescimento de colônia (RENÉ CAQUET, 2018).

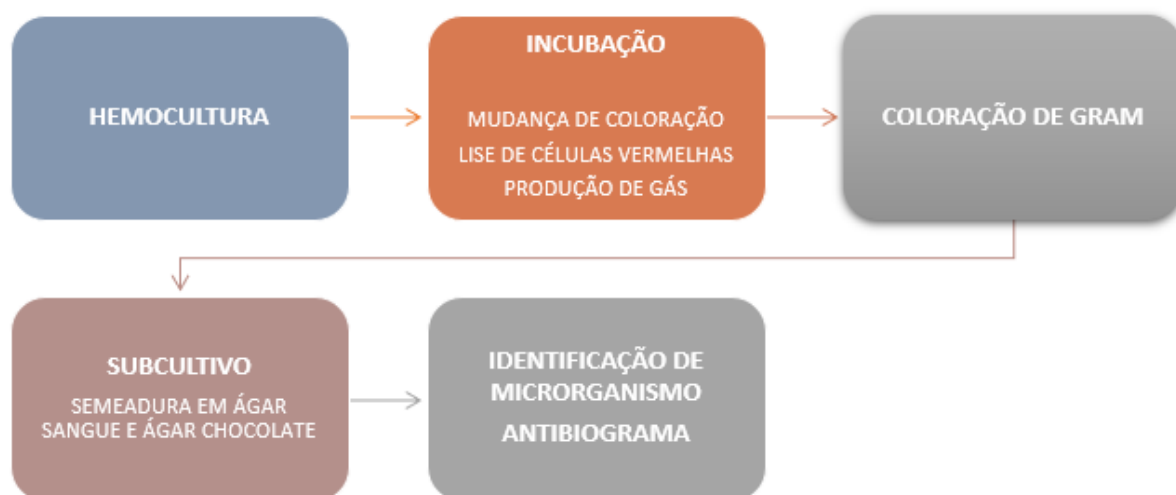
Esta metodologia requer um tempo de incubação de até 7 dias para permitir o crescimento e a viabilidade do microrganismo frente a sensibilidade do método. As hemoculturas são observadas no período de 6 a 12 horas após a inoculação, sendo a inspeção realizada sistematicamente ao longo do dia. Parâmetros como mudança de coloração, lise de células vermelhas e produção de gás são avaliados (**Figura 1**) (OMBELET et al., 2019). Em caso de sinais de positividade, a amostra é observada em microscopia através da coloração de Gram e subcultivada em meios de cultura específicos para a obtenção de colônias (**Figura 2**) (ATKINSON-DUNN; DUNNE, 2017).

**Figura 1 - Sinais de crescimento em frascos de hemocultura. (A) Formação de filme na superfície; (B) Produção de gás; (C) Turbidez (garrafa esquerda: sem crescimento; garrafa direita: turbidez).**



Fonte: OMBELET et al., 2019

**Figura 2 - Representação esquemática das etapas de processamentos das hemoculturas positivas por metodologia manual.**



**Fonte: Adaptado de ATKINSON-DUNN; DUNNE (2017).**

O Sistema Hemobac Trifásico<sup>®</sup> (Probac do Brasil, Brasil) é uma metodologia comercial composta por um caldo suplementado para inoculação do sangue, acoplado por um dispositivo de laminocultivo que contém duas faces de meios de cultura sólidos, sendo eles Ágar Chocolate, Ágar Sabouraud e Ágar MacConkey, que permitem o crescimento de microrganismos. Também possui um sistema indicativo de cor para produção de CO<sub>2</sub> (gás carbônico) (GARCEZ JUNIOR; MARTINS, 2003).

O método de lise-centrifugação é um sistema fabricado por Wampole (WampoleLaboratories, EUA). O sistema utiliza a saponina para realizar a lise das células sanguíneas, liberando microrganismos intracelulares e inativando fatores séricos inibitórios e agentes antimicrobianos. Atualmente, esta metodologia é utilizada principalmente para o isolamento de microrganismo fastidiosos como *Mycobacterium spp.* e fungos dimórficos (TEKIPPE; PENCE, 2017).

Embora os métodos convencionais ainda sejam utilizados por questões de custo, não são indicados por apresentarem baixa sensibilidade, serem mais laboriosos, além de facilitarem a contaminação das amostras e aumentarem o risco com acidentes perfurocortantes (ARAÚJO, 2012).

## 1.6.2 Hemocultura Automatizada

O primeiro sistema automatizado de hemocultura empregado extensamente no início da década de 1970 foi o BACTEC 460 Blood Culture System, seguido 660 e 730 NonRadiometric Blood Culture System (Becton Dickinson and Company, EUA). O Sistema Difco ESP (Difco, EUA), atualmente VersaTREK (Thermo Fisher Scientific, EUA), também era operado. A limitação destes sistemas consistia no monitoramento da amostragem da atmosfera em garrafas, restrito uma ou duas vezes ao dia (WILSON, 2020).

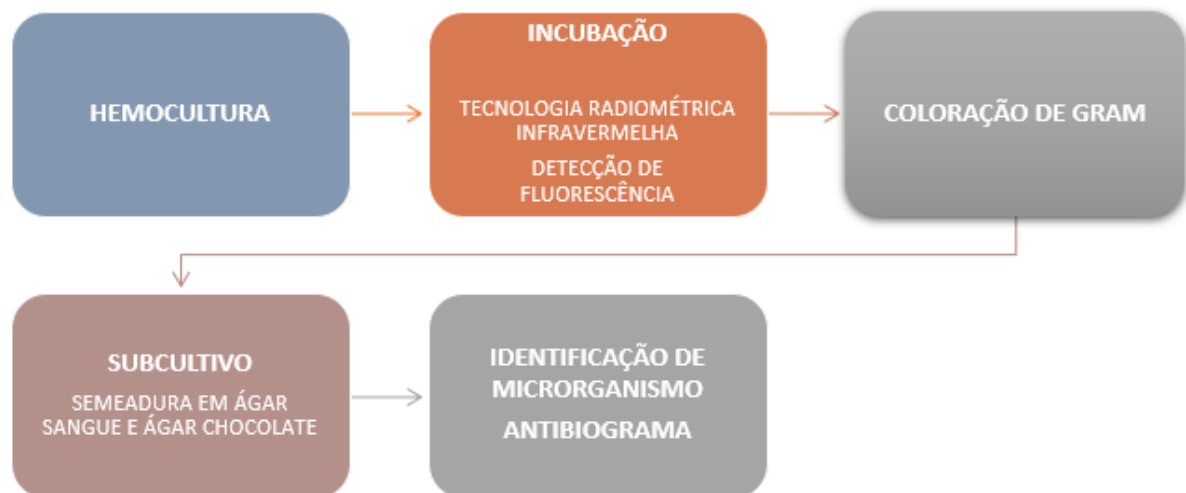
A introdução de sistemas automatizados de monitoramento contínuo de sangue (CMBCS – Continuous Monitoring Blood Culture System) teve início na década de 1990, configurando uma padronização sofisticada de organização diagnóstica das hemoculturas, assim como a otimização do rendimento da cultura (LAMY; SUNDQVIST; IDELEVICH, 2020a). O princípio desses sistemas é o monitoramento constante de garrafas gerando pontos de dados, que são frequentemente analisados por um algoritmo (WILSON, 2020).

Nos sistemas automatizados, em geral, o período de incubação da hemocultura é de até cinco dias, embora as etiologias predominantes apresentem resultados positivos com até 48 horas de incubação inicial. Quando há suspeita de agentes etiológicos fastidiosos o protocolo de incubação pode ser estendido. Recomenda-se a coleta de no mínimo duas até quatro amostras por episódio séptico, permitindo em mais de 95 por cento dos casos o isolamento do microrganismo (ARAUJO, 2012; MILLER et al., 2018).

Os sistemas automatizados Bactec<sup>®</sup> (Beckton Dickison and Company, EUA) e BactAlert/Virtuo<sup>®</sup> (bioMérieux, França) são baseados na utilização de substratos de carboidratos em meios de cultura e na produção de CO<sub>2</sub> pelo metabolismo de microrganismos, dispondo de tecnologia radiométrica, infravermelha e detecção de fluorescência. As metodologias automatizadas garantem monitoração contínua e diminuição significativa no tempo de diagnóstico. Além de oferecer maior sensibilidade e rapidez na detecção de positivos e menores riscos de contaminação durante a manipulação laboratorial. Quando há a detecção de positividade, os frascos são removidos do equipamento e subcultivados em meios de culturas sólidos específicos (**Figura 3**) (CHAMBERLAND, 2017; FORD; KALLSTROM, 2017).



**Figura 3 - Representação esquemática das etapas de processamento das hemoculturas positivas por metodologia automatizada.**



**Fonte:** Adaptado de CHAMBERLAND (2017); FORD; KALLSTROM (2017).

### 1.7 IONIZAÇÃO E DESSORÇÃO DE MATRIZ ASSISTIDA POR LASER – TEMPO DE VOO / MALDI-TOF MS

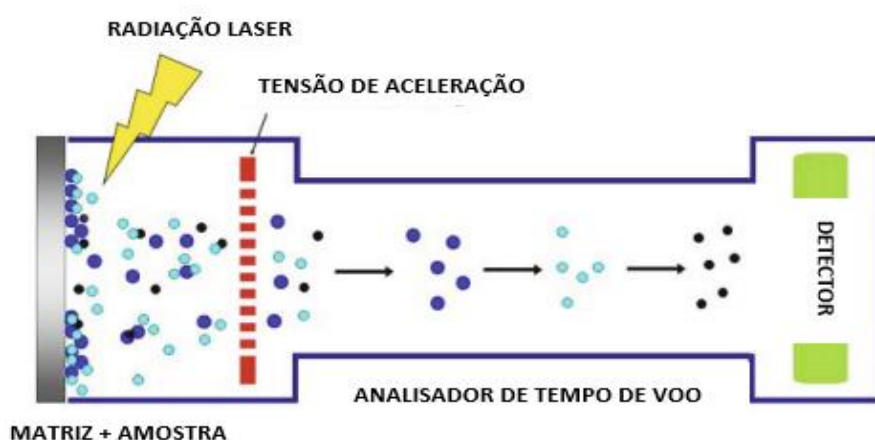
A espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDI-TOF MS) é uma metodologia analítica desenvolvida na década de 1980 capaz de identificar diversos microrganismos através da análise do perfil de proteínas. (KASSIM et al., 2017).

A técnica de MALDI-TOF MS está gradativamente se mostrando superior a identificação convencional baseada em aspectos bioquímicos. A análise proteômica otimizou a identificação microbiana nos laboratórios de microbiologia clínica, conferindo agilidade e precisão no diagnóstico de doenças infecciosas que demandam resposta rápida (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020).

O processo se dá a partir da transferência de amostras para uma placa alvo, onde ocorre a co-cristalização por uma matriz, em geral um material orgânico ácido de absorção ultravioleta, e são expostas a radiação laser. Após essa etapa ocorre a formação de íons, seguido de dessorção e ionização (JANG; KIM, 2018). As moléculas dessorvidas e ionizadas são aceleradas por meio de um campo elétrico e passam por um tubo de vácuo metálico até atingirem o detector. Os íons

com tamanho menor viajam mais rapidamente pelo tubo de voo do que os de tamanho maior. Desse modo, as moléculas ionizadas das amostras formam espectros de massa de acordo com sua razão  $m/z$  (relação massa/carga) e com os picos que indicam as quantidades variáveis das proteínas leveduriformes. Cada pico gerado pela análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) é analisado pelo software correspondente e confrontado com a biblioteca de espectros contida no banco de dados (**Figura 4**) (LUETHY; JOHNSON, 2019).

**Figura 4 - Princípios básicos da técnica de MALDI-TOF MS.**



Fonte: Adaptado de Jang; Kim (2018).

Os microrganismos podem ser identificados pela técnica de MALDI-TOF MS por transferência direta, sendo caracterizada pelo deslocamento de células inteiras de colônias para a placa alvo, com auxílio de alça de plástico ou palito de madeira, sendo posteriormente recobertos com ácido fórmico e matriz CHCA (Ácido  $\alpha$ -Ciano-4-Hidroxicinâmico), ou ainda passar por um processo de extração de proteínas que ocorre em fase anterior à placa alvo. Este segundo processo é mais indicado para identificação de fungos filamentosos e micobactérias, devido a características fenotípicas destes microrganismo, como a presença de parede celular espessa, dificultando o acesso às proteínas alvo. O processo de identificação está exemplificado na figura abaixo (**Figura 5**) (PATEL, 2019).



infecioso em aproximadamente uma hora (MURRAY; MASUR, 2012). Na identificação direta, a suspensão de hemocultura obtida através da sinalização de positividade deve ser tratada com um agente detergente, com a finalidade de lavar as células e componentes do meio de cultura, seguido de protocolos de centrifugação e extração de proteínas (LAMY; SUNDQVIST; IDELEVICH, 2020b). Esse procedimento é minucioso devido às etapas de separação do microrganismo das células sanguíneas, presença de carvão e resinas nos frascos de hemocultura para inativação de antibióticos, além das proteínas humanas presentes no sangue (OVIAÑO, 2019).

## 2 JUSTIFICATIVA

As infecções de corrente sanguínea apresentam índices progressivos de incidência, configurando um cenário ameaçador à saúde. Em geral esse diagnóstico é reconhecido após 48 horas da admissão do paciente, e posteriormente ocorre a identificação do microrganismo associado à infecção (FALCONER; HAMMOND; GILLESPIE, 2020). A fungemia reflete um problema de saúde pública, representando uma alta taxa de mortalidade que varia entre 30 a 40 por cento, além do aumento de tempo de internação hospitalar e custos associados ao manejo clínico do paciente (PRIGITANO et al., 2020).

A hemocultura permanece sendo o padrão de referência para o diagnóstico clínico de ICS. Embora o processo de identificação tradicional dos patógenos ocorra a partir da detecção de positividade dos frascos e semeadura em meio sólido com incubação por um período mínimo de 18-24 horas, o prolongado tempo de resposta (Turnaround Time – TAT) posterga o tempo de diagnóstico. (DAI et al., 2021). A técnica de MALDI-TOF MS permite a identificação de patógenos diretamente do caldo de cultura positivo, reduzindo significativamente o tempo de reconhecimento do agente infeccioso (OSTHOFF et al., 2017).

Dessa maneira, a aplicação do protocolo de identificação direta por MALDI-TOF MS reduziu em 24 horas a adequação do tratamento antimicrobiano, permitindo a implementação precoce de terapia espécie-específica direcionada, garantindo a melhoria na evolução clínica do paciente, minimizando o desenvolvimento de perfis de resistência microbiana e efeitos adversos ao tratamento. Sob essa perspectiva, justifica-se o presente estudo, visando a avaliação do protocolo de identificação direta para o diagnóstico de infecção de corrente sanguínea por fungos leveduriformes.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a aplicabilidade do protocolo de diagnóstico rápido por MALDI-TOF MS em infecções de corrente sanguínea causadas por fungos leveduriformes no laboratório clínico.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o desempenho de identificação do protocolo rápido e o subcultivo microbiológico;
- Avaliar a performance do protocolo rápido por ano de ocorrência;
- Correlacionar histórico infeccioso com isolado de hemocultura;
- Validar a pontuação do escore do protocolo rápido no diagnóstico precoce das ICS por fungos leveduriformes;
- Elaborar um Procedimento Operacional Padrão (POP), descrevendo a metodologia e aplicabilidade do protocolo de diagnóstico rápido de fungemia por MALDI-TOF MS (Apêndice C);
- Elaborar uma Cartilha de Trabalho com informações básicas sobre os procedimentos de notificações de valores críticos (Apêndice D).

## **4 MÉTODO**

### **4.1 DESENHO DO ESTUDO**

Estudo retrospectivo de natureza descritiva e quantitativa, realizado junto à equipe de Microbiologia do Richet Medicina & Diagnóstico, através da análise de banco de dados entre agosto de 2012 e outubro de 2018.

### **4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO**

Isolados leveduriformes detectados a partir de hemoculturas positivas de pacientes hospitalares e ambulatoriais. A amostra foi de conveniência compreendida dentro do período de análise do estudo.

#### **4.2.1 Critérios de Inclusão**

Isolados leveduriformes presentes em hemoculturas positivas previamente detectadas pelo sistema automatizado e posteriormente submetidas à coloração de Gram, recebidas e processadas na Microbiologia do Richet Medicina & Diagnóstico.

#### **4.2.2 Critérios de Exclusão**

Fungos filamentosos isolados em hemoculturas, fungos leveduriformes isolados de outras amostras clínicas que não sejam hemoculturas, hemoculturas com isolados bacterianos.

### **4.2.3 Aspectos Éticos**

Trata-se de um estudo retrospectivo, de natureza quantitativa e descritiva, com análise de microrganismos isolados a partir de amostras clínicas já coletadas mediante solicitação e acompanhamento clínico/médico independentes do objetivo e natureza do estudo.

Foram utilizados somente dados secundários obtidos a partir dos microrganismos isolados de espécimes clínicos obtidos para fins diagnósticos. Os dados utilizados tiveram caráter privativo e confidencial, sendo garantido integralmente o anonimato e a imagem do paciente.

O acesso às bases de dados para fins da pesquisa científica foi feito somente após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética. O projeto (CAAE: 26065019.0.0000.5262) foi aprovado pelo CEP pelo parecer de número 3.801.159 (Anexo A).

## **4.3 PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

### **4.3.1 Pacientes e Hemoculturas**

Entre o período de agosto de 2012 e outubro de 2018 foram analisados 95 pacientes com confirmação de infecção de corrente sanguínea e que atendiam ao critério de inclusão no estudo.

Foram selecionadas 232 hemoculturas que apresentavam estruturas leveduriformes na coloração de Gram, provenientes de unidades hospitalares da Rede D'Or São Luiz, postos de coleta ambulatoriais do Richet Medicina & Diagnóstico ou ainda hemoculturas já colhidas pelo médico assistente e entregues em um posto de coleta do Richet Medicina & Diagnóstico.

As hemoculturas foram recebidas no setor de microbiologia clínica, coletadas em frascos Plus Aerobic/F Culture Vials (BD, BACTEC™), Plus Anaerobic/F Culture Vials (BD, BACTEC™) e Myco/F Lytic Culture Vials (BD, BACTEC™) projetados para levar até 10 ml de sangue, incubadas e monitoradas pelo sistema automatizado BACTEC™ FX (BD Diagnostics, Sparks, MD) com protocolo de cinco dias de incubação para os frascos aeróbios e anaeróbios, e 42 dias para o frasco Myco/F.

As vias de acesso, sítio anatômico, intervalos de coleta e quantidade de frascos colhidos para cada paciente foram especificados de acordo com a solicitação médica.



### 4.3.2 MALDI-TOF MS após Isolamento Fúngico em Meio de Cultura

As amostras de hemoculturas positivas identificadas pelo sistema de automatização foram subcultivadas através da semeadura por esgotamento em estrias em placas de Petri (90 mm) com os meios ágar Sangue de carneiro 5 por cento e ágar Chocolate (bioMérieux, Brasil) e incubadas a 37°C com variação de 2°C por um período de 24 a 48 horas. Após o crescimento visível de colônias, foram submetidas à identificação pela metodologia de espectrometria de massas (MALDI TOF-MS). A transferência de colônias foi realizada em duplicata. Cada área foi coberta com 1 µl de ácido fórmico ≥98 por cento (Proquímios, Brasil), e posteriormente com 1 µl da matriz (solução ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico - CHCA) (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo esta utilizada de acordo com as instruções do fabricante.

### 4.3.3 MALDI-TOF MS Direto do Frasco de Hemocultura Positiva para Levedura

Concomitantemente, alíquotas das hemoculturas positivas foram submetidas ao protocolo rápido de identificação. Foi utilizado o sistema de identificação MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemanha) flexControl Version 3.4, com o banco de dados MALDI Biotyper Version 3.1. O protocolo consiste em adicionar 1 mL da amostra de sangue positivo ao tubo de Eppendorf com 500 µl de saponina a 1 por cento, seguido de vórtex por 10 segundos. A amostra foi centrifugada a 14.680 rpm (2 minutos e 30 segundos) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi homogeneizado em 1 mL de água de injeção, e centrifugado a 14.680 rpm durante 2 minutos e 30 segundos. A lavagem do sedimento em água de injeção foi repetida duas vezes. Subsequentemente, o sobrenadante foi removido e o sedimento homogeneizado depositado em 2 pontos de uma placa alvo de aço polido. Após secagem ao ar à temperatura ambiente, cada área delimitada na placa foi coberta com 1 µl de ácido fórmico ≥98 por cento (Proquímios, Brasil), e posteriormente com 1 µl da matriz (solução ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico - CHCA) (Bruker Daltonics, Alemanha). O tempo total de realização do protocolo é de aproximadamente 40 minutos (**Figura 6**) (PELOSO et al., 2013). Após a cristalização da matriz junto à amostra, a placa metálica foi introduzida no espectrômetro de massa para identificação.

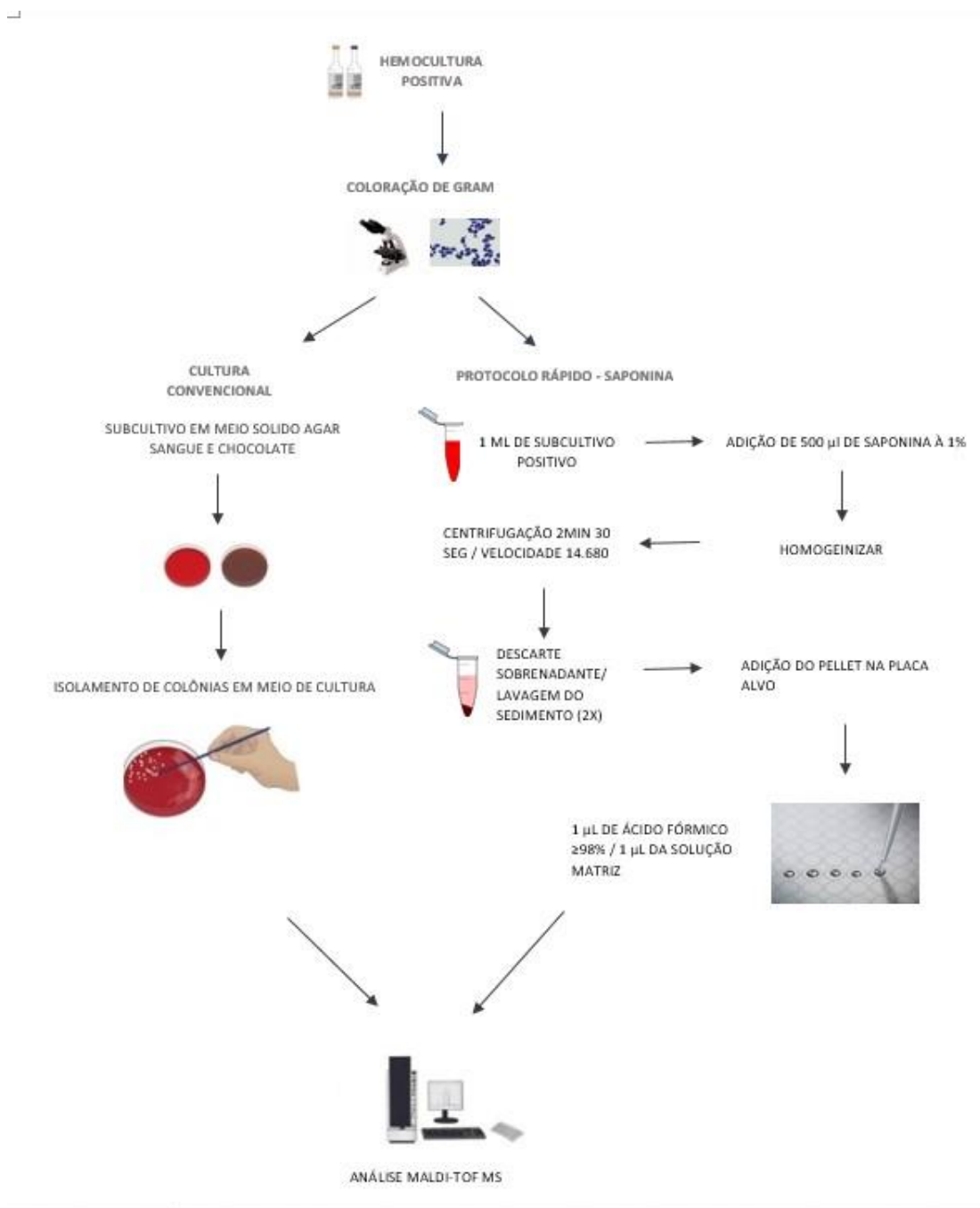
#### 4.3.4 Análise MALDI-TOF MS

A identificação microbiana foi realizada usando o modo de íon positivo linear dentro de uma faixa de massa de 2.000-20.000 Da (Dalton - Medida de Massa Atômica). O MALDI Biotyper foi montado com um laser de nitrogênio de 60 Hz (Hertz - Medida de Frequência). Para cada espectro, foram obtidos 240 disparos de laser em posições diferentes de um local de amostragem.

O padrão de teste bacteriano (*Bacterial Test Standard - BTS*; Bruker Daltonics, Alemanha) foi aplicado para calibração de massa de acordo com as orientações do fabricante. Além da calibração, o BTS é utilizado para otimização do espectro de massa, bem como um controle de desempenho na identificação dos microrganismos. Este é solubilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Os espectros foram analisados de acordo com o software Microflex® LRF - FlexControl Version 3.4 e biblioteca Bruker Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Alemanha). A identificação da levedura foi considerada confiável com valores de pontuação de escore  $\geq 1,7$  e 4 repetições consecutivas da mesma espécie na lista de correspondências dos melhores escores obtidos para a identificação do microrganismo, sendo estes sem exigência relacionada a pontuação de escore mínima. Pontuações de escore  $< 1,7$  foram consideradas como identificação não confiável.

**Figura 6 - Fluxo de trabalho de identificação direta em hemoculturas positivas usando a técnica de MALDI-TOF MS.**



Fonte: Adaptado de PELOSO et al. (2013).

#### 4.3.5 Bancos de Dados

Foi realizada uma análise retrospectiva dos bancos de dados pertencentes ao setor de microbiologia clínica entre os períodos de agosto de 2012 a outubro de 2018.

Para a análise referente às hemoculturas foi utilizado o sistema de gerenciamento de dados BD EpiCenter™ Microbiology Data Management System (Becton Dickinson and Company, EUA). Informações do tipo de frasco de coleta foram pesquisadas nesta fonte de dados.

A extração dos dados brutos do MALDI-TOF MS foi realizada através da análise do sistema Microflex® LRF - FlexControl Version 3.4 (Bruker Daltonics, Alemanha). O banco de dados acessado foi o MALDI Biotyper Version 3.1 (Bruker Daltonics, Alemanha). Por se tratar de um estudo retrospectivo, entre os anos de 2012 e 2018 a biblioteca espectral sofreu 6 atualizações diferentes, tendo variação de 4613 a 7854 espectros de referência, denominados MSPs (*Main Spectra Profile*). Do total de MSPs presentes na última versão, 765 eram referentes a leveduras, distribuídos em 44 gêneros e 202 espécies. Foram extraídas informações de identificação do microrganismo, sua classificação em nível de gênero e espécie e classificação de pontuação por escore.

Os *softwares* Smart Laboratório® (Pixon, Brasil) e SmartWeb® (Pixon, Brasil) foram utilizados para a extração de dados referentes ao histórico clínico do paciente, assim como informações sobre sexo, idade, unidade de atendimento e data de coleta da hemocultura.

#### 4.3.6 Análise Estatística

A análise descritiva dos dados utilizou frequência absoluta para variáveis qualitativas e medidas-resumo (média) para as variáveis quantitativas. A comparação entre as variáveis qualitativas e variáveis quantitativas foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . O programa estatístico R versão 4.0.2 foi utilizado para esta análise. Para as análises estatísticas dos dados houve a colaboração da Plataforma de Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas INI/FIOCRUZ.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 POPULAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Um total de 95 pacientes foi selecionado para o estudo atendendo ao critério de inclusão e exclusão entre os períodos de agosto de 2012 e outubro de 2018. A tabela abaixo apresenta os dados demográficos relacionados aos pacientes e às unidades de atendimento (**Tabela 1**).

**Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes e unidades de atendimento.**

	n	%
PACIENTES	95	
GÊNERO		
<b>Feminino</b>	46	48,4
<b>Masculino</b>	49	51,6
IDADE		
<b>0 a 18 anos</b>	5	5,3
<b>19 a 39 anos</b>	3	3,1
<b>40 a 59 anos</b>	11	11,6
<b>≥60 anos</b>	76	80
UNIDADE DE ATENDIMENTO		
<b>UTI</b>	56	59
<b>UTI NEONATAL</b>	5	5,2
<b>USI</b>	22	23,2
<b>OUTROS</b>	12	12,6

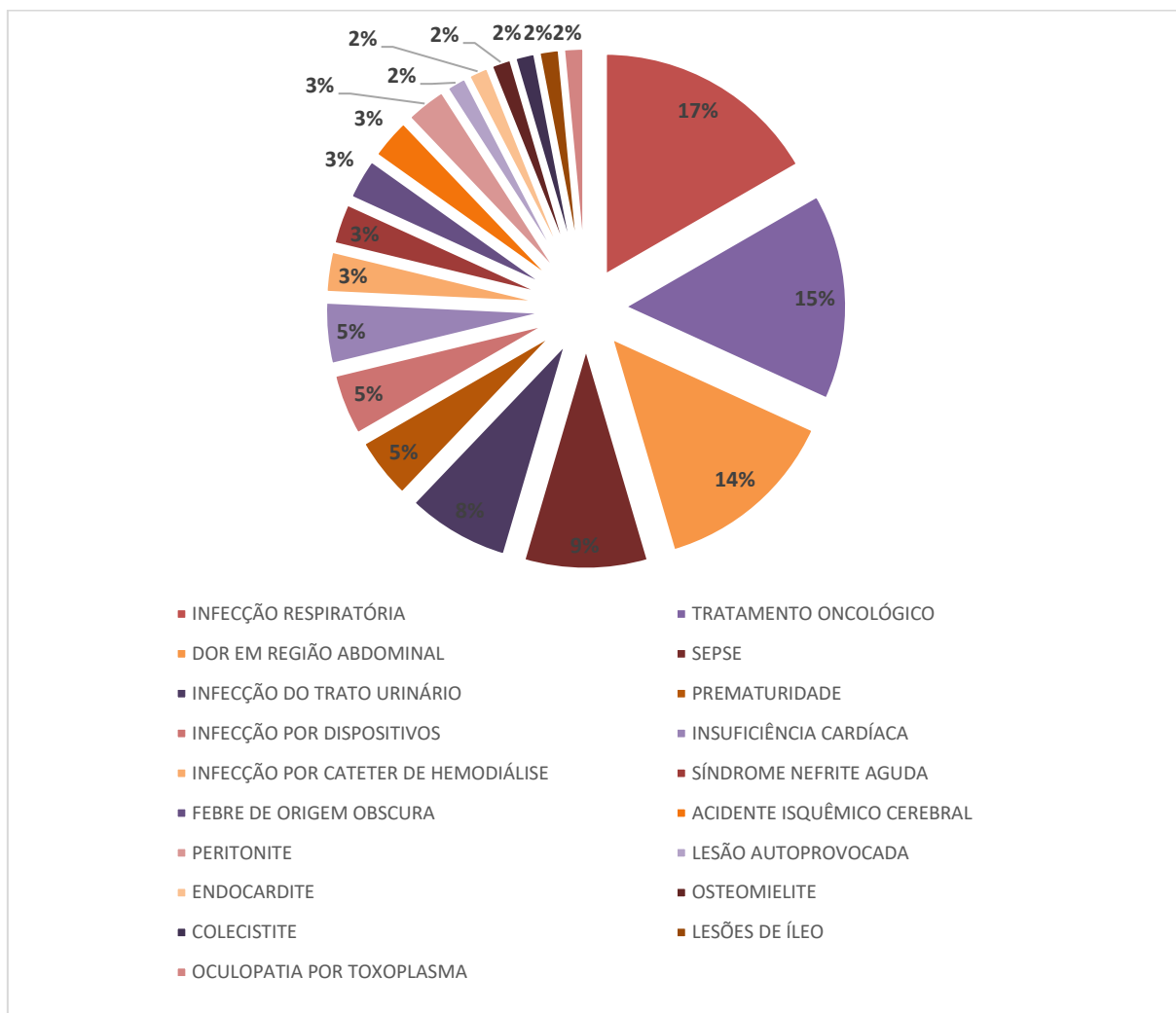
Fonte: Autoria própria, 2021.

### 5.2 DIAGNÓSTICO DE ATENDIMENTO E /OU INTERNAÇÃO

Foram avaliados os registros eletrônicos referentes ao diagnóstico de atendimento e/ou internação destes pacientes contidos nos prontuários. 47,3% dos pacientes apresentavam registros médicos anexados ao banco de dados, sendo o diagnóstico de infecção respiratória predominante, seguido de pacientes que realizavam tratamento oncológico. 52,7% dos pacientes não apresentaram nenhum registro médico relacionado ao diagnóstico de atendimento

e/ou internação no banco de dados. No gráfico abaixo (**Gráfico 1**) estão listadas todas as indicações clínicas registradas.

**Gráfico 1 - Distribuição de indicações clínicas registradas nos prontuários eletrônicos.**



Fonte: Autoria própria, 2021.

### 5.3 HEMOCULTURAS

Foram analisados 232 frascos de hemoculturas. Estratificando este dado quantitativo por ano de ocorrência, foram observadas 32 hemoculturas em 2012 (13,8%), 49 hemoculturas em 2013 (21,1%), 43 hemoculturas em 2014 (18,5%), 36 hemoculturas em 2015 (15,5%), 29

hemoculturas em 2016 (12,5%), 18 hemoculturas em 2017 (7,8%) e 25 hemoculturas em 2018 (10,8%).

Foram analisados 227 frascos Plus Aerobic/F Culture Vials (BD, BACTEC™), 1 frasco Plus Anaerobic/F Culture Vials (BD, BACTEC™) e 4 frascos Myco/F Lytic Culture Vials (BD, BACTEC™). Do total de frascos, 226 hemoculturas apresentaram crescimento de um microrganismo isolado e 6 hemoculturas apresentaram crescimento de dois microrganismos.

### **5.3.1 Estratificação de Identificação de Espécies por Ano de Ocorrência**

O maior quantitativo de hemoculturas foi observado em 2013, com 49 frascos, seguido do ano de 2014, com 43. A espécie predominante em todos os anos foi *C. parapsilosis* com 63 identificações, seguida de *C. albicans* com 57, *C. tropicalis* com 55 e *C. glabrata* com 28. *C. parapsilosis* foi predominante nos anos de 2012, 2013 e 2016. *C. albicans* teve predomínio nos anos de 2014, 2015 e 2017, e *C. tropicalis* em 2018. Foram observadas hemoculturas com isolamento de 2 microrganismos nos anos de 2014 e 2015 (**Tabela 2**).

**Tabela 2 - Estratificação do perfil fenotípico das hemoculturas por ano**

Identificação de espécies	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<i>Candida sp.*</i>	3				1		
<i>C. albicans</i>	3	3	12	20	5	7	4
<i>C. dubliniensis</i>	2						
<i>C. glabrata</i>		2	11	4	3		5
<i>C. guilliermondii</i>		1					
<i>C. krusei</i>	1	3	4				
<i>C. orthopsilosis</i>			2			3	3
<i>C. parapsilosis</i>	18	21	5	1	15	2	
<i>C. pelliculosa</i>	4						
<i>C. tropicalis</i>	1	18	8	4	5	6	11
<i>C.albicans/C. glabrata</i>				3			
<i>C. albicans/ C. parapsilosis</i>			1				
<i>C. albicans/ C. tropicalis</i>				2			
<i>C. neoformans</i>							2
<i>Trichosporon sp.</i>		1					
<i>T. asahii</i>				2			
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>49</b>	<b>43</b>	<b>36</b>	<b>29</b>	<b>18</b>	<b>25</b>

Nota: \* Identificação de microrganismos a nível de gênero.

Fonte: Autoria própria, 2021.

### 5.3.2 Identificação das Espécies das Hemoculturas por Unidade de Atendimento

A unidade de atendimento que apresentou predominância em hemoculturas foi a UTI (n = 144). *C. parapsilosis* foi a espécie predominante com 39 isolados, seguido de *C. tropicalis* com 34, *C. albicans* com 32, *C. glabrata* com 16, *C. krusei* com 7 e *Candida orthopsilosis* com 3. A USI apresentou 62 hemoculturas. *C. albicans* foi a espécie predominante com 22 isolados,



seguido de *C. tropicalis* com 14, *C. parapsilosis* com 13, *C. orthopsilosis* e *C. glabrata* com 3 isolados respectivamente. As outras unidades de atendimento totalizaram 26 hemoculturas, sendo *C. parapsilosis* predominante com 10 isolados, seguido de *C. glabrata* com 6 e *C. tropicalis* com 5 (Tabela 3).

**Tabela 3 - Frequência Absoluta e Relativa da Identificação de Espécies das Hemoculturas por Unidade de Atendimento.**

	UTI	Semi Intensiva	Outros
<b>Total</b>	144	62	26
<i>C. krusei</i>	7 (4.9)	0 (0)	1 (3.8)
<i>C. orthopsilosis</i>	3 (2.1)	3 (4.8)	2 (7.7)
<i>C. glabrata</i>	16 (11.1)	3 (4.8)	6 (23.1)
<i>C. tropicalis</i>	34 (23.6)	14 (22.6)	5 (19.2)
<i>C. albicans</i>	32 (22.2)	22 (35.5)	0 (0)
<i>C. parapsilosis</i>	39 (27.1)	13 (21)	10 (38.5)
<b>Outras leveduras</b>	13 (9)	7 (11.3)	2 (7.7)

Fonte: Autoria própria, 2021.

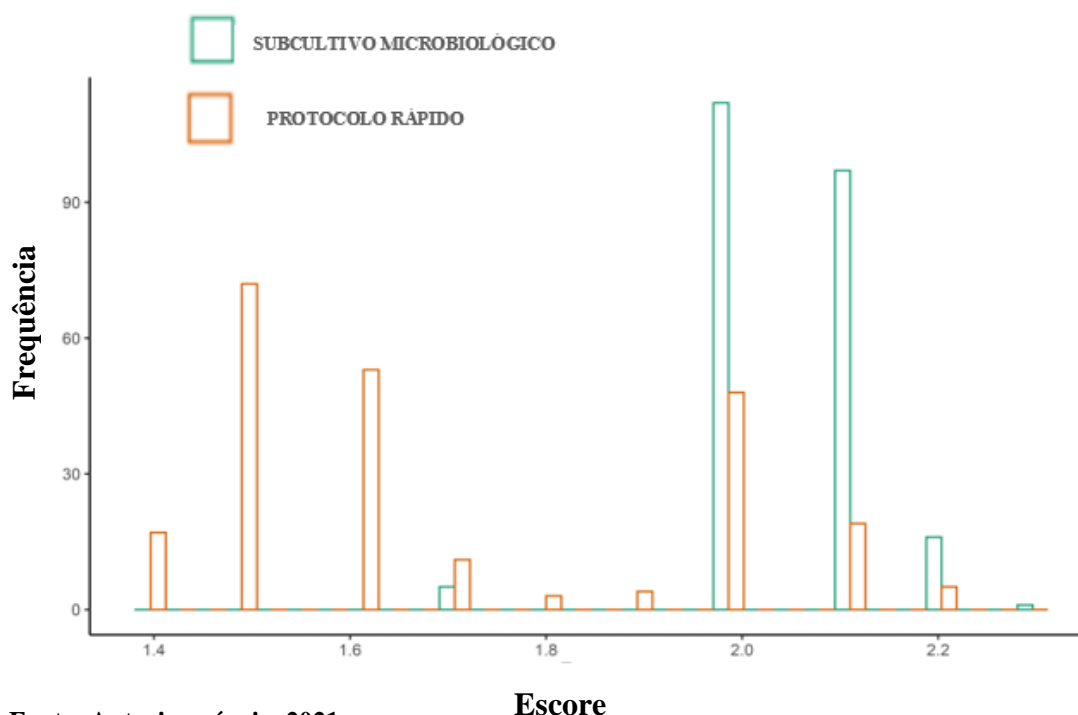
#### 5.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE IDENTIFICAÇÃO ENTRE O PROTOCOLO RÁPIDO E O SUBCULTIVO MICROBIOLÓGICO

##### 5.4.1 Frequência de Escores de MALDI-TOF MS por Tipo de Metodologia

O **Gráfico 2** apresenta o histograma de frequência dos escores por tipo de metodologia, onde é possível observar diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). As maiores frequências de identificação na metodologia do subcultivo microbiológico foram observadas nos escores de 2.0 e 2.1, enquanto o protocolo rápido foi o escore de 1.5. O escore mais frequente foi o de 2.0, representando 112 isolados observados no subcultivo microbiológico.

Os isolados que apresentaram escores entre 1.4 e 1.6 foram exclusivamente identificados pelo método do protocolo rápido, representando 142 isolados. Foram observadas duas curvas distintas no histograma. A primeira, caracterizada no protocolo rápido com ascensão no escore de 1.4, tendo seu pico em 1.5 e decréscimo em 1.6. A segunda, na metodologia de subcultivo microbiológico, com pico em 2, decrescendo para 2.1 e 2.2.

**Gráfico 2 - Histograma de frequência dos escores por tipo de metodologia**



Fonte: Autoria própria, 2021.

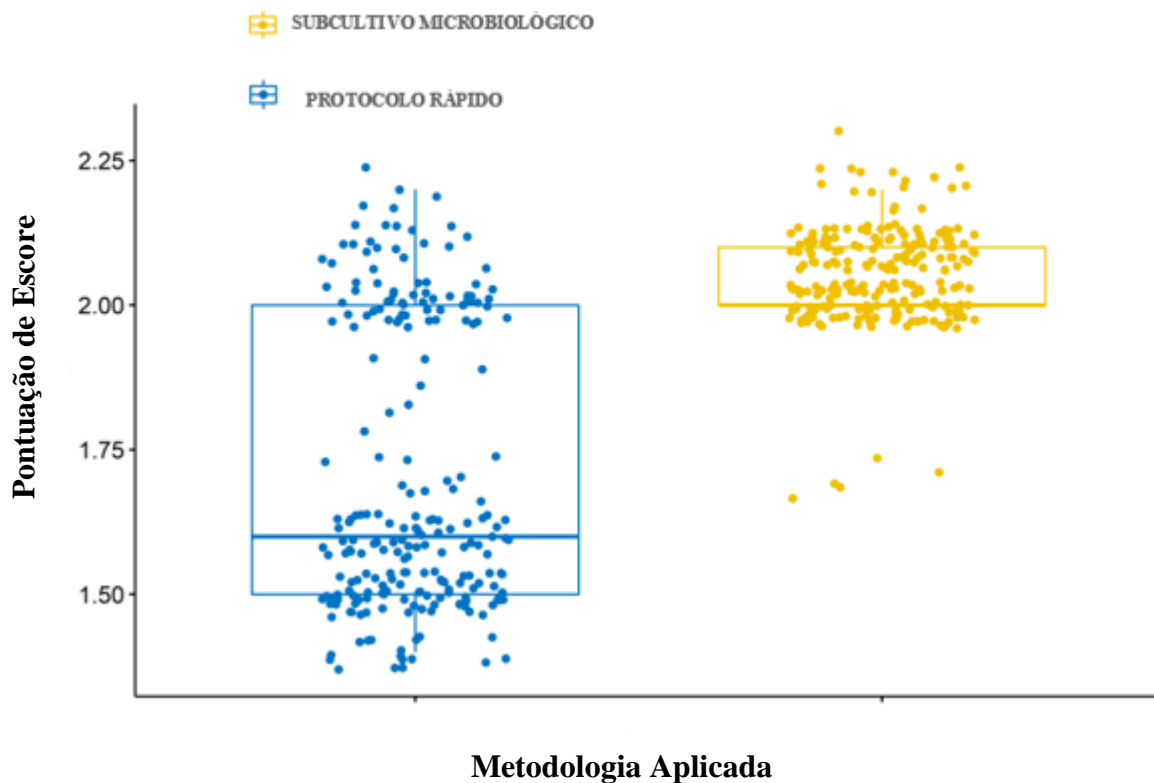
#### 5.4.2 Pontuação dos Escores de MALDI-TOF MS por Tipo de Metodologia

A comparação dos escores entre o protocolo rápido e o subcultivo microbiológico foi realizada através da análise do gráfico de Boxplot (**Gráfico 3**). Os dados analisados foram estatisticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

Na avaliação do protocolo rápido, observou-se que cerca de 7,3% dos isolados foram identificados com escores de 1.4. 53,9% dos isolados foram identificados entre os escores de 1.5 e 1.6. Os escores entre 1.7 e 1.9 corresponderam 7,8% dos isolados. Para a identificação com escores  $\geq 2.0$  foi observado o agrupamento de 31 por cento dos isolados nessas pontuações. É possível observar diferenças nos perfis de agrupamento dos escores, destacando-se dois grupos distintos: o primeiro variando com escores entre 1.4 e 1.6, e o segundo, com escores agrupados com pontuações acima de 2.0.

Na avaliação do subcultivo microbiológico, observou-se agrupamento predominante nos escores  $\geq 2.0$  representando 97,8% dos isolados. A mediana relacionada para esta metodologia foi o escore de 2.0. Foram observados pequenos agrupamentos com escore de 1.7, representando 2,2% do total de isolados.

**Gráfico 3 - Boxplot dos escores por tipo de metodologia**

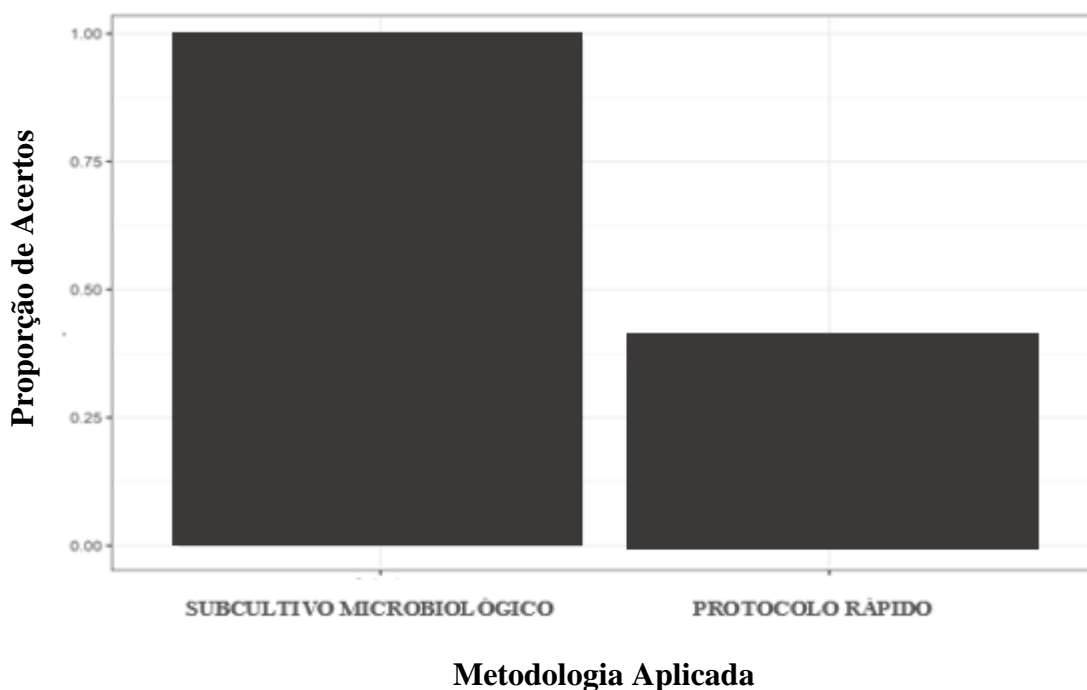


Fonte: Autoria própria, 2021.

### 5.4.3 Proporção de Acertos por Tipo de Metodologia

No **Gráfico 4** está representada a proporção de acertos por tipo de metodologia quando comparados com identificações de escore  $\geq 1.7$ , onde houve uma proporção de 100% de acertos em relação à identificação do método do subcultivo microbiológico, enquanto o protocolo rápido ficou em 38,7%

**Gráfico 4 - Proporção de acertos por tipo de metodologia**

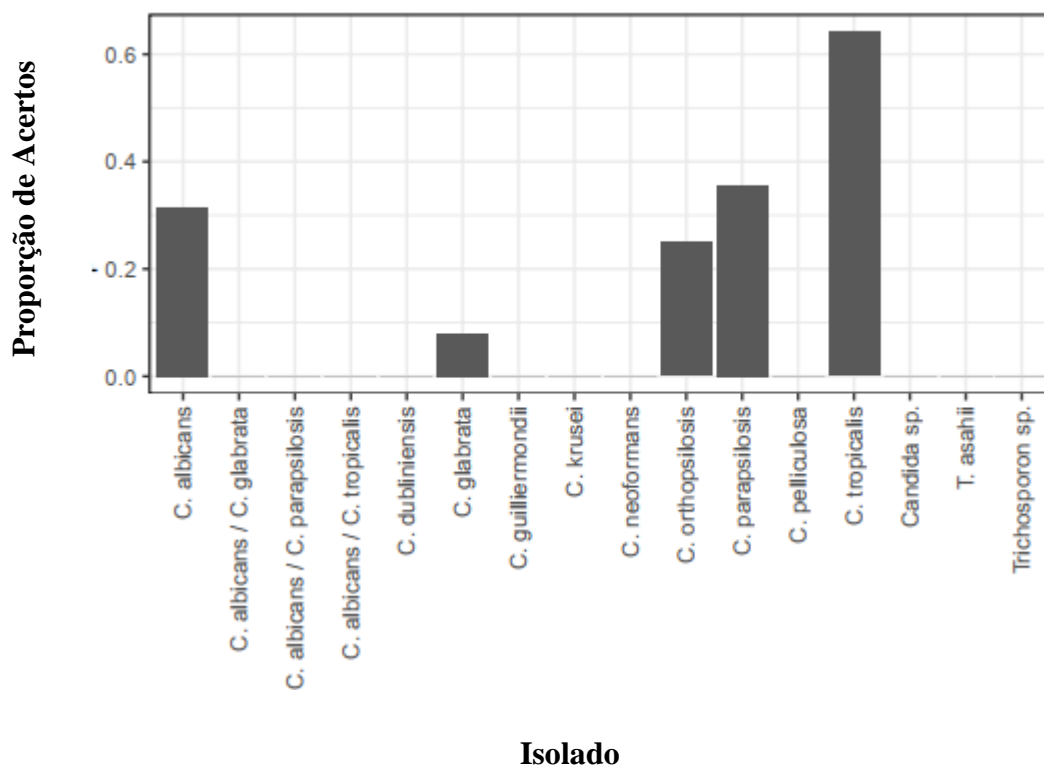


Fonte: Autoria própria, 2021.

#### **5.4.4 Proporção de Acertos do Protocolo Rápido**

Em relação às proporções de acertos observadas no protocolo rápido por isolamento, a espécie com maior proporção de acerto foi a *C. tropicalis* (70 por cento). As espécies *C. parapsilosis* obtiveram 35 por cento, seguido de *C. albicans* (32 por cento), seguida de *C. orthopsilosis* (25 por cento) e *C. glabrata* (9 por cento) com. As espécies *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii*, *C. krusei*, *Candida pelliculosa*, *Cryptococcus neoformans* e o gênero *Trichosporon sp.* obtiveram pontuação de escore < 1.7. Para estes isolados a identificação foi realizada a partir do subcultivo microbiológico. Para os episódios de fungemia com os isolados de *C. albicans/ C. glabrata* e *C. albicans/ C. parapsilosis* foram observadas pontuações com escores < 1.7. Para *C. albicans / C. tropicalis* foi observada a identificação direta apenas do patógeno *C. albicans*, e posteriormente verificado no subcultivo microbiológico o isolamento de *C. tropicalis*. (Gráfico 5).

**Gráfico 5 - Proporção de acertos do protocolo rápido por isolamento**



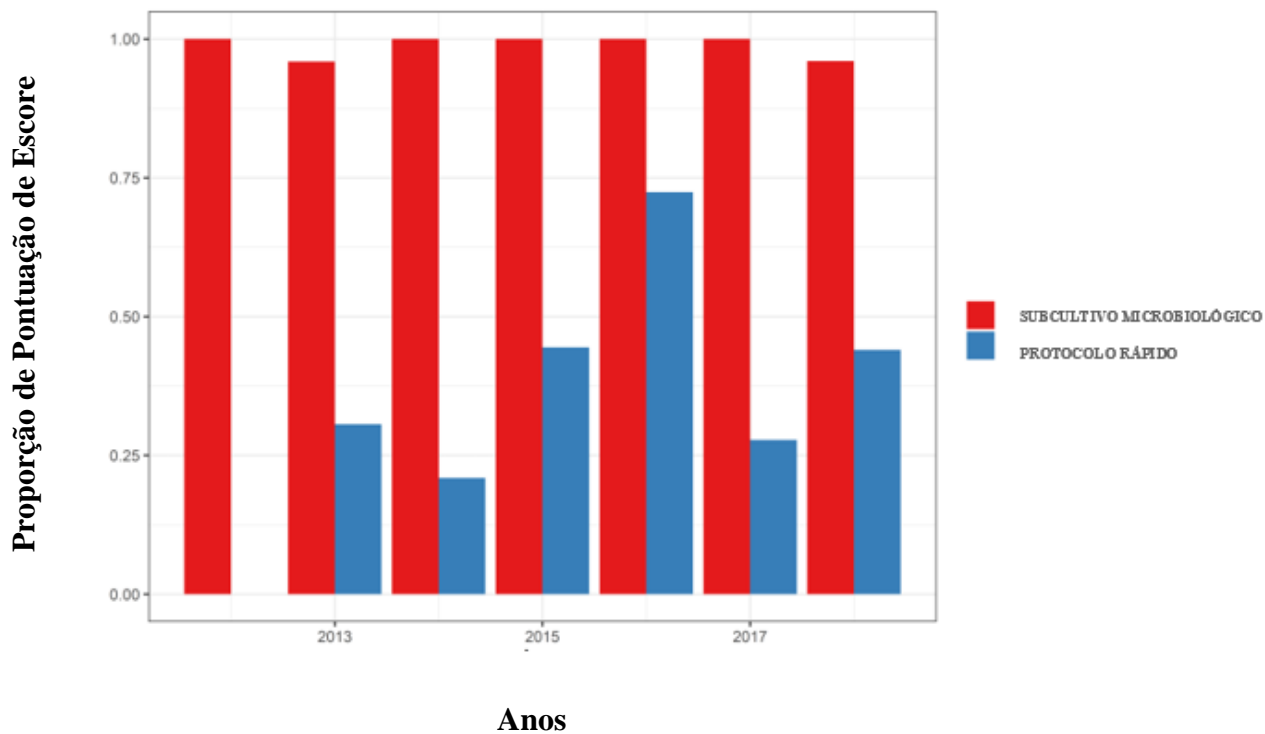
Fonte: Autoria própria, 2021.

#### 5.4.5 Proporção de Pontuação de Escore por Tipo de Metodologia e Ano

A proporção de pontuação de escore na totalidade dos isolados se manteve praticamente constante no método do subcultivo microbiológico com 100 por cento dos isolados com pontuações  $\geq 2.0$ , com exceção dos anos de 2013 e 2018, com aproximadamente 90 por cento dos isolados para estes anos específicos.

Para o protocolo rápido essa proporção se manteve relativamente inconstante, tendo as maiores pontuações de escore observadas em 2016. O ano de 2014 foi considerado como tendo a menor pontuação de escore, seguido dos anos de 2017, 2013 e 2015, respectivamente. O ano de 2012 não apresentou pontuação de escore acima de 1.7 (**Gráfico 6**).

**Gráfico 6 - Proporção de pontuação de escore por tipo de metodologia e ano**



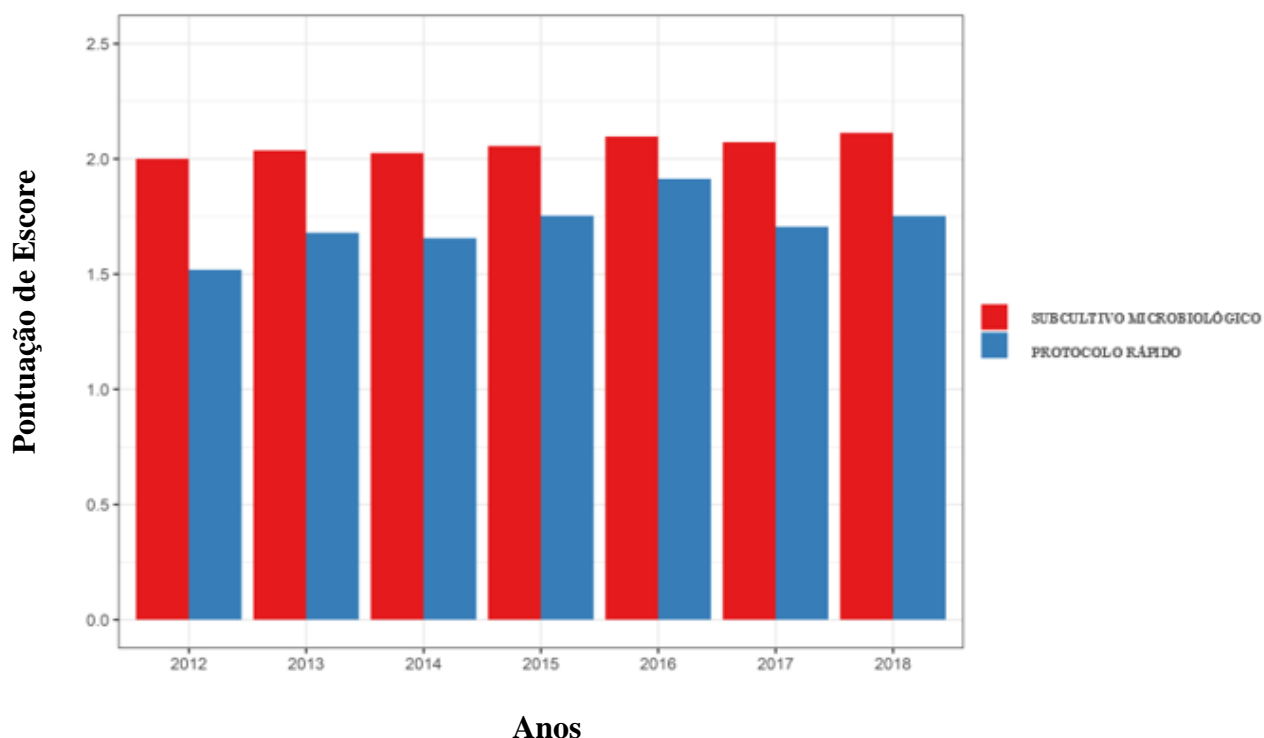
Fonte: Autoria própria, 2021.

#### **5.4.6 Média de Escores por Tipo de Metodologia e Ano**

Os valores médios de escores mantiveram-se constantes ao longo dos anos na análise do método do subcultivo microbiológico. Os escores médios foram definidos com a pontuação mínima de 2.0, sendo a maior média observada no ano de 2018.

Para o protocolo rápido, as médias se mantiveram relativamente constantes, com tendência de crescimento, sendo o maior valor observado no ano de 2016, com escore de 1.9 (Gráfico 7).

**Gráfico 7 - Valores médios dos escores por tipo de ano e metodologia**



Fonte: Autoria própria, 2021.

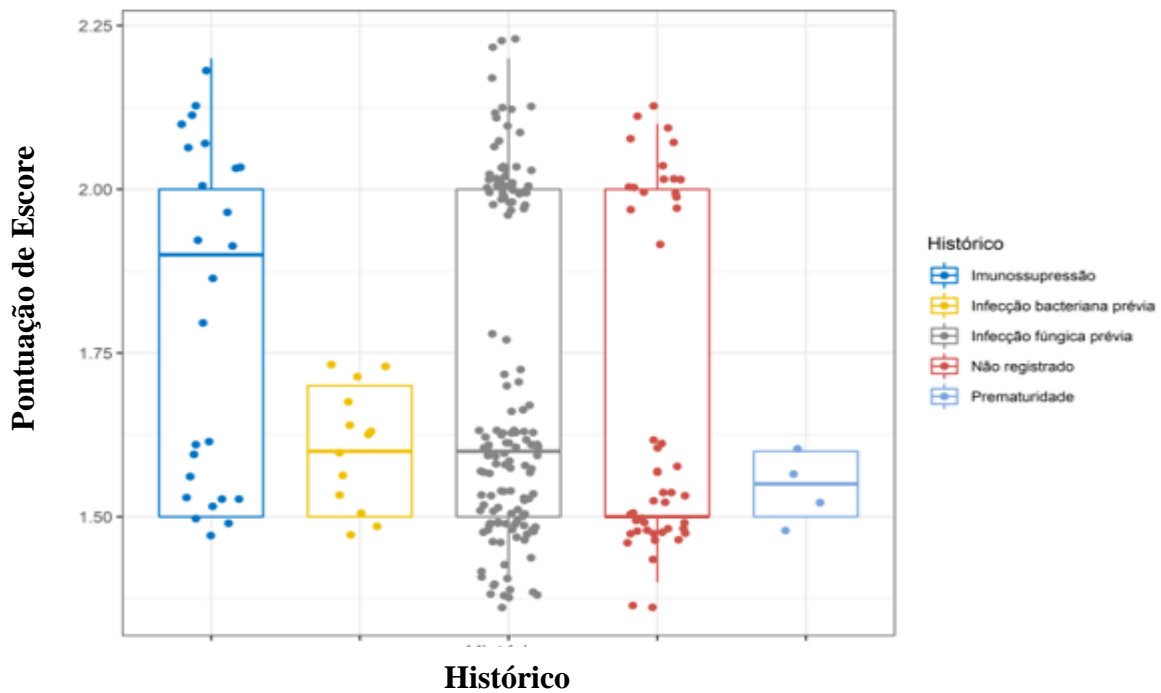
## 5.5 IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO RÁPIDO E CORRELAÇÃO COM HISTÓRICO CLÍNICO

A correlação entre a identificação do protocolo rápido e o histórico clínico progressivo dos pacientes foi realizada através do Boxplot (**Gráfico 8**), não sendo observada significância estatística para estes dados ( $p = 0,23$ ). Para as condições de infecção bacteriana prévia e infecção fúngica prévia foram observados os mesmos valores de mediana, com escore em torno de 1,6. Para os casos em que o histórico clínico não foi registrado, o valor de mediana foi observado no escore de 1,5. A condição de imunossupressão obteve o maior valor de mediana, em torno de 1,9.

Para os isolados relacionados à imunossupressão, 56 por cento foram identificados com escore  $\geq 2,0$ . Os isolados relacionados à infecção bacteriana prévia, 69,2% foram identificados com escore entre as pontuações 1,5 e 1,6, e 30,8% com escore de 1,7. Para os isolados relacionados à infecção fúngica prévia foram observados 2 agrupamentos distintos. Um agrupamento com escores concentrados na faixa de escores de 1,4 a 1,6 e outro com escores entre 1,9 e 2,25. Os isolados com escore  $\leq 1,6$  representaram 61,2% do total, e 32,4% com

escore  $\geq 2.0$ . Também foram observados dois agrupamentos distintos para os isolados que não tinham histórico clínico registrado. 64,5% ficaram entre os escores de 1.4 e 1.6, e 35,5% entre os escores de 1.9 e 2.1. Os isolados relacionados à prematuridade foram identificados com os escores entre 1.5 e 1.6.

**Gráfico 8- Boxplot dos valores de escores do protocolo rápido por histórico de pacientes**



Fonte: Autoria própria, 2021.



## 6 DISCUSSÃO

Ao longo da última década, a metodologia de MALDI-TOF MS proporcionou aos laboratórios de microbiologia clínica identificações rápidas e precisas de muitos microrganismos. Desde 2004, diversas plataformas comerciais foram disponibilizadas para uso clínico, mas foi em 2009 que a metodologia passou a ser adotada na rotina de micologia médica (DELAVY et al., 2019). No contexto clínico, MALDI-TOF MS encurtou significativamente o tempo de identificação destes patógenos, sendo a otimização do diagnóstico um fator primordial para desfechos favoráveis no tratamento clínico (DELPORT et al., 2017; NADJM et al., 2019).

A técnica de identificação direta de microrganismos em hemoculturas por MALDI-TOF MS foi vastamente difundida, tendo em vista que a contribuição no manejo clínico em pacientes graves é incontestável (SILLER-RUIZ et al., 2017). Um estudo relatou que 20 por cento dos tratamentos empíricos são modificados pelos médicos após a notificação da identificação da espécie, contra 8 por cento quando só tinham disponíveis os resultados de microscopia (KÖCK et al., 2017). Diversos estudos citam a eficiência de protocolos internos e *kits* comerciais, especialmente em pacientes que apresentam quadros sépticos, permitindo a estes, o diagnóstico etiológico em menos de uma hora após a positividade da hemocultura (CANDEL et al., 2018; CHERKAOUI et al., 2020; DI GAUDIO et al., 2018).

A detecção e identificação rápida de microrganismos envolvidos em ICS têm se mostrado decisiva na adoção precoce da terapia antimicrobiana (JOHNSSON; WONG; ÖZENCI, 2020). No presente estudo foi avaliada a utilização do MALDI-TOF MS no diagnóstico clínico de fungemia na rotina de um laboratório de microbiologia frente a duas técnicas distintas: a identificação direta de leveduras presentes em hemoculturas positivas através da aplicação do protocolo rápido e a identificação a partir do subcultivo microbiológico das mesmas.

As espécies de *Candida sp.* foram predominantes no estudo, representando 97,8% dos isolados. Em ambientes hospitalares, até 10 por cento das ICS são causadas por este gênero, podendo se desenvolver dentro de 3 semanas após a internação em UTI (KOTTHOFF-BURRELL, 2019). Para este gênero foram atribuídos 369 MSPs na biblioteca espectral. As espécies de *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. pelliculosa* não foram identificadas pelo protocolo rápido, com pontuações de escore < 1.7. O número de MSPs atribuídos para estas espécies foram respectivamente, 16, 14, 17 e 7. Em comparação com as outras espécies,

a variabilidade de espectros é menor, se comparado com *C. albicans* e *C. parapsilosis*, com 31 e 19 MSPs, respectivamente.

*C. parapsilosis* foi a espécie predominante no estudo, seguida de *C. albicans* e *C. tropicalis*. A distribuição de espécies não-*albicans* se modificou nas últimas décadas, configurando um novo cenário epidemiológico e emergente dessas leveduras oportunistas. Mudanças nas práticas clínicas e intervenções, como por exemplo o uso de equinocandinas e azóis, têm se mostrado fatores auxiliares na pressão seletiva das espécies não-*albicans* (ARASTEHFAR et al., 2019; FREEMAN WEISS; LEON; KOO, 2021). *C. parapsilosis* foi relatada como principal causa de candidemia em países ocidentais entre os pacientes com doenças malignas, sendo também comumente isolada nos países da América do Sul. No Brasil, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são as espécies não-*albicans* prevalentes nos episódios de candidemia. Esse perfil de distribuição foi observado no estudo (DOI et al., 2016; ENOCH et al., 2017; WU et al., 2017).

A UTI obteve predominância nas hemoculturas positivas (62 por cento). Esse resultado é corroborado com os dados citados na literatura, onde as ICS representam a terceira infecção mais comum nesta unidade de atendimento (EPELBAUM; CHASAN, 2017). Ocorrem em aproximadamente 15 por cento dos pacientes no primeiro mês de internação, sendo 5 por cento das mortes em UTIs atribuídas a esta etiologia (KALLEL et al., 2020). Um estudo relatou que a candidemia é a infecção fúngica mais frequente nas UTIs em pacientes com quadro clínico grave sendo seu diagnóstico uma tarefa complexa (BASSETTI et al., 2019).

Em relação à população do estudo, foi observado o predomínio de idosos, com 80 por cento dos indivíduos com idade  $\geq 60$  anos. Isso pode ser explicado por diversos fatores, como a alta frequência de comorbidades, ampla terapia medicamentosa, alterações fisiológicas relacionadas ao envelhecimento e altas taxas de colonização de leveduras, além de maior frequência na exposição de cuidados de saúde e períodos de hospitalização prolongados (BARCHIESI et al., 2017; DÍAZ et al., 2020; POISSY et al., 2020).

Diversos autores avaliaram a identificação direta de leveduras a partir de hemoculturas positivas utilizando protocolos específicos de extração de proteínas e *kits* comerciais disponibilizados no mercado (DAS et al., 2020; JEDDI et al., 2017; PAOLUCCI et al., 2014; PONDERAND et al., 2020). Estes protocolos requerem a utilização de reagentes químicos especiais para realização, nem sempre disponíveis na utilização dos laboratórios clínicos, além do custo na aquisição dos insumos e *kits* específicos. O protocolo rápido aplicado no estudo utilizou os insumos saponina, ácido fórmico e matriz CHCA, sendo os dois últimos usualmente

utilizados em outras rotinas de identificação dos laboratórios que dispõem da metodologia de MALDI-TOF MS. A extração à base de saponina como reagente de lise celular é amplamente citada em vários estudos, tendo os resultados de identificação semelhantes, senão melhores, do que os obtidos por *kits* comerciais (CHIEN et al., 2016; LEE et al., 2018; HU et al., 2020) .

O objetivo principal do estudo foi avaliar e padronizar a aplicabilidade do protocolo rápido no diagnóstico de ICS por fungos leveduriformes na rotina do laboratório clínico. De acordo com as instruções do fabricante, uma pontuação de escore  $\geq 2.0$  é registrada como identificação para o nível de espécie, e uma pontuação de escore  $\geq 1.7$  a 1.99 para o nível de gênero. Essas pontuações de escore foram categorizadas para a identificação de rotina de bactérias, podendo variar para a identificação de fungos (CASSAGNE et al., 2016). No presente estudo foi considerada a pontuação de escore de  $\geq 1.7$  para identificação segura de leveduras a nível de espécie na rotina do laboratório clínico, baseado em estudos que relataram aumento no número de identificações corretas em nível de espécies sem comprometer a confiabilidade dos resultados de identificação (BELLANGER et al., 2019; DE CAROLIS et al., 2014; NORMAND et al., 2017; SANGUINETTI; POSTERARO, 2017; VAN HERENDAEL et al., 2012; VLEK et al., 2014).

Na análise comparativa entre as duas técnicas aplicadas no estudo, o protocolo rápido identificou 38,7% dos isolados com pontuações de escores  $\geq 1.7$ , sendo os episódios de fungemia prontamente notificados a equipe médica dentro do período de quarenta minutos após a positividade da hemocultura. Na análise dos resultados do subcultivo microbiológico, foi demonstrado que os episódios de fungemia tiveram todos os isolados identificados com pontuação de escore  $\geq 1.7$  após o crescimento visível de colônias, levando no mínimo 24 horas de incubação após a positividade da hemocultura.

O melhor desempenho da técnica do subcultivo microbiológico é justificado pela identificação de leveduras a partir de colônias, também citado em estudos como “protocolo de células intactas”, apresentando biomassa microbiana satisfatória para a formação de espectros, sendo o limiar mínimo para formações espectrais o quantitativo de  $10^4$  células (REEVE et al., 2018; VAN BELKUM et al., 2017). Em contrapartida, o tempo para identificação é acrescido em pelo menos 24 horas após a detecção de positividade da hemocultura, devido a fatores de crescimento do microrganismo. Diversos estudos propõem a redução dos valores de corte para pontuações de escores de identificação de leveduras por MALDI-TOF MS diretamente do sangue (MARTÍN-PUJOL; TOSCO-NUÑEZ; DE MIGUEL-MARTINEZ, 2019; NORMAND et al., 2020; PINTO et al., 2011). De acordo com os resultados observados, os valores de corte

das pontuações dos escores poderiam ser reduzidos para 1.5 sem comprometer a precisão das identificações (MALDONADO et al., 2018), quando equiparados com os resultados do subcultivo. Se aplicada a redução de escore na análise retrospectiva do estudo, isso possibilitaria a extensão da identificação correta do protocolo rápido a 215 de 232 episódios de fungemia (92,7%).

Foram observadas duas limitações relacionadas ao protocolo direto já descritas na literatura. Uma delas é a baixa sensibilidade e especificidade na identificação direta de dois patógenos simultaneamente em amostras clínicas. Esta limitação é relatada em outros estudos, quando a identificação é realizada diretamente de amostras de sangue. Para o diagnóstico de hemoculturas polimicrobianas apenas em 10 a 30 por cento dos casos foram possíveis a identificação dos dois patógenos simultaneamente. Nestes casos, os picos espectrais podem ser atribuídos à espécie que apresenta maior proporção volumétrica de células na amostra clínica. O *software* também apresenta dificuldade em combinar espectros mistos e correlacionar com a biblioteca, tendendo a gerar picos para o microrganismo em maior quantidade (DIXON et al., 2015; FARON; BUCHAN; LEDEBOER, 2017; MÖRTELMAIER et al., 2019).

A segunda limitação do protocolo direto observada é a identificação de leveduras com pontuações de escore  $< 1.7$ . Este fato pode estar associado ao processo de comparação dos espectros de massa. As cepas de referências caracterizadas e armazenadas no banco de dados podem não proporcionar resultados de identificações ideais, pois fatores de crescimento do microrganismo e a variabilidade interespecies entre as cepas testes e cepas de referência podem refletir variações na análise espectral (WIEME et al., 2014). A abundância de proteínas de células humanas também é um fator limitante, pois no processo de identificação ocorre a ionização sem discriminação das células humanas e o patógeno, diminuindo a sensibilidade por contaminação dos picos espectrais (LUETHY; JOHNSON, 2019). A estrutura celular espessa e reforçada com quitina é outro fator limitante para a lise celular diretamente de amostras clínicas, tornando a disponibilidade de biomoléculas baixa (KOCUREK et al., 2020). Condições relacionadas ao tempo de incubação e meio de cultura utilizado para isolamento da levedura podem afetar diretamente o desempenho de identificação diretamente do sangue. Os frascos de hemoculturas utilizados no estudo continham partículas de carbono em sua composição, sendo estes fatores reconhecidos como interferentes na análise espectrométrica (QUILES MELERO et al., 2016; SILLER-RUIZ et al., 2017).

O isolado *Cryptococcus neoformans* obteve pontuação  $< 1.7$  na identificação do protocolo rápido. Quando submetido ao subcultivo obteve pontuação satisfatória para

identificação. Esse fato pode estar associado a questões fenotípicas inerentes a este gênero, como a presença de cápsula na estrutura celular, o que dificulta o acesso a biomoléculas específicas para identificação de espectros diretamente do sangue. A extração de proteínas com protocolos específicos é recomendada para o gênero *Cryptococcus sp.* em casos onde não se alcança pontuações satisfatórias de identificação (WALSH; MCCARTHY, 2019). Taverna e colaboradores sugerem a criação de um banco de dados estendido com cepas regionais para a otimização da identificação em nível de espécie e corroboram a adoção da pontuação de escore  $\geq 1.7$  para este gênero (TAVERNA et al., 2019). Durante o período de análise do estudo a biblioteca espectral apresentava 76 MSPs para o gênero *Cryptococcus sp.*, sendo 23 MSPs específicos para a espécie *C. neoformans*.

O gênero *Trichosporon sp.* também não obteve pontuação satisfatória para identificação direta no protocolo rápido. Durante o período do estudo foram atribuídos 68 MSPs para este gênero, sendo 11 MSPs específicos para *T. asahii*. Bonifaz e colaboradores relataram que diferentes estágios de maturação das leveduras levam a alterações nas estruturas de reprodução de acordo com o envelhecimento da cepa. Para as cepas de *Trichosporon sp.* podem ocorrer formação abundante de hifas e/ou artroconídios, caracterizando mais de um estágio de maturação do fungo, o que pode alterar a reprodutibilidade e pareamento dos espectros com o banco de dados (BONIFAZ et al., 2019).

A metodologia de MALDI-TOF MS foi implementada nas rotinas dos laboratórios de microbiologia devido a eficácia, agilidade e tempo mínimo de manejo. Os resultados fornecidos para a identificação de espécies de leveduras são válidos em 99 por cento das identificações. Entretanto, seu desempenho está associado a bibliotecas espectrais robustas, uma vez que a quantidade e variabilidade de MSPs está estreitamente relacionada ao êxito das identificações, sendo a construção de um banco de dados interno uma alternativa para obtenção de melhores rendimentos quanto à identificação a nível de espécie (CEBALLOS-GARZÓN et al., 2019; OVIAÑO; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2021). A criação de um banco de dados interno melhora o desempenho de identificação e correlação dos espectros (TAVERNA et al., 2019), assim como a escolha da matriz utilizada no processo de identificação afeta diretamente quais serão os metabólitos ionizados. Costa e colaboradores relataram que a matriz CHCA, utilizada no estudo, ioniza uma variedade maior de biomoléculas, o que pode otimizar o perfil de identificação (COSTA et al., 2019).

Em relação a avaliação do protocolo rápido por ano de ocorrência, foi observado em 2016 as maiores médias de escore e porcentagem de acerto. Esse resultado pode estar associado

à equipe operante do instrumento, bem como treinamento técnico e tempo de interação com a técnica aplicada. Foram observados através de registros técnicos uma regularidade maior de profissionais no desempenho desta rotina neste ano. O ano de 2012 não apresentou pontuação de escore  $\geq 1.7$  na aplicação do protocolo rápido. Esse fato pode ser justificado pelo ano de introdução da técnica empiricamente na rotina de hemoculturas, sendo realizada em concomitância com treinamentos relacionados ao protocolo e manuseio do MALDI-TOF MS.

O histórico clínico infeccioso dos pacientes não obteve significância estatística quando relacionado à pontuação de identificação dos isolados. Uma limitação do estudo foi a falta de acesso aos dados clínicos relacionados às prescrições de terapias medicamentosas e tempo de exposições às mesmas. Este fato pode estar associado à análise de diferentes ordens etiológicas dos pacientes, sendo um grupo com alto grau de heterogeneidade e diversas terapias antimicrobianas instituídas. A exposição à terapia antimicrobiana e tensões produzidas pelo microambiente do hospedeiro modificam a arquitetura da parede celular fúngica, criando cepas mutantes que expressam diferentes níveis de composições celulares, incluindo alterações nos níveis de peptídeos e proteínas, sendo estas as principais biomoléculas analisadas pela metodologia de MALDI-TOF MS (JANG; KIM, 2018; JENSEN, 2016; LIMA; COLOMBO; DE ALMEIDA JUNIOR, 2019; SATISH et al., 2019).

## 7 CONCLUSÃO

- A análise retrospectiva da aplicação do protocolo rápido para o diagnóstico de ICS por fungos leveduriformes demonstrou as vantagens da identificação precoce dos episódios de fungemia. Houve otimização em pelo menos 24 horas do tempo de diagnóstico clínico em 38,7% dos casos, sendo a notificação clínica da espécie realizada para a equipe médica em aproximadamente quarenta minutos após a positividade da hemocultura, evidenciando a importância da técnica do protocolo rápido aplicada diretamente na rotina do laboratório clínico.
- Além de rápido, o protocolo apresenta custos significativamente baixos em comparação com *kits* comerciais disponíveis no mercado. Para a implementação da técnica durante o período analisado foi necessária apenas a obtenção do insumo saponina, sendo os demais usualmente utilizados na rotina de identificação do laboratório.
- O treinamento da equipe refletiu diretamente no desempenho da aplicação do protocolo.
- Desenvolvimento de um Procedimento Operacional Padrão (POP) descrevendo toda a metodologia e aplicabilidade da técnica (Apêndice C).
- Desenvolvimento de uma Cartilha de Trabalho explicativa com os procedimentos básicos de notificações e registro de valores críticos (Apêndice D).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P. A. D. F. DE et al. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 59, p. e13, 13 abr. 2017.
- ARASTEHFAR, A. et al. Comparison of 21-Plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA Sequencing for a Wide Range of Clinically Isolated Yeast Species: Improved Identification by Combining 21-Plex PCR and API 20C AUX as an Alternative Strategy for Developing Countries. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 21, 2019.
- ARASTEHFAR, A. et al. Drug-Resistant Fungi: An Emerging Challenge Threatening Our Limited Antifungal Armamentarium. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 877, 8 dez. 2020.
- ARAUJO, M. R. E. DE. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. v. 1, n. 1, 2012.
- ARENDRUP, M. C. et al. ESCMID<sup>†</sup> and ECMM<sup>‡</sup> joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 76–98, abr. 2014.
- ATKINSON-DUNN, R.; DUNNE, M. WM. Conventional Blood Culture Methods. In: **The Dark Art of Blood Cultures**. Washington, DC.: American Society of Microbiology, 2017. p. 21–38.
- AZANZA PEREA, J. R. Equinocandinas: aspectos aplicados de la farmacología. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 3, p. 140–144, jul. 2016.
- BARCHIESI, F. et al. Candidemia in the elderly: What does it change? **PloS One**, v. 12, n. 5, p. e0176576, 2017.
- BASSETTI, M. et al. Diagnosis and Treatment of Candidemia in the Intensive Care Unit. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 40, n. 4, p. 524–539, ago. 2019.
- BELLANGER, A.-P. et al. Rapid identification of *Candida* sp. by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to short-term incubation on a solid medium. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 127, n. 4, p. 217–221, abr. 2019.
- BELLMANN, R.; SMUSZKIEWICZ, P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, v. 45, n. 6, p. 737–779, dez. 2017.
- BEN NEJI, H. et al. *Geotrichum capitatum* fungemia in patients treated for acute leukemia. **Medecine Et Maladies Infectieuses**, v. 49, n. 4, p. 284–286, jun. 2019.



BENITEZ, L. L.; CARVER, P. L. Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. **Drugs**, v. 79, n. 8, p. 833–853, jun. 2019.

BHATT, M. et al. Biofilm as a virulence marker in *Candida* species in Nosocomial blood stream infection and its correlation with antifungal resistance. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 112, 2015.

BONIFAZ, A. et al. Evaluación de MALDI-TOF MS para la identificación de levaduras patógenas oportunistas de muestras clínicas. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 6, p. 790–793, dez. 2019.

BORGHI, E.; BORGIO, F.; MORACE, G. Fungal Biofilms: Update on Resistance. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 931, p. 37–47, 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Brasília: [s.n.]. v. Módulo VII

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Corrente Sanguínea - Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde**Anvisa, , 2009.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Orientações para Prevenção de Infecção Primária de Corrente Sanguínea**.Anvisa, , 2010.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **PROGRAMA NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (2016-2020)**, 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2017a.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES N° 05/2017. Orientações para a notificação nacional das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), Resistência Microbiana (RM) e monitoramento do consumo de antimicrobianos - 2018**Anvisa, , 2017b.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde**. [s.d.].

BRIXNER, B. et al. Infecções da corrente sanguínea em unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo em um hospital de ensino. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 87, n. 25, 11 abr. 2019.

BUETTI, N. et al. COVID-19 increased the risk of ICU-acquired bloodstream infections: a case-cohort study from the multicentric OUTCOMEREA network. **Intensive Care Medicine**, v. 47, n. 2, p. 180–187, fev. 2021.

CANDEL, F. J. et al. Current aspects in sepsis approach. Turning things around. **Revista Espanola De Quimioterapia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Quimioterapia**, v. 31, n. 4, p. 298–315, ago. 2018.

CANTÓN-BULNES, M. L.; GARNACHO-MONTERO, J. Practical approach to the management of catheter-related bloodstream infection. **Revista Espanola De Quimioterapia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Quimioterapia**, v. 32 Suppl 2, p. 38–41, set. 2019.

CASSAGNE, C. et al. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. **Mycoses**, v. 59, n. 11, p. 678–690, nov. 2016.

CASTRO, L. L. et al. Prevalence of fungemia in a tertiary hospital: Analysis of the last decade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 4, p. 315–319, jul. 2016.

CATALDO, M. A. et al. Incidence of bacterial and fungal bloodstream infections in COVID-19 patients in intensive care: An alarming “collateral effect”. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 23, p. 290–291, dez. 2020.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Healthcare-associated Infections (HAI) Progress Report.**, 2016.

CEBALLOS-GARZÓN, A. et al. Comparison between MALDI-TOF MS and MicroScan in the identification of emerging and multidrug resistant yeasts in a fourth-level hospital in Bogotá, Colombia. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 106, 23 maio 2019.

CHAMBERLAND, R. R. Bactec Blood Culture Systems. In: DUNNE, JR., WM. M.; BURNHAM, C.-A. D. (Eds.). **The Dark Art of Blood Cultures**. Washington, DC.: American Society of Microbiology, 2017. p. 59–83.

CHERKAOUI, A. et al. Rapid identification by MALDI-TOF/MS and antimicrobial disk diffusion susceptibility testing for positive blood cultures after a short incubation on the WASPLab. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1063–1070, jun. 2020.

CHIEN, J.-Y. et al. Applicability of an in-House Saponin-Based Extraction Method in Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Bacterial and Fungal Species in Positively Flagged Blood Cultures. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1432, 2016.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, maio 2013.

COSTA, M. S. et al. Minimizing Taxonomic and Natural Product Redundancy in Microbial Libraries Using MALDI-TOF MS and the Bioinformatics Pipeline IDBac. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 8, p. 2167–2173, 23 ago. 2019.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G. Candida albicans Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 154, 22 jan. 2020.

DAI, Y. et al. Evaluation of a Rapid and Simplified Protocol for Direct Identification of Microorganisms From Positive Blood Cultures by Using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 632679, 2021.

DAMJI, R.; MUKHERJI, A.; MUSSANI, F. Sporobolomyces salmonicolor: A case report of a rare cutaneous fungal infection. **SAGE open medical case reports**, v. 7, p. 2050313X19844154, 2019.

DAS, S. et al. Identification and broth-microdilution antifungal susceptibility testing of yeast directly from automated blood cultures. **Future Microbiology**, p. 1453–1464, 12 nov. 2020.

DE ALMEIDA, J. N. et al. Emergence of Candida auris in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 220, 17 mar. 2021.

DE CAROLIS, E. et al. Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1453–1458, maio 2014.

DE PLATO, F. et al. Collection, transport and storage procedures for blood culture specimens in adult patients: recommendations from a board of Italian experts. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 57, n. 11, p. 1680–1689, 25 out. 2019.

DELAVY, M. et al. Investigating Antifungal Susceptibility in Candida Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 19, 2019.

DELPORT, J. A. et al. MALDI-ToF short incubation identification from blood cultures is associated with reduced length of hospitalization and a decrease in bacteremia associated mortality. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 7, p. 1181–1186, jul. 2017.

DI GAUDIO, F. et al. Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with Sepsityper kit. **Journal of Microbiological Methods**, v. 155, p. 1–7, dez. 2018.

DÍAZ, N. A. et al. Candidemia: características en los adultos mayores. **Revista chilena de infectología**, v. 37, n. 3, p. 288–294, jun. 2020.

DIXON, P. et al. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 863–876, maio 2015.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DOUGLAS, A. P.; CHEN, S. C.-A.; SLAVIN, M. A. Emerging infections caused by non-Aspergillus filamentous fungi. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 670–680, ago. 2016.

ECDC, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Healthcare-associated infections.**, 2016.

ENOCH, D. A. et al. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1508, p. 17–65, 2017.

EPELBAUM, O.; CHASAN, R. Candidemia in the Intensive Care Unit. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 493–509, set. 2017.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 2, p. 65–82, 2015.

FALCONER, K.; HAMMOND, R.; GILLESPIE, S. H. Improving the recovery and detection of bloodstream pathogens from blood culture. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 806–811, jun. 2020.

FARIAS, C. H.; GAMA, F. O. DA. Prevalência de infecção relacionada à assistência à saúde em pacientes internados em unidade de terapia intensiva. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 10, n. 3, 7 jul. 2020.

FARON, M. L.; BUCHAN, B. W.; LEDEBOER, N. A. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3328–3338, 2017.

FEUGRAY, G. et al. Successful treatment of Trichosporon asahii fungemia with isavuconazole in a patient with hematologic malignancies. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2015–2018, 2019.

FLORIO, W. et al. Recent advances in the microbiological diagnosis of bloodstream infections. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 351–370, 4 maio 2018.

FORD, B.; KALLSTROM, G. The bioMérieux BacT/Alert: Automation at Last in the Black Box. In: DUNNE, JR., WM. M.; BURNHAM, C.-A. D. (Eds.). . **The Dark Art of Blood Cultures**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2017. p. 85–111.

FRANCO RODRÍGUEZ, A. P. et al. Infecções fúngicas emergentes: Fungemia por *Sporobolomyces salmonicolor*. Reporte de un caso. **Infectio**, v. 14, p. 193–196, dez. 2010.

FREEMAN WEISS, Z.; LEON, A.; KOO, S. The Evolving Landscape of Fungal Diagnostics, Current and Emerging Microbiological Approaches. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 2, p. 127, 9 fev. 2021.

GARCEZ JUNIOR, E.; MARTINS, A. Estudo Comparativo dos Sistemas BacT/Alert e Hemobac Trifásico para realização de hemoculturas. **Revista do Biomédico**, 2003.

GAVRONSKI, S.; NOGUEIRA, K. DA S. Time to positivity: a useful parameter to evaluate intensive care unit blood stream infections? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 32, n. 2, 2020.

GIACOBBE, D. R. et al. Bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 10, p. e13319, out. 2020.

GOERING, R. V. et al. **Microbiologia Médica de Mims**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2014.

GOMES, A. A. G. et al. Infecções relacionadas à assistência em saúde em unidades de terapia intensiva no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 11, p. e4665, 26 nov. 2020.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5–10, jun. 2014.

GUISADO-GIL, A. B. et al. Impact of the COVID-19 Pandemic on Antimicrobial Consumption and Hospital-Acquired Candidemia and Multidrug-Resistant Bloodstream Infections. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 11, 17 nov. 2020.

HERB, A. et al. *Pseudozyma aphidis* fungemia after abdominal surgery: First adult case. **Medical Mycology Case Reports**, v. 8, p. 37–39, jun. 2015.

HU, Y.-L. et al. Applicability of an in-house saponin-based extraction method in Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identifying bacterial and fungal species in positively flagged pediatric VersaTREK blood cultures. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi**, v. 53, n. 6, p. 916–924, dez. 2020.

IATTA, R. et al. Blood culture procedures and diagnosis of *Malassezia furfur* bloodstream infections: Strength and weakness. **Medical Mycology**, v. 56, n. 7, p. 828–833, 1 out. 2018.

IBÁÑEZ-MARTÍNEZ, E.; RUIZ-GAITÁN, A.; PEMÁN-GARCÍA, J. Update on the diagnosis of invasive fungal infection. **Revista Espanola De Quimioterapia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Quimioterapia**, v. 30 Suppl 1, p. 16–21, set. 2017.

IDELEVICH, E. A. et al. Rapid identification and susceptibility testing of *Candida* spp. from positive blood cultures by combination of direct MALDI-TOF mass spectrometry and direct inoculation of Vitek 2. **PloS One**, v. 9, n. 12, p. e114834, 2014.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. **O que é Sepse**. Disponível em: <<https://ilas.org.br/o-que-e-sepse.php>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE - ILAS. **IMPLEMENTAÇÃO DE PROTOCOLO GERENCIADO DE SEPSE PROTOCOLO CLÍNICO**. 2018.

JANG, K.-S.; KIM, Y. H. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 56, n. 4, p. 209–216, abr. 2018.

JARDIM, J. M. et al. Avaliação das práticas de prevenção e controle de infecção da corrente sanguínea em um hospital governamental. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 47, n. 1, p. 38–45, fev. 2013.

JEDDI, F. et al. Performance assessment of two lysis methods for direct identification of yeasts from clinical blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. **Medical Mycology**, v. 55, n. 2, p. 185–192, 1 fev. 2017.

JENSEN, R. H. Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. **Danish Medical Journal**, v. 63, n. 10, p. B5288, out. 2016.

JOHANSSON, A. T. A.; WONG, A. Y. W.; ÖZENCI, V. The impact of delayed analysis of positive blood cultures on the performance of short-term culture followed by MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 177, p. 106027, out. 2020.

KALLEL, H. et al. Epidemiology and Prognosis of Intensive Care Unit-Acquired Bloodstream Infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 1, p. 508–514, jul. 2020.

KASSIM, A. et al. Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 128, 25 2017.

KIRN, T. J.; WEINSTEIN, M. P. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 513–520, jun. 2013.

KÖCK, R. et al. Implementation of short incubation MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures in routine diagnostics and effects on empiric antimicrobial therapy. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, p. 12, 2017.

KOCUREK, K. I. et al. Electroporation and Mass Spectrometry: A New Paradigm for In Situ Analysis of Intact Proteins Direct from Living Yeast Colonies. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 2605–2611, 4 fev. 2020.

KOTTHOFF-BURRELL, E. Candidemia (Blood Infection) and Other Candida Infections. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 200, n. 5, p. P9–P10, 1 set. 2019.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 8 out. 2015.

KUMAR, K. et al. Candida glabrata: A Lot More Than Meets the Eye. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, 30 jan. 2019.

LAMY, B. et al. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 12 maio 2016.

LAMY, B.; SUNDQVIST, M.; IDELEVICH, E. A. Bloodstream infections – Standard and progress in pathogen diagnostics. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 2, p. 142–150, fev. 2020a.

LAMY, B.; SUNDQVIST, M.; IDELEVICH, E. A. Bloodstream infections – Standard and progress in pathogen diagnostics. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 2, p. 142–150, fev. 2020b.

LEDOUX, M.-P. et al. New pharmacological opportunities for the treatment of invasive mould diseases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. suppl\_1, p. i48–i58, mar. 2017.

LEE, J. E. et al. Evaluation of modified saponin preparation method for the direct identification and antimicrobial susceptibility testing from positive blood culture. **Journal of Microbiological Methods**, v. 154, p. 118–123, nov. 2018.

LEONCIO, J. M. et al. Impacto das infecções relacionadas à assistência à saúde nos custos da hospitalização de crianças. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 53, p. e03486, 2019.

LIMA, S. L.; COLOMBO, A. L.; DE ALMEIDA JUNIOR, J. N. Fungal Cell Wall: Emerging Antifungals and Drug Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2573, 2019.

LINDBERG, E. et al. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3838, dez. 2019.

LONE, S. A.; AHMAD, A. *Candida auris* —the growing menace to global health. **Mycoses**, v. 62, n. 8, p. 620–637, ago. 2019.

LUETHY, P. M.; JOHNSON, J. K. The Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for the Identification of Pathogens Causing Sepsis. **The Journal of Applied Laboratory Medicine**, v. 3, n. 4, p. 675–685, jan. 2019.

MALDONADO, I. et al. Identificación de levaduras del género *Candida*: los métodos convencionales frente a MALDI-TOF MS. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 3, p. 151–154, jul. 2018.

MARTINEZ, R. M.; WOLK, D. M. Bloodstream Infections. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 18 ago. 2016.

MARTÍN-PUJOL, O.; TOSCO-NUÑEZ, T.; DE MIGUEL-MARTINEZ, I. Comparison of three procedures for the rapid identification of bacteraemia-causing microorganisms. Evaluation of their effectiveness and applicability to microbiology laboratories. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica (English Ed.)**, v. 37, n. 5, p. 319–323, maio 2019.

MATHUR, P. et al. Epidemiology of blood stream infections at a level-1 trauma care center of India. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 6, n. 1, p. 22–27, jan. 2014.

MCMULLEN, A. R.; WILEN, C. B.; BURNHAM, C.-A. D. Epidemiology of Bloodstream Infections. In: DUNNE, JR., WM. M.; BURNHAM, C.-A. D. (Eds.). . **The Dark Art of Blood Cultures**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2017. p. 163–181.

MENEZES, E. A. et al. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *Candida tropicalis* A ANTIFÚNGICOS SISTÊMICOS. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 1, 8 abr. 2013.

MILLER, J. M. et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. p. 94, 2018.

MORA CARPIO, A. L.; CLIMACO, A. Fungemia Candidiasis. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.

MORA CARPIO, A. L.; CLIMACO, A. Fungemia Candidiasis. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.

MÖRTELMAIER, C. et al. Identification performance of MALDI-ToF-MS upon mono- and bi-microbial cultures is cell number and culture proportion dependent. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 26, p. 7027–7038, out. 2019.

MÜLLER, G. G.; KARA-JOSÉ, N.; CASTRO, R. S. DE. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 72, n. 2, p. 132–141, abr. 2013.

MURRAY, P. R.; MASUR, H. Current approaches to the diagnosis of bacterial and fungal bloodstream infections in the intensive care unit. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 12, p. 3277–3282, dez. 2012.



- NADJM, B. et al. A randomised controlled trial of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDITOF-MS) versus conventional microbiological methods for identifying pathogens: Impact on optimal antimicrobial therapy of invasive bacterial and fungal infections in Vietnam. **Journal of Infection**, v. 78, n. 6, p. 454–460, jun. 2019.
- NOBREGA DE ALMEIDA, J. et al. *Trichosporon asahii* superinfections in critically ill COVID-19 patients overexposed to antimicrobials and corticosteroids. **Mycoses**, p. myc.13333, 16 jun. 2021.
- NOCUA-BÁEZ, L. C. et al. Azoles de antes y ahora: una revisión. **Revista chilena de infectología**, v. 37, n. 3, p. 219–230, jun. 2020.
- NORMAND, A.-C. et al. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 25, 31 jan. 2017.
- NORMAND, A.-C. et al. Optimization of MALDI-ToF mass spectrometry for yeast identification: a multicenter study. **Medical Mycology**, v. 58, n. 5, p. 639–649, 1 jul. 2020.
- NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 41, n. 4, p. 521–526, 15 ago. 2005.
- NUNES, J. M. et al. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 382–389, jan. 2013.
- OLIVEIRA, H. M. DE; SILVA, C. P. R.; LACERDA, R. A. Policies for control and prevention of infections related to healthcare assistance in Brazil: a conceptual analysis. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 3, p. 505–511, jun. 2016.
- OLIVEIRA, V. K. P. et al. FUNGEMIA CAUSED BY *Candida* SPECIES IN A CHILDREN'S PUBLIC HOSPITAL IN THE CITY OF SÃO PAULO, BRAZIL: STUDY IN THE PERIOD 2007-2010. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 301–305, jul. 2014.
- OMBELET, S. et al. Best Practices of Blood Cultures in Low- and Middle-Income Countries. **Frontiers in Medicine**, v. 6, p. 131, 18 jun. 2019.
- OSTHOFF, M. et al. Impact of MALDI-TOF-MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 78–85, fev. 2017.

OVIANO, M. Rapid identification of microorganisms directly from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica**, v. 37, n. 5, p. 287–289, maio 2019.

OVIANO, M.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica (English Ed.)**, v. 39, n. 4, p. 192–200, abr. 2021.

ÖZDEMİR, Z. C. et al. Fatal course of *Saprochaete capitata* fungemia in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 34, n. 2, p. 66–72, mar. 2017.

PAOLUCCI, M. et al. Comparison between MALDI-TOF MS and FilmArray Blood Culture Identification panel for rapid identification of yeast from positive blood culture. **Journal of Microbiological Methods**, v. 104, p. 92–93, set. 2014.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, p. civ933, 16 dez. 2015.

PATEL, R. A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 4, 3 jan. 2019.

PELOSO, P. F. D. et al. Identificação direta de patógenos em hemoculturas por MALDI-TOF. **Journal of Infection Control**, v. 2, 2013.

PILECKY, M. et al. Pathogen enrichment from human whole blood for the diagnosis of bloodstream infection: Prospects and limitations. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 94, n. 1, p. 7–14, maio 2019.

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, p. e25712, 2011.

PINTO-MAGALHÃES, S. et al. Candidemia in a Portuguese tertiary care hospital: Analysis of a 2-year period. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 29, n. 4, p. 320–324, dez. 2019.

POISSY, J. et al. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. **Critical Care (London, England)**, v. 24, n. 1, p. 109, 18 mar. 2020.

PONDERAND, L. et al. Evaluation of Rapid Sepsityper® protocol and specific MBT-Sepsityper module (Bruker Daltonics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-TOF-MS. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 60, 9 dez. 2020.

PRIGITANO, A. et al. Evolution of fungemia in an Italian region. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, n. 1, p. 100906, abr. 2020.

- PROWLE, J. R. et al. Acquired bloodstream infection in the intensive care unit: incidence and attributable mortality. **Critical Care**, v. 15, n. 2, p. R100, 2011.
- QUILES MELERO, I. et al. [Application of mass spectrometry in mycology]. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 34 Suppl 2, p. 26–30, jun. 2016.
- QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 42–48, jan. 2014.
- QUINTANO NEIRA, R. A.; HAMACHER, S.; JAPIASSÚ, A. M. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195873, 13 abr. 2018.
- RAMIREZ GALLEYMORE, P.; GORDÓN SAHUQUILLO, M. Antisepsia en la extracción de hemocultivos. Tasa de contaminación de hemocultivos. **Medicina Intensiva**, v. 43, p. 31–34, mar. 2019.
- REEVE, M. A. et al. A highly-simplified and inexpensive MALDI-TOF mass spectrometry sample-preparation method with broad applicability to microorganisms, plants, and insects. **Journal of Biological Methods**, v. 5, n. 4, p. e103, 2018.
- RESAR R et al. Using Care Bundles to Improve Health Care Quality. IHI Innovation Series white paper. **Institute for Healthcare Improvement**, 2012.
- RIPA, M. et al. Secondary infections in patients hospitalized with COVID-19: incidence and predictive factors. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 3, p. 451–457, mar. 2021.
- ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 753–775, 8 set. 2017.
- RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. et al. Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 4, 24 jan. 2019.
- ROEHMEL, J. F. et al. *Arxula adenivorans* causing invasive pulmonary mycosis and fungaemia in cystic fibrosis. **The Lancet**, v. 385, n. 9976, p. 1476, abr. 2015.
- ROMANIO, M. R. et al. FUNGEMIA POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM PACIENTE PEDIÁTRICO APÓS TRATAMENTO COM PROBIÓTICO. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 35, n. 3, p. 361–364, 31 jul. 2017.
- SAGHROUNI, F. et al. *Geotrichum capitatum* septicemia in patients with acute myeloid leukemia. Report of three cases. **Medical Mycology Case Reports**, v. 1, n. 1, p. 88–90, 2012.
- SALGÜERO FERNÁNDEZ, I. et al. Fungemia diseminada por *Saprochaete clavata*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 37, n. 4, p. 283–284, abr. 2019.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 369–379, fev. 2017.

SASSO, M. et al. Changes in the distribution of colonising and infecting *Candida* spp. isolates, antifungal drug consumption and susceptibility in a French intensive care unit: A 10-year study. **Mycoses**, v. 60, n. 12, p. 770–780, dez. 2017.

SATISH, S. et al. Stress-Induced Changes in the Lipid Microenvironment of  $\beta$ -(1,3)-d-Glucan Synthase Cause Clinically Important Echinocandin Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **mBio**, v. 10, n. 3, p. e00779-19, 4 jun. 2019.

SATOH, K. et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 41–44, jan. 2009.

SILLER-RUIZ, M. et al. Fast methods of fungal and bacterial identification. MALDI-TOF mass spectrometry, chromogenic media. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 35, n. 5, p. 303–313, maio 2017.

SILVA, ALINE CERQUEIRA SANTOS SANTANA DA; SANTOS, ÉRICK IGOR DOS; PENHA, RENATA SERRA; DUTRA, LUANA BORGES; BARREIROS, RAPHAEL NEVES; RIBEIRO, ISABELA VALENTE. Evidências científicas brasileiras acerca da infecção primária da corrente sanguínea em pediatria. v. 82(20), n. Rev. Enferm. Atual In Derme, 2017.

SILVA, A. G. DA; OLIVEIRA, A. C. DE. Impacto da implementação dos bundles na redução das infecções da corrente sanguínea: uma revisão integrativa. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 27, n. 1, 5 mar. 2018.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801, 23 fev. 2016.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Sepsis: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 207–216, jun. 2011.

SOUZA, E. S. et al. Mortality and risks related to healthcare-associated infection. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 220–228, mar. 2015.

TARAMASSO, L.; TATARELLI, P.; DI BIAGIO, A. Bloodstream infections in HIV-infected patients. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 320–328, 2 abr. 2016.

TAVERNA, C. G. et al. Development and validation of an extended database for yeast identification by MALDI-TOF MS in Argentina. **Medical Mycology**, v. 57, n. 2, p. 215–225, 1 fev. 2019.

- TEKIPPE, E. M.; PENCE, M. A. Lysis-Centrifugation Methods of Blood Culture. In: **The Dark Art of Blood Cultures**. Washington, DC.: American Society of Microbiology, 2017. p. 39–57.
- THORNTON, C. R. Detection of the “Big Five” mold killers of humans: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Lomentospora*, *Scedosporium* and *Mucormycetes*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 110, p. 1–61, 2020.
- TIMSIT, J.-F. et al. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 2, p. 266–284, fev. 2020.
- 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 (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 20, 17 out. 2020.
- VAN BELKUM, A. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues? **Annals of Laboratory Medicine**, v. 37, n. 6, p. 475–483, nov. 2017.
- VAN HERENDAEL, B. H. et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 841–848, maio 2012.
- VELEGRAKI, A. et al. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004523, jan. 2015.
- VIVAS, R. et al. Fungemia due to *Kodamaea ohmeri* in a young infant and review of the literature. **Medical Mycology Case Reports**, v. 13, p. 5–8, set. 2016.
- VLEK, A. et al. Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a yeast test panel. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 3023–3029, ago. 2014.
- WALSH, T. J.; MCCARTHY, M. W. The expanding use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectroscopy in the diagnosis of patients with mycotic diseases. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 3, p. 241–248, 4 mar. 2019.
- WATTAL, C.; GOEL, N. Pediatric Blood Cultures and Antibiotic Resistance: An Overview. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 2, p. 125–131, fev. 2020.
- WESTPHAL, G. A. et al. Characteristics and outcomes of patients with community-acquired and hospital-acquired sepsis. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 31, n. 1, 2019.

WIEME, A. D. et al. Effects of Growth Medium on Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time of Flight Mass Spectra: a Case Study of Acetic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1528–1538, 15 fev. 2014.

WILSON, M. L. Development of new methods for detecting bloodstream pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 3, p. 319–324, mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. p. 40, 2011.

WU, P.-F. et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-albicans *Candida* species from cancer patients. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 10, p. e87, 11 out. 2017.

YOSHIDA, T. et al. *Exophiala dermatitidis* Fungemia Diagnosed Using Time-of-flight Mass Spectrometry during Chemotherapy for Malignant Lymphoma and Successful Treatment with Voriconazole. **Internal Medicine**, v. 58, n. 15, p. 2219–2224, 1 ago. 2019.

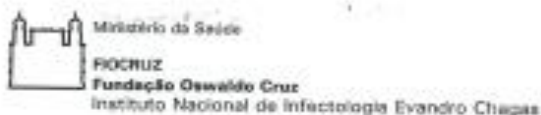
ZAVREL, M.; WHITE, T. C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1355–1373, 2015.

ZENG, Z. et al. A seven-year surveillance study of the epidemiology, antifungal susceptibility, risk factors and mortality of candidaemia among paediatric and adult inpatients in a tertiary teaching hospital in China. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 133, dez. 2020.

ZHANG, W. et al. Epidemiology, risk factors and outcomes of *Candida albicans* vs. non-albicans candidaemia in adult patients in Northeast China. **Epidemiology and Infection**, v. 147, p. e277, 25 set. 2019.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Termo de Compromisso e Responsabilidade



#### TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, Simone da Costa Cruz Silva, Coordenador do projeto de pesquisa intitulado "Padronização da espectrometria de massa MALDI TOF MS para a identificação rápida de fungos leveduriformes a partir de hemoculturas positivas", comprometo-me a manter a confidencialidade dos dados coletados, assim como a privacidade dos participantes do projeto.

A identidade dos participantes e os resultados obtidos com este projeto serão mantidos em um banco de dados sob a minha responsabilidade.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes, e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos com a devida aprovação pela Coordenação do CEP.

Rio de Janeiro, 18/11/19

Simone da Costa Cruz Silva  
Simone da Costa Cruz Silva  
Mat. SIAPE: 1901011  
CRBio 78676  
INI / FIOCRUZ

## APÊNDICE B – Termo de Anuência Institucional



### TERMO DE ANUÊNCIA INSTITUCIONAL

Prezado Doutor Helio Magarinos Torres Filho, Diretor Médico do Richet Medicina & Diagnóstico / Rede D'Or São Luiz,

Venho por meio deste solicitar a autorização desta instituição para a realização da pesquisa intitulada **PADRONIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI TOF MS PARA A IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE FUNGOS LEVEDURIFORMES A PARTIR DE HEMOCULTURAS POSITIVAS**, sob minha responsabilidade.

A pesquisa, realizada no âmbito do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) – Fiocruz, tem como objetivo padronizar e avaliar a aplicabilidade do protocolo de diagnóstico rápido por MALDI-TOF MS em infecções de corrente sanguínea por fungos leveduriformes, bem como avaliar a correlação entre o subcultivo microbiológico em meio sólido e o protocolo rápido de identificação. É prevista a realização da seguinte etapa metodológica no âmbito desta instituição: análise retrospectiva de cepas leveduriformes detectadas a partir de hemoculturas positivas de pacientes hospitalares e ambulatoriais recebidas e processadas na Microbiologia do Richet Medicina & Diagnóstico e Microbiologia Central Rede D'Or São Luiz.

Informo também que o projeto de pesquisa será avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) / Fiocruz e que a pesquisa só será iniciada após a sua aprovação por este comitê.

*Simone da Costa Cruz Silva*

Pesquisador Responsável

Declaro estar de acordo com a realização da pesquisa no âmbito desta instituição, desde que aprovada pelo comitê de ética.

Rio de Janeiro, 19/12/2019


*Helio Magarinos Torres Filho*  
Pediatria Clínica  
Medicina Laboratorial  
CRM 52.471/3-1




Responsável legal pela instituição



## APÊNDICE C - Procedimento Operacional Padrão - POP

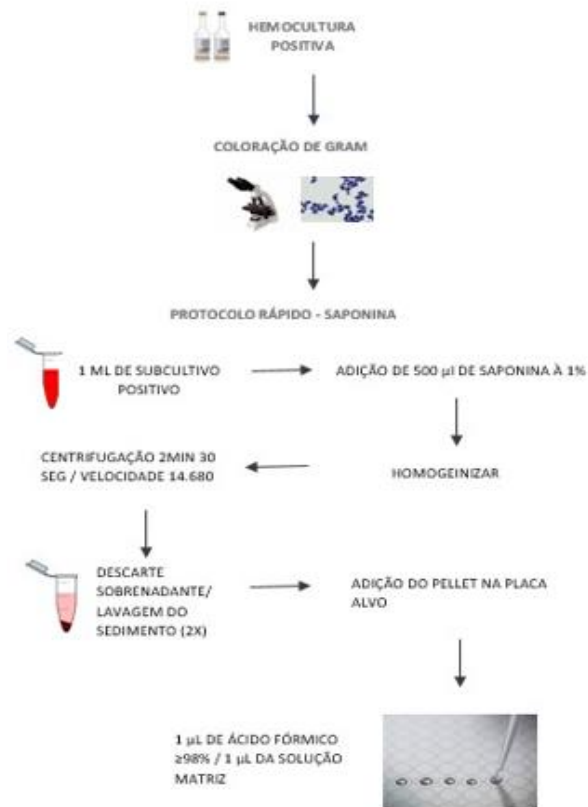
	<b>IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE LEVEDURAS A PARTIR DE HEMOCULTURAS POSITIVAS POR MALDI-TOF MS</b>	MIC005 V01
		ELABORADO: JULHO/2021
		Emissão: 06/07/21

<b>1.0 Aplicação Clínica</b>	Identificação de microrganismos para auxílio no diagnóstico etiológico de fungemias, infecções sistêmicas e outras entidades clínicas a partir de frascos de hemoculturas detectados como positivos pelo sistema de monitoramento contínuo automatizado Bactec® FX (Becton Dickinson).
<b>2.0 Princípios / Metodologia</b>	Identificação de microrganismos por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF MS), a partir de frascos de hemoculturas positivos através da aplicação do protocolo rápido de identificação.
<b>3.0 Definições e Siglas</b>	POP – Procedimento Operacional Padrão CIQ – Controle Interno da Qualidade
<b>4.0 Condições Gerais</b>	<p><b>4.1 – Amostras</b></p> <p>Frascos de hemoculturas do sistema Bactec® FX (Becton Dickinson) detectados como positivos pelo equipamento.</p> <p><b>4.2 – Frascos Adequados</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Frasco para Hemocultura Aeróbio Adulto BACTEC PLUS AEROBIC/F®</li> <li>• Frasco para Hemocultura Aeróbio Pediátrico BACTEC PEDS PLUS/F®</li> <li>• Frasco para Hemocultura Anaeróbio Adulto BACTEC PLUS ANAEROBIC/F®</li> <li>• Frasco para Micobactérias e Fungos BACTEC MYCO/F LYTIC</li> </ul> <div style="text-align: center;">  </div>
<b>5.0 Condições Específicas</b>	<p><b>5.1 – Reagentes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Álcool 70%</li> <li>• Solução de Saponina 1%</li> <li>• Ácido Fórmico 98%</li> <li>• Matriz HCCA</li> </ul>

	<p><b>5.2 – Estabilidade e Armazenamento</b></p> <p>De acordo com o rótulo dos reagentes e especificações do fabricante.</p> <p><b>5.3 – Preparação de Reagentes</b></p> <p>Consultar POP MIC 04 – PREPARO DE REAGENTES MALDI-TOF MS.</p> <p><b>5.4 – Equipamentos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrífuga</li> <li>• BACTEC® FX</li> <li>• MALDI TOF-MS</li> </ul> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">    </div> <p><b>5.5 – Materiais Utilizados</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipamentos de Proteção Individual</li> <li>• Frasco(s) de hemocultura(s) positiva(s) retirado(s) do equipamento Bactec®</li> <li>• Tubos Eppendorf® 2 ml contendo 0,5 ml de Saponina 1% previamente esterilizada (lotes controlados internamente)</li> <li>• Seringa 3 ml e agulha (para usar com a amostra de hemocultura)</li> <li>• Palitos de madeira</li> <li>• Água de injeção em flaconetes</li> <li>• Target</li> <li>• Pipeta</li> <li>• Ponteiras estéreis com barreira</li> <li>• Mapa de trabalho MALDI</li> </ul>
<p><b>6.0</b> <b>Procedimentos Detalhados</b></p>	<p><b>6.1 – Protocolo Rápido</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Desinfetar a tampa do(s) frasco(s) Bactec® positivos que foram recém-removidos do equipamento com álcool 70% e gaze. Homogeneizá-los por inversão;</li> <li>2) Transferir 1 ml da amostra de hemocultura positiva do frasco Bactec® para o tubo Eppendorf® contendo a Saponina a 1%, homogeneizar em vortex;</li> <li>3) Desprezar a seringa e agulha na caixa de perfuro cortante e deixar que a Saponina 1% atue por alguns minutos na amostra;</li> <li>4) Centrifugar por 2 minutos e 30 segundos a 14680 rpm na centrífuga Eppendorf® 5424;</li> </ol>

- 5) Desprezar o sobrenadante (decantando por inversão);
- 6) Desprender o “pellet” do fundo do tubo com auxílio de um palito de madeira;
- 7) Adicionar água para injeção até completar a marca de 1ml do tubo de Eppendorf®;
- 8) Levar o tubo ao vórtex até obter homogeneização total e dissolução do “pellet”;
- 9) Centrifugar novamente por 2 minutos e 30 segundos a 14680 rpm na centrífuga Eppendorf® 5424;
- 10) Decantar e desprezar o sobrenadante por inversão;
- 11) Desprender e dissolver o “pellet” com o auxílio de um palito de madeira (até dissolver completamente);
- 12) Com um novo palito de madeira, homogeneizar o “pellet” no fundo do tubo e transferir o material para target em duplicata;
- 13) Esperar secar naturalmente;
- 14) Cobrir com 1 microlitro de ácido fórmico 98%;
- 15) Esperar secar naturalmente;
- 16) Cobrir com 1 microlitro de matriz HCCA;
- 17) Proceder com a leitura no equipamento Maldi Microflex Biotyper.

## 6.2 – Fluxo de Trabalho – Protocolo Rápido



**7.0**

**Controle da Qualidade**

- Uso de Bacterial Test Standard (BTS)
- Controles Internos para Reagentes utilizados no procedimento do MALDI-TOF MS:

- CIQ 01 – Controle e Uso das Soluções MALDI
- CIQ 02 – Controle e Uso Matriz HCCA MALDI
- CIQ 03 – Controle e Preparo Lotes Saponina 1% MALDI

Núcleo: Microbiologia		Unidade:		Período: /20																											
CONTROLE DE UTILIZAÇÃO E TROCA DE REAGENTES MALDI-TOF																															
Procedimentos/Soluções	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1 Aliquotagem/Troca Acetonitrila 100%																															
2 Aliquotagem/Troca Etanol 100%																															
3 Aliquotagem/Troca Acido Fórmico 98%																															
4 Preparo/Troca Acido Trifluoroacético 80%																															
5 Preparo/Troca Etanol 70%																															
6 Preparo de Solvente Orgânico (OS)																															

CONTROLE DE PREPARO DE BTS (BACTERIAL TEST STANDARD)					
Data Preparo	# Lote BTS	Data Validade após preparo	Número de Tubos aliquotados	Técnico Responsável	Observações adicionais/Ocorrências e Ações Corretivas

Revisão Final: \_\_\_\_\_ Data Revisão Final: \_\_\_\_\_

Núcleo: Microbiologia		Unidade:		
CONTROLE DE PREPARO DE MATRIZ HCCA				
Data Preparo	# Lote Matriz HCCA	Data Validade após preparo	Técnico Responsável	Observações adicionais/Ocorrências e Ações Corretivas

Revisão Final: \_\_\_\_\_ Data Revisão Final: \_\_\_\_\_

	Núcleo: <b>Microbiologia</b> Unidade: _____																																																														
	Solução: SAPONINA 1% Finalidade: Técnica de MALDI-TOF em Hemoculturas Apresentação: Aliquotas de 1,5 ml em tubos criogênicos; Esterelizada por autoclavagem Tipo de Controle: Monitoramento do preparo de lotes																																																														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="7">CONTROLE DE PREPARO DE SOLUÇÃO DE SAPONINA 1% PARA MALDI</th> </tr> <tr> <th>Data do Preparo</th> <th>Fabricante # Lote Validade</th> <th># Lote interno Richet</th> <th>Responsável pelo preparo</th> <th>Data da validação</th> <th># Amostra usada para validação/microrganismo</th> <th>Observações/Ocorrências</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table> <p>Revisão Final: _____      Data Revisão Final: _____</p>	CONTROLE DE PREPARO DE SOLUÇÃO DE SAPONINA 1% PARA MALDI							Data do Preparo	Fabricante # Lote Validade	# Lote interno Richet	Responsável pelo preparo	Data da validação	# Amostra usada para validação/microrganismo	Observações/Ocorrências																																																
CONTROLE DE PREPARO DE SOLUÇÃO DE SAPONINA 1% PARA MALDI																																																															
Data do Preparo	Fabricante # Lote Validade	# Lote interno Richet	Responsável pelo preparo	Data da validação	# Amostra usada para validação/microrganismo	Observações/Ocorrências																																																									
<b>8.0 Resultado</b>	<p><b>8.1 – Interpretação</b></p> <p>Resultados de identificações de leveduras com pontuações de escores <math>\geq 1.7</math> são considerados aceitáveis, com no mínimo 4 repetições consecutivas para a mesma espécie na lista de correspondência do banco de dados.</p> <p><b>Nota:</b></p> <p><b>Sobre Análise de Consistência das Identificações Microbianas e Resultados Laboratoriais:</b></p> <p>As eventuais mudanças taxonômicas que sejam propostas e que possam potencialmente interferir nos resultados e escolha terapêutica de antimicrobianos utilizados no tratamento do paciente serão incorporadas pelo laboratório para a adoção de pontos de corte e critérios interpretativos.</p> <p>Os nomes de Gênero e/ou Espécie que sofrerem mudanças taxonômicas serão aplicados aos laudos do Setor de Microbiologia podendo haver impacto no grupo de antimicrobianos a ser reportado no teste de sensibilidade daquele microrganismo.</p> <p>As nomenclaturas taxonômicas só se tornam válidas a partir de suas publicações no International Journal of Systematic &amp; Evolutionary Microbiology (IJSEM).</p>																																																														
	<p><b>8.2 – Valores Críticos e Notificação Especial</b></p> <p>Reportar pelo telefone ao médico assistente ou ao plantonista da unidade de internação a identificação de microrganismos com valor em hemocultura com escores aceitáveis obtidos no equipamento de MALDI-TOF MS.</p> <p>Os resultados parciais de Hemoculturas Positivas são lançados no Sistema de Informática Laboratorial (SIL) – Módulo de Diligenciamento - Seção de “Notificação de Valores Críticos” (“NVC”) e transmitidos automaticamente via e-mail para a CCIH das Unidades Hospitalares.</p>																																																														

### 8.3 – Modelo de E-mail para Notificações de Valores Críticos

#### Destinatário

**Para: NVC Hemoculturas - CCIH**

#### **NOTIFICAÇÃO – VALORES CRÍTICOS**

Nome do Paciente:

Telefone do Paciente:

E-mail do Paciente:

Ordem de Serviço:

Médico(a) Requisitante:

Exame: Hemocultura

Material: Sangue Periférico ou Via Cateter

Data de Coleta:

Hora de Coleta:

Avisado por:

Avisado a:

Observação:

**Nota:** As informações e documentos que constam nesta mensagem eletrônica contêm dados de Saúde privilegiados que se destinam apenas ao uso do indivíduo ou instituições médicas correlatas. O destinatário autorizado está proibido a divulgar estas informações para qualquer outra parte não designada. Caso não seja o destinatário pretendido, considere-se aqui notificado da proibição contra qualquer divulgação, cópia ou distribuição do conteúdo desta mensagem e documentos anexados. Caso tenha recebido esta informação por engano, por favor notifique o remetente imediatamente e providencie a eliminação deste conteúdo.

<b>9.0</b> <b>Limitações do Método e de Detecção</b>	<b>Fatores Interferentes</b> Presença de >1 microrganismo em um único frasco de hemocultura; Determinados meios de cultura contendo substâncias interferentes podem resultar em escores inaceitáveis; Microrganismos que não constam no banco de dado do equipamento Bruker Maldi Microflex Biotyper. <b>Nota: Baixos escores de identificação podem ser atribuídos a fatores diversos, inerentes ou não ao método.</b>	
<b>10.0</b> <b>Biossegurança</b>	Ver Manual da Segurança Utilizar sempre EPI Utilizar sempre sapatos fechados Utilizar sempre cabelos presos Lavar as mãos ao calçar e retirar as luvas.	
<b>11.0</b> <b>Referências Bibliográficas/ Anexos</b>	Legislação vigente da SES – RDC 1213 e RDC 302 Critérios de certificação da Qualidade PALC / SBPC Critérios de certificação da Qualidade INMETRO Critérios de certificação da Qualidade – Norma Internacional 15189 Critérios de Biossegurança vide Manual da Segurança, identificado como NOR 006 MALDI TOF MS - Controle de Qualidade em Microbiologia Clínica	
<b>12.0</b> <b>Distribuição / Localização</b>	Uma cópia em rede da pasta do Setor de Microbiologia para todos os computadores através do Diretório <a href="#">\\srvnt24\Pop\Qualidade</a> do ano vigente.	
<b>13.0</b> <b>Elaboração</b>	<b>Nome</b>	<b>Data</b>
<b>Elaborado por:</b>	<b>Gabriela Souza de Castro</b>	<b>Julho 2021</b>
<b>Revisado por:</b>	<b>Cassiana da Costa Ferreira Leite</b>	<b>Julho 2021</b>
<b>Aprovado por:</b>	<b>Simone da Costa Cruz Silva</b>	<b>Julho 2021</b>

## APÊNDICE D - Cartilha de Trabalho

### ORIENTAÇÕES GERAIS SOBRE A IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE LEVEDURAS A PARTIR DE HEMOCULTURAS POSITIVAS POR MALDI-TOF MS



Resultados de identificações de leveduras com escores  $\geq 1.7$  são considerados aceitáveis, com no mínimo 4 repetições consecutivas para a mesma espécie na lista de correspondência do banco de dados.

Reportar pelo telefone ao médico assistente ou ao plantonista da unidade de internação a identificação de microrganismos com escores aceitáveis obtidos no equipamento de MALDI-TOF MS.

Registrar a notificação de Hemoculturas Positivas no Sistema de Informática Laboratorial (SIL) – Módulo de Diligenciamento - Seção de "Notificação de Valores Críticos" ("NVC") e transmitir automaticamente via e-mail para a CCIH das Unidades Hospitalares.



## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PADRONIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI TOF MS PARA A IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE FUNGOS LEVEDURIFORMES A PARTIR DE HEMOCULTURAS POSITIVAS

**Pesquisador:** Simone da Costa Cruz Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 26065019.0.0000.5262

**Instituição Proponente:** INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

**Patrocinador Principal:** INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.801.159

##### **Apresentação do Projeto:**

Resposta ao parecer Número: 3.766.961, referente ao projeto - PADRONIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI TOF MS PARA A IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE FUNGOS LEVEDURIFORMES A PARTIR DE HEMOCULTURAS POSITIVAS

##### **Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos não foram alterados em relação a primeira versão do projeto.

##### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios não foram alterados em relação a primeira versão do projeto

##### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A coordenadora da pesquisa incluiu na Plataforma Brasil a carta de anuência da Instituição Laboratórios Richet Medicina e Diagnóstico/Rede D'Or São Luiz, Dr. Helio Magarinos Torres Filho.

##### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os Termos de Apresentação obrigatória não foram modificados em relação a primeira versão. Não há outras considerações a serem feitas.

##### **Recomendações:**

Não há recomendações a serem feitas

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 3.801.159

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há inadequações a serem feitas

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1469414.pdf	20/12/2019 13:32:16		Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_institucional.pdf	20/12/2019 13:30:31	Simone da Costa Cruz Silva	Aceito
Outros	Resposta_ao_parecer_consubiado CEP_3766961.pdf	20/12/2019 13:27:38	Simone da Costa Cruz Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	25/11/2019 10:03:06	Simone da Costa Cruz Silva	Aceito
Outros	Termodecompromissoeresponsabilidade .pdf	25/11/2019 09:48:27	Simone da Costa Cruz Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODEDISPENSADOTCLE.pdf	25/11/2019 09:47:14	Simone da Costa Cruz Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_frente.pdf	25/11/2019 09:34:49	Simone da Costa Cruz Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 15 de Janeiro de 2020

---

Assinado por:  
Mauro Brandão Carneiro  
(Coordenador(a))