

Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Residência em Área Profissional da Saúde
Farmácia Análises Clínicas - Microbiologia

Otimização da rotina de hemoculturas positivas para *Candida* spp.: identificação pelo sistema automatizado MALDI-TOF VITEK MS[®] e determinação do perfil de sensibilidade diretamente do frasco de hemocultura.

Ândrea Celestino de Souza

Porto Alegre
2019

Ândrea Celestino de Souza

Otimização da rotina de hemoculturas positivas para *Candida* spp.: identificação pelo sistema automatizado MALDI-TOF VITEK MS[®] determinação do perfil de sensibilidade diretamente do frasco de hemocultura.

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Análises Clínicas como requisito parcial para conclusão da Residência em Área Profissional da Saúde – Análises Clínicas: Microbiologia.

Orientador: Doutora Dariane Castro Pereira

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Celestino de Souza, Ândrea

Otimização da rotina de hemoculturas positivas para *Candida* spp.: identificação pelo sistema automatizado MALDI-TOF VITEK MS® e determinação do perfil de sensibilidade diretamente do frasco de hemocultura. /

Ândrea Celestino de Souza. -- 2019.

40 f.

Orientador: Dariane Castro Pereira.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de
Clínicas de Porto Alegre, Residência em Área
Profissional da saúde - Farmácia Análises Clínicas -
Microbiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Candidemia. 2. MALDI- TOF. 3. Identificação
Rápida. 4. Frasco de Hemocultura. 5. Teste de
Sensibilidade Rápido. I. Castro Pereira, Dariane,
orient. II. Título.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Candidemia.....	4
2.2 Perfis de Sensibilidade.....	6
2.3 Diagnóstico Laboratorial das Leveduras.....	7
3. OBJETIVOS.....	9
3.1 Objetivo geral.....	9
3.2 Objetivos específicos.....	9
4. RESULTADOS.....	10
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
REFERÊNCIAS.....	29
ANEXO 1.....	35
ANEXO 2.....	36

1. INTRODUÇÃO

As infecções de corrente sanguínea causadas por espécies de *Candida* são cada vez mais frequentes em ambiente hospitalar atualmente, com incidência cinco vezes maior do que na última década e altas taxas de morbidade e mortalidade (1,2). Apesar dos avanços no tratamento de suporte e na farmacoterapia, a taxa de mortalidade pode atingir 50% dos pacientes infectados independente do seu estado imunológico (1,3,4).

De modo geral, a *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada nas hemoculturas positivas para fungos (entre 50 a 60%) (2,5,6) e possui alta sensibilidade ao fluconazol, antifúngico utilizado no Brasil e em outras partes do mundo como tratamento de primeira de escolha (7). No entanto, o aumento da prevalência de espécies de *Candida* não *albicans* é um fato preocupante conforme destacado por dados do Programa de Vigilância Antimicrobiana - SENTRY, pois essas espécies têm o potencial de causar surtos e são mais propensas a serem resistentes aos antifúngicos, principalmente ao Fluconazol, tornando a farmacoterapia empírica ineficaz (8–10).

A identificação rápida da espécie de *Candida* e a determinação do seu perfil de sensibilidade direcionam a farmacoterapia, melhorando o manejo dos pacientes infectados, possibilitando a redução de custos e o tempo de internação, principalmente se a espécie isolada for resistente à droga empírica utilizada (11–13). Um estudo de coorte retrospectivo realizado por Kollef e colaboradores, durante nove anos em um Hospital dos Estados Unidos com 1250 leitos, evidenciou que a taxa de mortalidade hospitalar para pacientes em choque séptico que tiveram a terapia antifúngica administrada dentro de 24 horas do início da candidemia foi de 52,8% (n = 142), comparada a uma taxa de mortalidade de 97,6% (n = 82) em pacientes que não tiveram essa administração, expondo o fato de que o início tardio da farmacoterapia adequada correlaciona-se com um aumento da taxa de mortalidade desses pacientes (14).

Uma das mais novas aquisições do laboratório de microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) foi o espectrômetro de massas MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry), equipamento ainda pouco utilizado no Brasil. Essa tecnologia identifica com precisão

e rapidez diversos microrganismos e representa uma alternativa para métodos convencionais mais demorados, baseados em reações metabólicas (15,16).

A escassez de estudos, principalmente de origem brasileira, para o desenvolvimento de diferentes protocolos de identificação pelo MALDI-TOF e determinação rápida do perfil de sensibilidade de *Candida* spp. diretamente do frasco de hemocultura culminou na necessidade da validação de tais *métodos in house*. Dessa maneira, os resultados poderão ser obtidos de forma mais breve e confiável, o que otimizará a rotina laboratorial na detecção de candidemias no Hospital de Clínicas de Porto Alegre acarretando na diminuição em mais de 24 horas no tempo de liberação dos resultados. Sendo assim, existe a possibilidade do direcionando mais rápido ao tratamento adequado contribuindo para o sucesso do manejo clínico, a melhoria na sobrevivência dos pacientes e a redução dos custos hospitalares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Candidemia

O termo candidemia refere-se a presença de células leveduriformes da espécie *Candida* spp. na corrente sanguínea e é a forma mais comum de candidíase invasiva (3). Está associada a altas taxas de mortalidade, levando até 50% dos pacientes infectados a óbito independente do seu estado imunológico, mesmo com a introdução de novos agentes antifúngicos (1,3,4). Estima-se que o custo de cada internação hospitalar por um episódio de candidemia seja de aproximadamente US\$ 40.000 (1).

A incidência de candidemias nosocomiais teve um incremento de cinco vezes na última década. No Brasil, a incidência é de 1,38 casos por 1000 internações, sendo considerado o quarto patógeno mais frequente em sepse nosocomiais na Europa (1,12,17). Este fato tem sido atribuído ao grande número de pacientes imunocomprometidos, como transplantados e portadores de imunodeficiências que são populações vulneráveis a esses patógenos oportunistas. Outro motivo que pode ser ressaltado para justificar o aumento nos casos de candidemia é o maior número de procedimentos invasivos aos quais os pacientes são submetidos (3,15).

Os principais fatores de risco associados à candidemia são o uso de antimicrobianos de largo espectro, tempo prolongado de internação hospitalar, nutrição parental total, sonda vesical de demora, hemodiálise, cateter venoso central, lesão de mucosas, cirurgia recente (principalmente procedimentos intra-abdominais maiores), idades extremas (prematuros e idosos), condições imunossupressoras (como por exemplo corticoterapia e neoplasias) e colonização de vários sítios anatômicos por leveduras (3,7).

Com o sistema imunológico debilitado ou com o rompimento da barreira física anatômica, ocorre um desequilíbrio entre os microrganismos que vivem comensalmente na microbiota tornando o meio propício para instalação da infecção. Para iniciar um processo patológico, a levedura precisa atravessar as barreiras biológicas como pele, trato respiratório, trato gastrintestinal e trato geniturinário e, para isso, expressam alguns fatores de virulência como a adesão, formação de biofilme, alterações fenotípicas e morfológicas, como a filamentação e secreção de enzimas, que resultam no início do processo patológico (18,19).

Existem cerca de 200 espécies distintas de *Candida*, porém mais de 90% das infecções de corrente sanguínea por células leveduriformes são causadas pelas espécies *C. albicans*, Complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (20). A *Candida albicans* é a principal levedura patogênica oportunista isolada em humanos, entretanto, as infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* têm apresentado aumento significativo (2,5,6). Nos Estados Unidos, um estudo de vigilância demonstrou que houve um aumento de 38% nas candidemias causadas por *Candida* não-*albicans* quando se comparado o início da década de 1990 e 2010 (21). No caso do Paquistão, segundo Farooqi e colaboradores, a espécie *C. tropicalis* é a predominante. As *Candidas* não *albicans* são mais propensas a serem resistentes a antifúngicos e têm o potencial de causar surtos, tornando-se uma preocupação em diferentes partes do mundo (8–10,17).

Segundo uma revisão realizada por Matta e colaboradores (22), as taxas de incidência de candidemia na América Latina oscilam entre 0,74 a 6,0 por 1000 internações hospitalares e a sua epidemiologia pode variar geograficamente, porém as espécies *C. albicans* (18,8% a 66%), *C. parapsilosis* (5% a 49%), *C. tropicalis* (9,7% a 39%) e *C. glabrata* (1% a 13,5%) foram as mais comumente isoladas em candidemias em todos os países da América Latina. No Brasil, Argentina e

Colômbia, foi observada um aumento na frequência da *C. glabrata* ao longo do período de estudo, e esse aumento tem um impacto clínico importante, pois essa levedura apresenta menor sensibilidade aos azólicos (22).

Recentemente relatos documentaram surtos de candidemia por *C. auris* em centros médicos da Venezuela e da Colômbia. Este microrganismo foi reconhecido como multirresistente, uma vez que todas as suas cepas são totalmente resistentes ao fluconazol e parte delas pode ser resistente a equinocandinas e/ ou anfotericina B (13,22). Segundo a Anvisa, esse patógeno ainda não foi isolado no Brasil, porém é possível que já esteja presente no país, pois muitas vezes pode ser identificado erroneamente em laboratórios de rotina. Apenas o sequenciamento genético e os equipamentos Bruker Biotyper MALDI-TOF (Daltonik GmbH, Leipzig, Alemanha) e Vitek MS com versão atualizada 3.2 (BioMérieux, França) são capazes de fazer a identificação correta, o que gera apreensão devido à sua evolução, perfil de resistência e propagação mundial (23–25).

2.2 Perfis de Sensibilidade

A introdução de drogas antifúngicas azólicas por via oral na década de 1980, particularmente o Fluconazol, foi um desenvolvimento significativo que permitiu o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas sem o efeito colateral da nefrotoxicidade associada ao tratamento com Anfotericina B. O Fluconazol é um antifúngico triazólico com menos efeitos adversos, possui alta biodisponibilidade e penetração tecidual (26). É o agente antifúngico mais comumente usado para profilaxia e tratamento de infecções por *Candida* em muitas partes do mundo (1), no entanto, períodos prolongados de tratamento podem induzir mutações que expressam resistência a esse antifúngico causando falhas no tratamento.

O perfil de sensibilidade aos antifúngicos varia de acordo com as espécies de *Candida*. As espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* são normalmente sensíveis aos principais antifúngicos utilizados para o tratamento da candidemia, já a *C. glabrata* possui um perfil menos susceptível, sendo naturalmente sensível dose dependente ao Fluconazol e com taxas crescentes de resistência às equinocandinas. A *C. parapsilosis* é menos suscetível às equinocandinas, enquanto a *C. krusei* geralmente é resistente ao Fluconazol (26).

Durante a revisão de Matta e colaboradores, foram encontradas taxas de resistência entre os isolados de *C. parapsilosis* variando entre 3,4% e 7,5% nos EUA e entre 0 e 6% na Europa, já a *C. tropicalis* apresentou taxas oscilando entre 2,4% e 11,6% nos EUA e de 1,7% a 22% na Europa. Na América Latina ressaltou-se um ligeiro aumento nos isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* exibindo um perfil não sensível ao Fluconazol, com taxas de resistência crescentes que aumentaram de 0,4% para 1,2% entre os isolados de *C. albicans*, de 0,5% para 2,3% entre os de *C. tropicalis* e de 0 para 2,6% entre os de *C. parapsilosis* (22).

Como evidenciado anteriormente, estudos relataram uma incidência crescente de infecções causadas por leveduras que adquiriram resistência ou são intrinsecamente resistentes ao medicamento em uso, o que é alarmante, pois as opções de antifúngicos são limitadas às classes de azóis, equinocandinas, polienos e flucitosina, e o surgimento da resistência limita severamente as opções farmoterapêuticas (27).

Com a crescente resistência das *Candida* spp., a determinação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos são fundamentais para que farmacoterapia seja conduzida de maneira segura, correta e eficaz. A Microdiluição em Caldo e o Disco Difusão, métodos mundialmente reconhecidos como de referência para antifungigrama, foram padronizados pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), em 1997, e aperfeiçoado em posteriores atualizações desse documento. Pelo antifungigrama é possível monitorar e detectar cepas de *Candida* spp. resistentes, auxiliando o clínico na escolha da terapia antifúngica adequada (20).

2.3 Diagnóstico Laboratorial das Leveduras

Como em qualquer processo infeccioso, a identificação oportuna do organismo infectante e a determinação do seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos auxilia no manejo bem-sucedido do paciente. A hemocultura continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico de infecções da corrente sanguínea. Em geral, nos laboratórios de microbiologia os frascos são incubados em sistema automatizado e, após a detecção de um frasco positivo, é retirado uma alíquota para a confecção de uma lâmina, corada pelo método de Gram. Quando são visualizadas células leveduriformes, é realizada uma subcultura em meio sólido a partir da qual, no dia seguinte, seguem-se testes bioquímicos ou um ensaios

enzimáticos automatizados para identificação e teste de sensibilidade (15). Todo o procedimento leva em média de 48 a 72 horas para ser concluído e possui limitações, já que essas metodologias necessitam de processos metabólicos do microorganismo para a obtenção do resultado de forma correta (28,29).

A introdução do espectrômetro de massas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight mass spectrometry) foi uma das maiores inovações tecnológicas dentro do setor de microbiologia. Em poucos anos deixou de ser uma novidade promissora, passando a ser uma tecnologia disponível e totalmente integrada na atividade clínica diária. Diversos estudos avaliaram o desempenho do equipamento MALDI-TOF na identificação de isolados de bactérias e leveduras a partir da cultura em meio sólido e todos obtiveram resultados com níveis de concordância superiores a 90% quando comparados a métodos moleculares. Quando a comparação foi feita entre o MALDI-TOF e os métodos bioquímicos e/ou o sistema Vitek, o MALDI-TOF obteve um melhor desempenho na identificação (16,30–32). Além do melhor desempenho, o equipamento necessita de menos insumos e, dessa forma, o volume de resíduos de risco biológico é reduzido em até 1/6 comparado aos produzidos usando métodos convencionais, sendo uma opção mais sustentável e com menor risco biológico (29).

O equipamento MALDI-TOF MS (bioMérieux, France) versão tem a capacidade de analisar um grande número de amostras simultaneamente (3 quadrantes com 16 amostras), quando usado em sua totalidade (um quadrante completo) gasta um tempo médio de um minuto para identificar cada isolamento, o que diminui em aproximadamente 28,8 horas o tempo de identificação total do microorganismo quando comparado aos métodos bioquímicos tradicionais, o que agiliza a liberação do resultado (11,16,33).

Um estudo realizado em um grande hospital utilizando 952 isolados clínicos determinou que o MALDI-TOF MS realizou a identificação de microorganismos 1,45 dias antes da metodologia padrão do laboratório e que a incorporação dessa tecnologia permitiu a redução de 52% nos custos de mão-de-obra e reagentes investidos na identificação de microorganismos por ano (33).

A identificação de microrganismos diretamente da hemocultura é uma das aplicações com maior impacto clínico em potencial da tecnologia MALDI-TOF MS, uma vez que contribui para o direcionamento correto da farmacoterapia de 24 a 48

horas antes da identificação tradicional baseada na subcultura do isolado. Diversos protocolos rápidos estão sendo validados para reduzir o tempo de identificação, porém precisam superar alguns desafios como a interferência dos componentes do sangue (eritrócitos, leucócitos e proteínas séricas) que se apresentam como contaminantes espectrais, podendo interferir no espectro e na correspondência de pico, e a necessidade de uma alta concentração de microrganismos para obter um bom espectro de proteínas, uma vez que MALDI-TOF MS requer cerca de 10^5 unidades formadoras de colônias para obter um espectro confiável e específico. O uso dessas novas metodologias tem se mostrado muito promissora, pois otimiza o tempo de liberação do resultado e, conseqüentemente, auxilia no aumento da sobrevivência dos pacientes e reduz os custos derivados da assistência à saúde (15,29).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral.

Desenvolver e validar método rápido para identificação e determinação do perfil de sensibilidade ao Fluconazol de espécies de *Candida* isoladas a partir de hemoculturas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a identificação direta de *Candida* spp. a partir de frascos de hemocultura positivas pelo sistema de espectrometria de massa de tempo de voo - desorção ionizante a laser assistida por matriz (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry - MALDI-TOF VITEK MS[®]).
- Determinar o perfil de sensibilidade ao Fluconazol de isolados clínicos de *Candida* spp pelo método rápido, diretamente do frasco de hemocultura, pela técnica de disco difusão.
- Comparar os resultados obtidos pelo método rápido com os obtidos pelos métodos padronizados na rotina laboratorial – identificação da *Candida* spp, Disco Difusão e Microdiluição em Caldo realizados a partir da colônia isolada em meio sólido após 24 horas de incubação.

4. RESULTADOS

Rapid methodologies: identifying *Candida spp.* and determining susceptibility profiles directly from the positive blood culture bottle.

Ândrea Celestino de Souza¹ and Dariane Castro Pereira ¹

¹ Unidade de Microbiologia, Serviço de Diagnóstico Laboratorial – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brasil

Address for correspondence:

Dariane Castro Pereira, PhD MD

Unidade de Microbiologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre –RS 90630000

Brasil

E-mail: darianepereira@hcpa.edu.br

Keywords: fluconazole, rapid identification method, blood culture, *Candida*.

ABSTRACT

Since early identification and determining the susceptibility profile of clinical isolates of blood culture *Candida* spp. is important for correctly guiding patient pharmacotherapy, the introduction of rapid protocols is necessary. The aim of this study was to compare the results of the Vitek MS MALDI-TOF system (Biomérieux, France) and fluconazole disk diffusion directly from the blood culture bottle with the results of standard methods. An aliquot of the blood culture bottle was sown directly in the culture medium to perform the susceptibility test and another aliquot underwent lysis-centrifugation processes to perform the identification test. Testing directly from the bottle would allow results 24 to 48 hours quicker than the standard method. There was a categorical agreement of 52% (47 of 91 samples) between results identified directly from the bottle and the standard method. Regarding species identification, there was 96% agreement for *Candida parapsilosis* (25 of 26 samples). Categorical agreement between the rapid and standard disk diffusion methods was 97%, and the agreement between the rapid disk diffusion method and broth microdilution was 98%. Only minor errors in the rapid method were observed: 3 (5%) with standard disk diffusion and 2 (3%) with broth microdilution. It can be concluded that rapid disk diffusion is a fast, easy, reproducible and consistent method, and its timely implementation in the clinical microbiology laboratory can help reduce profile release times, thus helping determine the most appropriate pharmacotherapy. However, the tested method for identifying *Candida* spp. directly from the blood culture bottle did not perform well and the search must continue for new methods.

INTRODUCTION

Bloodstream infections caused by *Candida* species are becoming increasingly common in hospitals, with a five-fold higher incidence than in the last decade, as well as high morbidity and mortality rates(1,2). The cost of each hospitalization for an episode of candidemia is approximately \$40,000, and despite advances in support treatment and pharmacotherapy, the mortality rate for infected patients can reach 50%, regardless of their immune status (1,3,4). In Brazil, the incidence is 1.38 cases per 1000 hospitalizations, with *Candida* spp. being considered the seventh most common pathogen in nosocomial sepsis (12,34).

There are about 200 distinct *Candida* species, but over 90% of bloodstream infections by yeast cells are caused by *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei* (20). *Candida albicans*, the main opportunistic pathogenic yeast in humans, however, infections by non-*albicans Candida* species have significantly increased (2,5,6). A U.S. population-based surveillance study demonstrated that, compared to the early 1990s and 2010, *Candida albicans* candidemia had decreased by 38% and non-*albicans* candidemia had increased (21). In Pakistan, Farooqi et al. (8) found that *C. tropicalis* is now the predominant species.

According to a review by Matta et al. (22), Latin American candidemia incidence rates range from 0.74 to 6.0 per 1000 hospital admissions, and their epidemiology can vary geographically, although *C. albicans* (18.8% to 66%), *C. parapsilosis* (5% to 49%), *C. tropicalis* (9.7% to 39%) and *C. glabrata* (1% to 13.5%) were the most commonly isolated species throughout Latin America. In Brazil, Argentina and Colombia, the frequency of *C. glabrata* increased during the study period (22). These changes are alarming because non-*albicans* species are more likely to resist antifungals and could potentially cause outbreaks. Thus they could have a major clinical impact and are becoming a concern in different parts of the world (8–10).

Fluconazole is a well-tolerated triazole antifungal with high bioavailability and tissue penetration (26). However, prolonged treatment could induce resistant mutations that lead to therapeutic failure, which is critical since fluconazole is the

most commonly used antifungal agent for the prophylaxis and treatment of *Candida* infections in many parts of the world. (1).

In a 9-year retrospective cohort study at a 1250-bed U.S. Hospital, Kollef et al. (14) found that the hospital mortality rate for septic shock patients who received antifungal therapy within 24 hours of candidemia onset was 52.8% (n = 142), compared to 97.6% (n = 82) in those who did not. Other studies have found that the 30-day survival rate of candidemia patients who receive appropriate pharmacotherapy was better than that of patients who received delayed or no treatment. These studies show that late initiation of adequate pharmacotherapy in infected patients correlates with an increased mortality rate (13,35,36). Thus, determining the susceptibility profile of *Candida* spp. is important, not only for guiding pharmacotherapy but for monitoring treatment efficacy and the emergence of resistance.

The introduction of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) has been a major technological innovation, revolutionizing clinical microbiology due to its short response time (about 24 hours) (15,16). MALDI-TOF is an easy, fast and cost-effective technology that enables reliable pathogen identification in a shorter time than traditional methods (11,16,33). A survey by Clerc et al. (37) at Lausanne University Hospital showed that pharmacotherapy was adjusted in 35.1% of the analyzed bacteremia cases and that hospitalization time was reduced by approximately two days when MALDI-TOF MS was implemented in blood culture processing.

Introducing rapid protocols to better identify and determine the susceptibility profiles of *Candida* spp. is the next major objective of clinical microbiology contributing to patient safety, which is defined by the Brazilian Ministry of Health as reducing the risk of unnecessary harm from health care to an acceptable minimum(38).

There are already different methods in experimentation and these results obtained faster than the traditional method are crucial for guiding pharmacotherapy, improving patient management, and reducing costs and length of stay, especially if the isolated species is resistant to the prescribed drug (11–13).

This study aimed to develop and validate a rapid method for identifying and determining the susceptibility profile of *Candida* spp. directly from blood culture

bottles in a routine clinical microbiology laboratory at a tertiary hospital in southern Brazil.

METHODOLOGY

Study Design

This study included positive blood cultures with yeast growth from patients treated at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre between September 2018 and September 2019. The samples were incubated in an automated BacT/ALERT[®] 3D system (bioMérieux, France). Polymicrobial blood cultures were excluded and we considered all samples of blood cultures for identification and only one sample per patient for the susceptibility test.

Standard Method for Identification and Susceptibility Testing

When a blood culture was detected as positive by BacT/ALERT[®]3D system (bioMérieux, France), it was Gram stained and subcultured in blood agar and Sabouraud agar. After 18-24 hours of incubation at 35 ° C, the colonies were identified with the Vitek MS[®] 3.0 system (bioMérieux, France) according manufacturer instructions. This method was considered standard identification. Colonies that had been cultured for 24 hours were used to determine the fluconazole susceptibility profile by performing a disk diffusion test according to CLSI M44-A2(39), which was considered the standard disk diffusion method. The isolates were classified as fluconazole susceptible, fluconazole susceptible-dose dependent, or resistant according to CLSI M44-A2 interpretation criteria. *Candida albicans* ATCC 90028 and *Candida tropicalis* ATCC 750 were used as quality controls for the method.

As a gold standard susceptibility test, the broth microdilution method was performed using colonies that had been incubated for 24 hours according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines(40) for fluconazole (Sigma-Aldrich). *Candida krusei* ATCC 6258 and *Candida parapsilosis* ATCC 90018 were used as quality controls for the method, and the isolates were

classified as fluconazole susceptible, fluconazole susceptible-dose dependent, or resistant according to the EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table 9.0 (41).

The results obtained with the standard method for identifying and determining the fluconazole susceptibility profile (standard disk diffusion method and broth microdilution) were used as reference for comparison in the data analysis.

Rapid method for identification and susceptibility testing

The rapid identification method was performed in duplicate according to a protocol proposed by Spanu et al. (42). An 8 mL aliquot of the blood culture bottle was removed and centrifuged at 10,000 rpm for 2 minutes at room temperature. The supernatant was discarded and the pellet was washed twice with 1 mL of sterile distilled water and then recentrifuged at 10,000 rpm for 2 minutes. The supernatant was discarded again and the pellet was suspended in 1 mL of 0.1% Tween 80 and further incubated for 2 minutes. The suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 2 minutes, the supernatant was discarded, and the pellet was washed twice with 1 mL of pure water and then recentrifuged at 10,000 rpm for 2 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was suspended in a solution of 300 µL sterile distilled water and 900 µL absolute ethanol. This suspension was centrifuged (1000 rpm for 2 minutes), the supernatant was discarded, and 30 µL 70% formic acid and 30 µL acetonitrile PA were added to the pellet. Finally, the solution was vortexed and centrifuged at 12,000 rpm for 2 minutes. Supernatant (1 µL) was applied to each slide spot (Vitek MS[®] DS - 1x32 SLIDEX). After allowing it to dry, 1 µL of the Matrix (a saturated solution of 50% α-cyano-4-hydroxycinnamic acid and 2.5% acetonitrile trifluoroacetic acid - Vitek MS[®] CHCA) was added, which was followed by analysis with the Vitek MS system (BioMérieux, France) for species identification by mass spectrometry.

The rapid disk diffusion method was performed by seeding, directly on the Muller-Hinton Agar with 2% dextrose and 0.5 µg/mL methylene blue, a 100 µL aliquot of blood taken from the yeast-positive blood culture bottle (6). After seeding, 2 fluconazole 25µg (Oxoid) impregnated filter paper discs were positioned at the center of the plate and incubated at 35°C for 24 hours. The halo was then measured and interpreted according to CLSI M44-A2 criteria, classifying the isolates as fluconazole

susceptible, fluconazole susceptible-dose dependent, or resistant. Quality control for the tests was performed with the *Candida albicans* ATCC 90028 and *Candida tropicalis* ATCC 750 strains.

The results were compared and analyzed with the kappa coefficient (43) and categorical agreement, considering $\leq 90\%$ an acceptable rate (44). Errors were classified into very major errors, major errors and minor errors, and the acceptable rates were considered $\leq 1.5\%$, $\leq 3\%$ and $\leq 10\%$, respectively (45).

RESULTS

A total of 91 blood samples from 46 patients admitted to the Hospital de Clinicas de Porto Alegre were analyzed for rapid identification method test. The Vitek MS system was used to perform both standard and rapid identification of the blood culture bottle for all samples. The overall agreement for the rapid methodology was approximately 52%. When *Candida* spp. were analyzed separately, *Candida parapsilosis* had the greatest agreement, identified in approximately 96% of the tested samples. No sample containing *Candida orthopsilosis* was identified, and the agreement for other species varied from 30 to 67% (Table 1).

A total of 62 samples was tested by standard disk diffusion method, the rapid disk diffusion method and broth microdilution to assess the Fluconazole susceptibility. Table 2 presents the susceptibility profile obtained by the Gold Standard method (broth microdilution) of the *Candida* species isolated in the study.

The minimum inhibitory concentration (MIC) found for *Candida* spp. ranged from 0.125 to 32.0 $\mu\text{g/mL}$, and the MIC 50 and MIC 90 obtained were 0.5 and 4.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. For *C. albicans* the MIC range was 0.125 to 1.0 $\mu\text{g/mL}$, and the MIC 50 and MIC 90 were 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and 1.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. For the *C. parapsilosis* complex, the MIC range was 0.25 to 4.0 $\mu\text{g/mL}$, and the MIC 50 and MIC 90 were 1.0 and 2.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Approximately 87% of *Candida* spp. samples were sensitive to fluconazole (all *C. albicans* and 80% of non-*albicans Candida* isolates).

The categorical agreement between the rapid disk diffusion method and the standard disk diffusion method was approximately 95% and involved 3 minor errors (5%) (Figure 1). The kappa coefficient ($K = 0.77$; $p < 0.001$) showed strong

agreement. The categorical agreement between the rapid disk diffusion method and the broth microdilution method was 97% and involved 2 minor errors (3%) (Figure 2). The kappa coefficient ($K = 0.86$; $p < 0.001$) showed an almost perfect agreement. A comparison of the results of the rapid disk diffusion method, the standard disk diffusion method and the broth microdilution methods (gold standard) is shown in Figures 1 and 2.

DISCUSSION

Compared to the results of Spanu et al., the overall identification rate for the rapid method was lower than expected (52%) (42). These authors used a Bruker Biotyper MALDI-TOF system (Daltonik GmbH, Leipzig, Germany) and obtained identification rates of 95.9% for *C. albicans* and 86.5% for non-*albicans Candida* species. This method was chosen for routine laboratory use because it had higher susceptibility and specificity than other methods described in the literature (46–48) and it has also been tested on a large number (340) of clinical isolates. In our test included only blood cultures from the microbiology laboratory: no artificially inoculated bottles were used in this study.

Although the method identified *Candida parapsilosis* well, it is not applicable for use in a routine microbiology laboratory because it is time consuming, expensive, has poor reproducibility with the Vitek MS system (bioMérieux, France), creates toxic waste, and its identification percentage for the most prevalent *Candida* spp. in a hospital setting is low.

However, the rapid disk diffusion method was reproducible, yielding concordant results and few errors compared to standard disk diffusion and broth microdilution. There were three minor errors compared to standard disk diffusion method involving the *C. parapsilosis* complex, two minor errors compared to broth microdilution involving *C. glabrata* and *C. parapsilosis*, no errors involving *C. albicans* isolates (which has the highest incidence in the hospital, 35%), and no errors involving *C. krusei* and *C. tropicalis*. Moreover, in this study the rapid disk diffusion method was more reliable for broth microdilution, which is the gold standard, than for the standard disk diffusion, resulting in a smaller number of errors, a higher kappa, and a higher categorical agreement rate.

The results indicate that the rapid diffusion disk test has promise in the microbiology laboratory, given that it can shorten the release of *Candida* spp. susceptibility profiles by up to two days. This test is practical, easy to use, inexpensive and rapid. It eliminates process steps, and interpreting halos is clearer and safer. Therefore, with the method, the halo is better delimited, which prevents conflicting results and interoperator error, as can be seen in Figure 3.

CONCLUSION

Since the results of the rapid identification test proved unsatisfactory, the search for new rapid methodologies must continue, because timely identification of *Candida* is extremely relevant in the hospital environment.

On the other hand, the rapid disk diffusion method can be considered an excellent alternative to the standard method currently used in microbiology laboratories. By releasing susceptibility profile results more quickly, harm from inappropriate and sometimes ineffective pharmacotherapy can be reduced, aiding in patient recovery and reducing mortality and length of stay contributing to better patient safety.

Acknowledgment: The authors would like to thank the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE/HCPA).

REFERENCES

1. Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol.* 2013 Dec;51(12):4167–72.
2. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, et al. Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med.* 2014 Sep;40(9):1303–12.
3. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med.* 2015 Oct 7;373(15):1445–56.
4. Moreno-Loaiza M, Moreno-Loaiza O. Características clínicas y epidemiológicas de la candidemia en pacientes de un hospital de tercer nivel del sur del Perú, 2011-2014. Vol. 34, *Acta Médica Peruana.* scielo; 2017. p. 289–93.
5. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Jun;20 Suppl 6:5–10.
6. Jabeen K, Kumar H, Farooqi J, Mehboob R, Brandt ME, Zafar A. Agreement of Direct Antifungal Susceptibility Testing from Positive Blood Culture Bottles with the Conventional Method for *Candida* Species. Diekema DJ, editor. *J Clin Microbiol.* 2016 Feb 1;54(2):343–8.
7. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J fungi (Basel, Switzerland).* 2017 Oct;3(4).
8. Farooqi JQ, Jabeen K, Saeed N, Iqbal N, Malik B, Lockhart SR, et al. Invasive candidiasis in Pakistan: clinical characteristics, species distribution and antifungal susceptibility. *J Med Microbiol.* 2013 Feb;62(Pt 2):259–68.
9. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* Bloodstream Infections: Comparison of Species Distributions and Antifungal Resistance Patterns in Community-Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Feb 1;55(2):561 LP – 566.
10. Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2016;5(1):35.

11. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Land GA, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Sep;137(9):1247–54.
12. Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Med*. 2014/08/01. 2014 Oct;40(10):1489–98.
13. Cortes JA, Reyes P, Gomez CH, Cuervo SI, Rivas P, Casas CA, et al. Clinical and epidemiological characteristics and risk factors for mortality in patients with candidemia in hospitals from Bogota, Colombia. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(6):631–7.
14. Kollef M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A. Septic Shock Attributed to Candida Infection: Importance of Empiric Therapy and Source Control. *Clin Infect Dis*. 2012 Mar 15;54(12):1739–46.
15. Buchan BW, Ledebor NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013 May;51(5):1359–66.
16. Buchan BW, Ledebor NA, Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, et al. Impact of Rapid Organism Identification via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Combined With Antimicrobial Stewardship Team Intervention in Adult Patients With Bacteremia and Candidemia. *Clin Infect Dis*. 2013 Jul 29;57(9):1237–45.
17. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373.
18. Cortés L JA, Russi N JA. Equinocandinas . Vol. 28, *Revista chilena de infectología* . scielocl ; 2011. p. 529–36.
19. Seghir A, Boucherit-Otmani Z, Belkherroubi-Sari L, Boucherit K. Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen: Épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. *J Mycol Med*. 2014;24(4):179–84.

20. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia . Vol. 46, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* . scielo ; 2010. p. 225–34.
21. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3435–42.
22. da Matta DA, Souza ACR, Colombo AL. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. *J fungi (Basel, Switzerland)*. 2017 May 17;3(2):24.
23. Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde GG de T em S de S e AN de VS. COMUNICADO DE RISCO N° 01/2017 – GVIMS/GGTES/ANVISA - Relatos de surtos de *Candida auris* em serviços de saúde da América Latina. 2017;1–26. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/458700/Comunicado+de+Risco+n°+01+2017+GVIMS-GGTES-Anvisa/1d23b200-5640-4aa3-a8e8-5239c8d2e000>
24. Chowdhary A, Voss A, Meis JF. Multidrug-resistant *Candida auris*: ‘new kid on the block’ in hospital-associated infections? *Journal of Hospital Infection*. 2016. p. 209–12.
25. Morales-López SE, Parra-Giraldo CM, Ceballos-Garzón A, Martínez HP, Rodríguez GJ, Álvarez-Moreno CA, et al. Invasive infections with multidrug-resistant yeast *Candida auris*, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*. 2017.
26. Peron IH, Reichert-Lima F, Busso-Lopes AF, Nagasako CK, Lyra L, Moretti ML, et al. Resistance Surveillance in *Candida albicans*: A Five-Year Antifungal Susceptibility Evaluation in a Brazilian University Hospital. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158126.
27. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017 Dec;17(12):e383–92.
28. Caspar Y, Garnaud C, Raykova M, Bailly S, Bidart M, Maubon D. Superiority of SDS lysis over saponin lysis for direct bacterial identification from positive blood culture bottle by MALDI-TOF MS. *Proteomics - Clin Appl*. 2017;11(5–6).

29. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 2018. p. 35–45.
30. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr 1;48(4):1169–75.
31. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2010;48(3):900–7.
32. McElvania TeKippe E, Burnham C-AD. Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Dec;33(12):2163–71.
33. Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on ti. *J Clin Microbiol*. 2012 Oct;50(10):3301–8.
34. Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. Chowdhary A, editor. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0146909.
35. Ghanem-Zoubi N, Zorbavel D, Khoury J, Geffen Y, Qasum M, Predescu S, et al. The association between treatment appropriateness according to EUCAST and CLSI breakpoints and mortality among patients with candidemia: a retrospective observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Dec;37(12):2397–404.
36. Puig-Asensio M, Peman J, Zaragoza R, Garnacho-Montero J, Martin-Mazuelos E, Cuenca-Estrella M, et al. Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med*. 2014 Jun;42(6):1423–32.
37. Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of

- matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis*. 2013 Apr;56(8):1101–7.
38. Ministério da Educação; Fundação Oswaldo Cruz; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Documento de referência para o Programa Nacional de Segurança do Paciente. 1st ed. Brasília - DF; 2014. 40 p.
 39. CLSI. M44-A2: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline—Second Edition. CLSI Doc. 2009;M44-A2(August):29(17).
 40. EUCAST. EUCAST antifungal MIC method for yeasts. EUCAST Defeinitive Doc EDEF 731. 2015;(December):1–21.
 41. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents-Breakpoint tables for interpretation of MICs, Version 9.0. 2018;4. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_9.0_180212.pdf
 42. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2011/11/16. 2012 Jan;50(1):176–9.
 43. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74.
 44. B. Patel J, Sharp S, Novak-Weekley S. Verification of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods: A Practical Approach. *Clin Microbiol Newsl*. 2013;35:103–109.
 45. International Organization for Standardization (ISO). ISO 20776-1:2006. Clinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Test Systems. Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial . 2007;1.
 46. Idelevich EA, Grunastel B, Becker K. Rapid Detection and Identification of Candidemia by Direct Blood Culturing on Solid Medium by Use of Lysis-

- Centrifugation Method Combined with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Clin Microbiol.* 2017 Jan;55(1):97–100.
47. Pulcrano G, Iula DV, Vollaro A, Tucci A, Cerullo M, Esposito M, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *J Microbiol Methods.* 2013 Sep 1;94(3):262–6.
 48. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas J-Y, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One.* 2010 Jan;5(1):e8862.

ANNEX

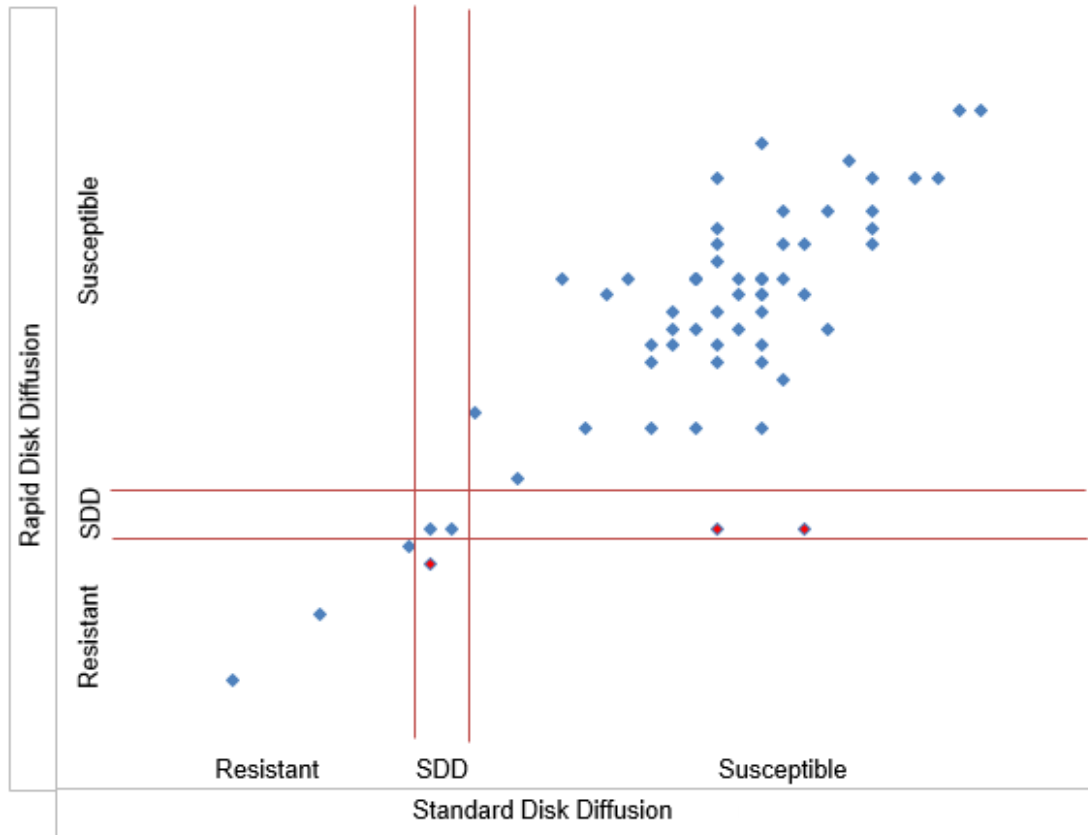
Table 1 - Yeasts identified directly from the blood culture bottle.

Standard Identification	Number of Isolates		% Agreement
	Total Tested	Identification Matching	
<i>Candida albicans</i>	28	14	50.00
<i>Candida glabrata</i>	3	2	66.67
<i>Candida krusei</i>	5	3	60.00
<i>Candida orthopsilosis</i>	16	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	26	25	96.15
<i>Candida pelliculosa</i>	3	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	10	3	30.00
Total	91	47	51.64

Table 2 - Distribution of *Candida* spp. and their fluconazole susceptibility profiles according to the gold standard (broth microdilution).

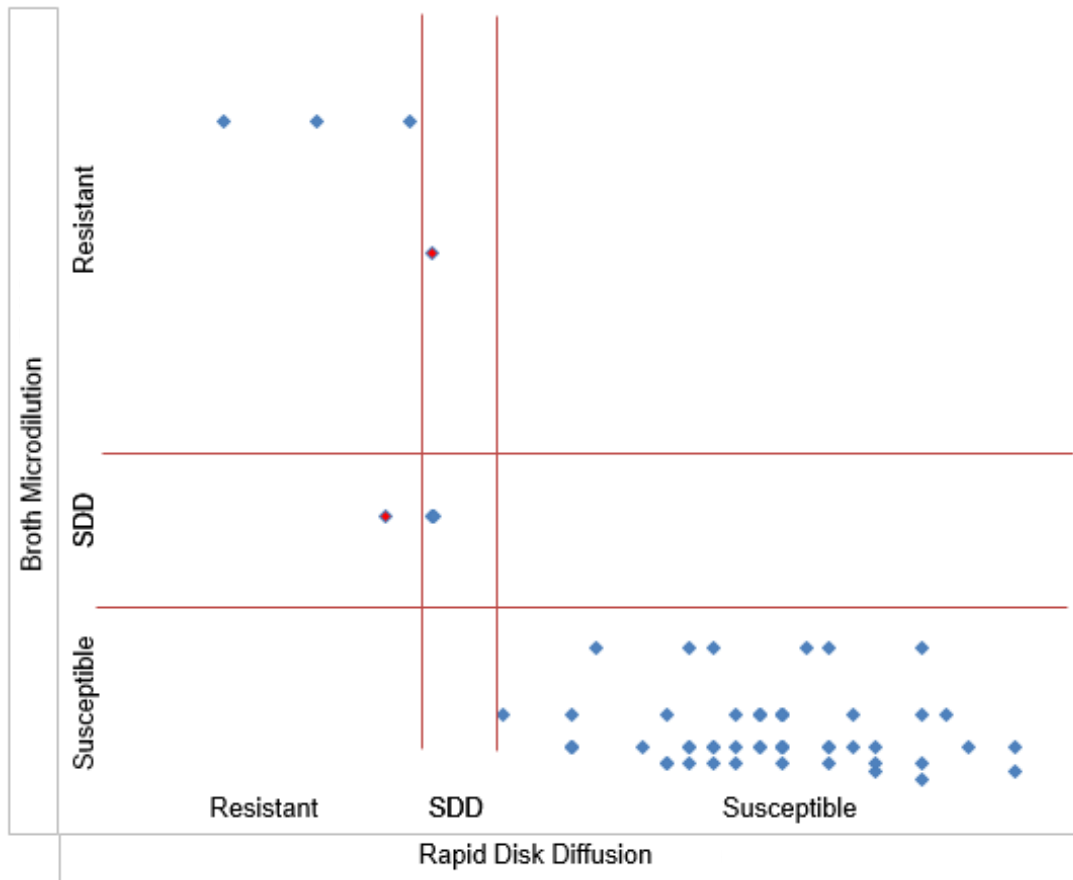
Species	Sensitive Isolates	Dose-Dependent isolates	Resistant isolates	Total isolates
<i>Candida albicans</i>	22	0	0	22
<i>Candida dubliniensis</i>	1	0	0	1
<i>Candida glabrata</i>	0	0	2	2
<i>Candida krusei</i>	0	0	2	2
<i>Candida orthopsilosis</i>	9	2	0	11
<i>Candida parapsilosis</i>	15	1	0	16
<i>Candida pelliculosa</i>	1	0	0	1
<i>Candida tropicalis</i>	6	1	0	7
Total	54	4	4	62

Figure 1 - Distribution of susceptible profiles according to the standard and rapid disk diffusion methods.



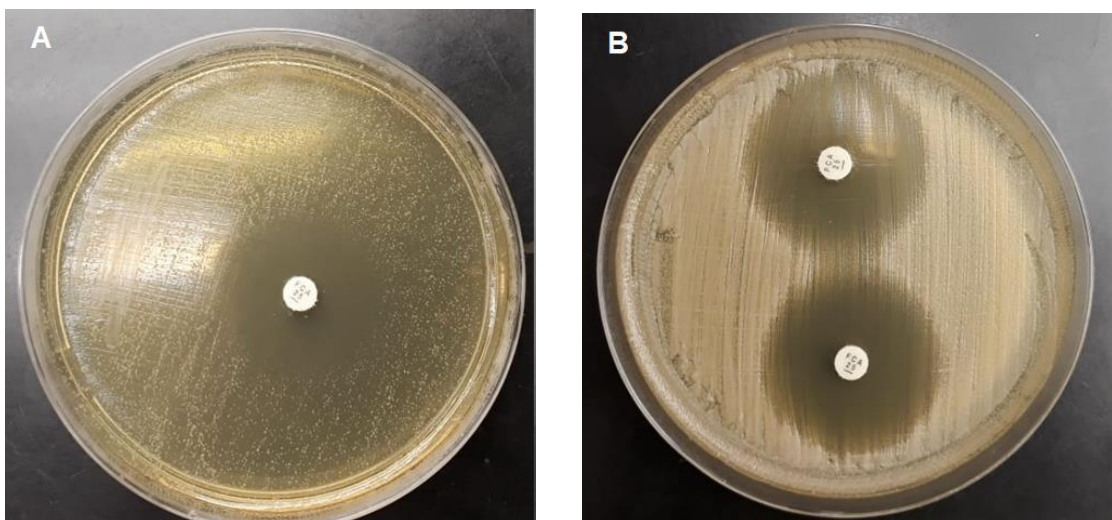
SDD: Fluconazole susceptible-dose dependent

Figure 2 - Distribution of susceptible profiles according to the broth microdilution method and the rapid disk diffusion method.



SDD: Fluconazole susceptible-dose dependent

Figure 3 - Comparison between standard disk diffusion (A) and rapid disk diffusion (B) results.



5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação e a determinação do perfil de sensibilidade precoce das *Candidas* presentes nas infecções de corrente sanguínea possui grande impacto no manejo clínico do paciente, por esse motivo é de extrema relevância que novas técnicas de identificação reprodutíveis, com níveis de concordância altos e fácil execução sejam desenvolvidas de forma que possa ser viável executá-las dentro rotina laboratorial hospitalar. Um novo projeto piloto já está sendo desenvolvido para suprir essa demanda importante e tem apresentado resultados promissores. Por fim, o teste de sensibilidade rápido se mostrou muito eficiente sendo promissor ao liberar os resultados de forma mais oportuna e a sua implementação na rotina do laboratório pode auxiliar na segurança do paciente.

Este trabalho busca encorajar uma postura mais ativa dos laboratórios clínicos na busca de metodologias para a liberação mais oportuna de resultados aproveitando melhor os recursos disponíveis e contribuindo para o desfecho clínico favorável dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol*. 2013 Dec;51(12):4167–72.
2. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, et al. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med*. 2014 Sep;40(9):1303–12.
3. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. 2015 Oct 7;373(15):1445–56.
4. Moreno-Loaiza M, Moreno-Loaiza O. Características clínicas y epidemiológicas de la candidemia en pacientes de un hospital de tercer nivel del sur del Perú, 2011-2014. Vol. 34, *Acta Médica Peruana*. scielo; 2017. p. 289–93.
5. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun;20 Suppl 6:5–10.

6. Jabeen K, Kumar H, Farooqi J, Mehboob R, Brandt ME, Zafar A. Agreement of Direct Antifungal Susceptibility Testing from Positive Blood Culture Bottles with the Conventional Method for *Candida* Species. Diekema DJ, editor. *J Clin Microbiol*. 2016 Feb 1;54(2):343–8.
7. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J fungi* (Basel, Switzerland). 2017 Oct;3(4).
8. Farooqi JQ, Jabeen K, Saeed N, Iqbal N, Malik B, Lockhart SR, et al. Invasive candidiasis in Pakistan: clinical characteristics, species distribution and antifungal susceptibility. *J Med Microbiol*. 2013 Feb;62(Pt 2):259–68.
9. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* Bloodstream Infections: Comparison of Species Distributions and Antifungal Resistance Patterns in Community-Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Feb 1;55(2):561 LP – 566.
10. Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016;5(1):35.
11. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Land GA, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Sep;137(9):1247–54.
12. Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Med*. 2014/08/01. 2014 Oct;40(10):1489–98.
13. Cortes JA, Reyes P, Gomez CH, Cuervo SI, Rivas P, Casas CA, et al. Clinical and epidemiological characteristics and risk factors for mortality in patients with candidemia in hospitals from Bogota, Colombia. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(6):631–7.
14. Kollef M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A. Septic Shock Attributed to *Candida* Infection: Importance of Empiric Therapy and Source Control. *Clin*

- Infect Dis. 2012 Mar 15;54(12):1739–46.
15. Buchan BW, Ledebor NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013 May;51(5):1359–66.
 16. Buchan BW, Ledebor NA, Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, et al. Impact of Rapid Organism Identification via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Combined With Antimicrobial Stewardship Team Intervention in Adult Patients With Bacteremia and Candidemia. *Clin Infect Dis*. 2013 Jul 29;57(9):1237–45.
 17. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373.
 18. Cortés L JA, Russi N JA. Equinocandinas . Vol. 28, Revista chilena de infectología . scielocl ; 2011. p. 529–36.
 19. Seghir A, Boucherit-Otmani Z, Belkherroubi-Sari L, Boucherit K. Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen: Épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. *J Mycol Med*. 2014;24(4):179–84.
 20. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia . Vol. 46, Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial . scielo ; 2010. p. 225–34.
 21. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3435–42.
 22. da Matta DA, Souza ACR, Colombo AL. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. *J fungi (Basel, Switzerland)*. 2017 May 17;3(2):24.
 23. Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde GG de T em S de S e AN de VS. COMUNICADO DE RISCO N° 01/2017 – GVIMS/GGTES/ANVISA - Relatos de surtos de *Candida auris* em serviços de saúde da América Latina. 2017;1–26. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/458700/Comunicado+de+Risco+n>

°+01+2017+GVIMS-GGTES-Anvisa/1d23b200-5640-4aa3-a8e8-5239c8d2e000

24. Chowdhary A, Voss A, Meis JF. Multidrug-resistant *Candida auris*: 'new kid on the block' in hospital-associated infections? *Journal of Hospital Infection*. 2016. p. 209–12.
25. Morales-López SE, Parra-Giraldo CM, Ceballos-Garzón A, Martínez HP, Rodríguez GJ, Álvarez-Moreno CA, et al. Invasive infections with multidrug-resistant yeast *Candida auris*, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*. 2017.
26. Peron IH, Reichert-Lima F, Busso-Lopes AF, Nagasako CK, Lyra L, Moretti ML, et al. Resistance Surveillance in *Candida albicans*: A Five-Year Antifungal Susceptibility Evaluation in a Brazilian University Hospital. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158126.
27. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017 Dec;17(12):e383–92.
28. Caspar Y, Garnaud C, Raykova M, Bailly S, Bidart M, Maubon D. Superiority of SDS lysis over saponin lysis for direct bacterial identification from positive blood culture bottle by MALDI-TOF MS. *Proteomics - Clin Appl*. 2017;11(5–6).
29. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 2018. p. 35–45.
30. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr 1;48(4):1169–75.
31. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2010;48(3):900–7.
32. McElvania TeKippe E, Burnham C-AD. Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Dec;33(12):2163–71.

33. Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2012 Oct;50(10):3301–8.
34. Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. Chowdhary A, editor. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0146909.
35. Ghanem-Zoubi N, Zorbavel D, Khoury J, Geffen Y, Qasum M, Predescu S, et al. The association between treatment appropriateness according to EUCAST and CLSI breakpoints and mortality among patients with candidemia: a retrospective observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Dec;37(12):2397–404.
36. Puig-Asensio M, Peman J, Zaragoza R, Garnacho-Montero J, Martin-Mazuelos E, Cuenca-Estrella M, et al. Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med*. 2014 Jun;42(6):1423–32.
37. Clerc O, Prod'homme G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis*. 2013 Apr;56(8):1101–7.
38. Ministério da Educação; Fundação Oswaldo Cruz; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Documento de referência para o Programa Nacional de Segurança do Paciente. 1st ed. Brasília - DF; 2014. 40 p.
39. CLSI. M44-A2: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline—Second Edition. *CLSI Doc*. 2009;M44-A2(August);29(17).
40. EUCAST. EUCAST antifungal MIC method for yeasts. *EUCAST Definitive Doc EDEF 731*. 2015;(December):1–21.
41. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents-Breakpoint tables for interpretation of MICs, Version 9.0. 2018;4. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_

- breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_9.0_180212.pdf
42. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2011/11/16. 2012 Jan;50(1):176–9.
 43. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 1977;33(1):159–74.
 44. B. Patel J, Sharp S, Novak-Weekley S. Verification of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods: A Practical Approach. *Clin Microbiol Newsl.* 2013;35:103–109.
 45. International Organization for Standardization (ISO). ISO 20776-1:2006. Clinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Test Systems. Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial . 2007;1.
 46. Idelevich EA, Grunastel B, Becker K. Rapid Detection and Identification of Candidemia by Direct Blood Culturing on Solid Medium by Use of Lysis-Centrifugation Method Combined with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Clin Microbiol.* 2017 Jan;55(1):97–100.
 47. Pulcrano G, Iula DV, Vollaro A, Tucci A, Cerullo M, Esposito M, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida* non-albicans isolates from bloodstream infections. *J Microbiol Methods.* 2013 Sep 1;94(3):262–6.
 48. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas J-Y, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One.* 2010 Jan;5(1):e8862.

ANEXO 1



**Termo de Compromisso para Utilização de
Material Biológico e Informações Associadas**

Título do Projeto	Cadastro no GPPG
Otimização da rotina de hemoculturas positivas para <i>Candida spp</i> pelo sistema automatizado MALDI-TOF VITEK MS [®] : identificação e determinação da concentração inibitória mínima aos antifúngicos diretamente do frasco de hemocultura	

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos estão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 07 de dezembro de 2018.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Andrea Celestino de Souza	
Dariane Castro Pereira	
Valério R. Aquino	

ANEXO 2

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Otimização da rotina de hemoculturas positivas para *Candida* spp pelo sistema automatizado MALDI-TOF VITEK MS ®: identificação e determinação da suscetibilidade aos agentes antifúngicos diretamente do frasco de hemocultura.

Pesquisador: Dariane Castro Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03241218.5.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.099.676

Apresentação do Projeto:

Estudo analítico experimental transversal vinculado a RIMS. Com o grande aumento na incidência de infecções de corrente sanguínea nosocomiais causadas por diversas espécies de *Candida* com perfis de resistência variados, faz-se necessária uma rápida identificação e determinação do perfil de sensibilidade dessas leveduras para o correto direcionamento da farmacoterapia. Uma das mais novas aquisições do laboratório de microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) foi o espectrômetro de massas MALDI TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry), equipamento ainda pouco utilizado no Brasil. Com o uso desse equipamento inovador e, com a busca de novos protocolos, é possível diminuir ainda mais o tempo de identificação das espécies causadoras de candidemias quando comparado ao método tradicional, o qual necessita do crescimento da colônia em meio sólido, assim como o método de determinação de seu perfil de sensibilidade. A escassez de artigos sobre novas metodologias de identificação, principalmente de origem brasileira, e a ausência de técnicas de determinação rápida do perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas em hemoculturas, culminou na necessidade do desenvolvimento e na validação de um método in house de identificação e determinação do perfil de sensibilidade de forma rápida e eficaz diretamente do frasco de hemocultura. Dessa maneira,

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.099.676

os resultados poderão ser obtidos de forma mais breve e confiável, otimizando a rotina laboratorial de candidemias no Hospital de Clínicas de Porto Alegre com a diminuição em mais de 24 horas no tempo de liberação dos resultados da cultura e perfil de sensibilidade. Sendo assim, existe a possibilidade do direcionando mais rápido ao tratamento adequado contribuindo para o sucesso do manejo clínico, a melhoria na sobrevida dos pacientes e a redução dos custos hospitalares

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral.

Desenvolver e validar método rápido para identificação e detecção do perfil de suscetibilidade de espécies de *Candida* isoladas a partir de hemoculturas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Objetivos específicos

- Realizar a identificação direta de *Candida* spp. a partir de frascos de hemocultura positivas pelo sistema de espectrometria de massa de tempo de voo - desorção ionizante a laser assistida por matriz (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry - MALDI-TOF VITEK MS®);
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) aos antifúngicos micafungina, posaconazol, voriconazol, caspofungina e fluconazol de isolados clínicos de *Candida* spp pelo método rápido, diretamente do frasco de hemocultura, bem como pelo método padrão, colônia isolada em subcultura, pela técnica de microdiluição em caldo;
- Caracterizar o perfil de suscetibilidade ao fluconazol de isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *C. tropicalis* pelo método rápido (diretamente do frasco de hemocultura) e pelo método convencional (colônia isolada em subcultura) pela técnica de disco difusão.
- Comparar os valores CIM obtidos pelo método rápido com os valores de CIM pelo método padrão e avaliar a concordância entre os métodos;
- Comparar o perfil de suscetibilidade ao fluconazol por disco difusão dos isolados de *Candida* spp. quando realizado diretamente do frasco e pelo método tradicional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229			
Bairro: Santa Cecília	CEP: 90.035-903		
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE		
Telefone: (51)3359-7640	Fax: (51)3359-7640	E-mail: cep@hcpa.edu.br	

Continuação do Parecer: 3.099.676

Este projeto envolve riscos mínimos, pois o estudo envolverá o uso de amostras biológicas no laboratório de microbiologia, não havendo a participação direta de pacientes. Haverá o risco de quebra de confidencialidade dos dados. Os pesquisadores assumem a responsabilidade de mantê-los e guardá-los sob sigilo e em anonimato.

Benefícios:

Avaliação e otimização das rotinas laboratoriais em hemoculturas positivas com o objetivo de diminuir o tempo total de liberação do resultado, possibilitando assim maior apoio a equipe assistencial para o manejo das Candidemias. Além disso, haverá um melhor aproveitamento de ferramentas diagnósticas disponíveis na Unidade de Microbiologia do HCPA (MALDI-TOF Vitek MS).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto interessante, com boa apresentação teórica. Vinculado a Residência em Análises Clínicas que propõe validação de metodologia para fazer identificação e perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de *Candida* spp.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCUMBIA.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.064.981 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 12/12/2018. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão do projeto de 12/12/2018 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

a) Este projeto está aprovado para inclusão de 147 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL**



Continuação do Parecer: 3.099.676

- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1222079.pdf	12/12/2018 18:40:07		Aceito
Cronograma	cronograma.docx	12/12/2018 18:38:30	ANDREA CELESTINO DE	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termo.pdf	12/12/2018 18:37:20	ANDREA CELESTINO DE SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TCR.docx	12/12/2018 18:36:08	ANDREA CELESTINO DE SOUZA	Aceito
Outros	Pendencias.docx	12/12/2018 18:35:54	ANDREA CELESTINO DE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO.pdf	24/09/2018 09:23:32	Dariane Castro Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JUSTIFICATIVA.doc	17/09/2018 21:25:17	Dariane Castro Pereira	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	17/09/2018 21:23:08	Dariane Castro Pereira	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.doc	17/09/2018 21:09:16	Dariane Castro Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.099.676

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 21 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br