



**M**

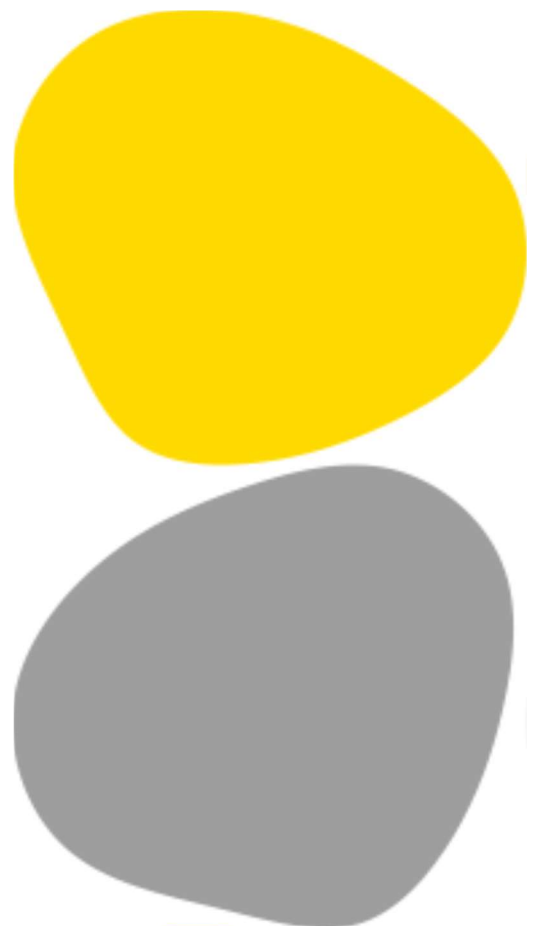
MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

# Identificação Direta de Microrganismos em Hemoculturas por espectrometria de massa - MALDI-TOF

Filipa Alexandra da Silva Alves

09/2025





SÃO JOÃO



CUIDADOS  
DE SAÚDE PRIMÁRIOS

## **Identificação Direta de Microrganismos em Hemoculturas por espectrometria de massa- MALDI TOF**

**Autor**

Filipa Alexandra da Silva Alves

**Orientador(es)**

Professora Doutora Cidália Pina Vaz, MD, PhD, CEO of FASTinov, FMUP

Doutor Edgar Botelho Moniz, MD, MBA, Patologista Clínico, ULS de São João, UNILABS

Professora Especialista em ACSP/Stephanie Lopes Ferreira/E2S-P.Porto

*Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** – **Ramo Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.*



Dissertação realizada com o apoio da empresa FASTinov®





## **Agradecimentos**

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Cidália Pina Vaz, o meu maior agradecimento por toda a disponibilidade e orientação prestada, pelo apoio e compreensão que sempre manifestou.

Ao Doutor Edgar Botelho Moniz, o meu maior agradecimento por toda a disponibilidade e incentivo.

À Professora Manuela Amorim pelo apoio, orientação, compreensão e disponibilidade.

À Professora Stephanie Ferreira pelo apoio, orientação, compreensão e disponibilidade.

Ao Professor Doutor Tiago Guimarães pelo apoio e disponibilidade.

Ao Doutor Paulo Leandro pelo apoio e disponibilidade.

Aos meus Pais, à minha irmã pelo apoio e coragem que sempre me transmitiram.

Ao meu marido, pela compreensão, dedicação e apoio.

Ao meu filho pela compreensão.

À Sónia Vieira pelo apoio e incentivo diário.

Por último, mas não menos importante, a todos os que comigo partilharam do seu saber e do seu tempo, para poder chegar até aqui: Ana Beatriz Festa, Mafalda Jacob, Joana Sampaio.



## Resumo

A sépsis, constitui uma condição clínica grave e potencialmente fatal. O diagnóstico etiológico é baseado na colheita de hemoculturas, mas devido à demora na obtenção do resultado, é necessário instituir terapêutica empírica. Atualmente, a terapêutica empírica pode falhar até 40% dos casos devido ao aumento das resistências aos antibióticos com graves consequências na morbimortalidade dos doentes. Os métodos microbiológicos convencionais nos laboratórios clínicos exigem um mínimo de 48 horas para fornecer um relatório clínico que oriente a terapêutica. Novos métodos estão a surgir, prometendo revolucionar o diagnóstico de sépsis, ao reduzir significativamente o tempo de resposta dos laboratórios de microbiologia clínica. A espectrometria de massa MALDI-TOF, surgiu como uma técnica revolucionária na microbiologia clínica, permitindo a identificação rápida e precisa de agentes etiológicos em cultura pura após o seu isolamento. A aplicação direta em hemoculturas positivas, evitando o tempo da subcultura, reduz significativamente o tempo de diagnóstico, em comparação com os métodos convencionais, providenciando a identificação em minutos.

A abordagem deste estudo foi delineada com o objetivo de determinar a concordância entre o método proposto e o método convencional assim com avaliar a reprodutibilidade e a repetibilidade do método proposto. Os resultados obtidos mostram a fiabilidade do método avaliado evidenciando uma elevada percentagem de concordância em relação ao método convencional.

**Palavras-chave:** Infecção da corrente sanguínea, Sépsis, Hemoculturas, Identificação microbiana, Espectrometria de massa.



## Abstract

Sepsis is a serious and potentially fatal clinical condition. The etiological diagnosis is based on blood culture collection, but due to the delay in obtaining results, empirical therapy is necessary. Currently, empirical therapy can fail in up to 40% of cases due to the increase in antibiotic resistance, with serious consequences for patient morbidity and mortality. Conventional microbiological methods in clinical laboratories require a minimum of 48 hours to provide a clinical report guiding therapy. New methods are emerging that promise to revolutionize sepsis diagnosis by significantly reducing the turnaround time of clinical microbiology laboratories. MALDI-TOF mass spectrometry has emerged as a revolutionary technique in clinical microbiology, enabling the rapid and accurate identification of etiological agents in pure culture after isolation. Direct application to positive blood cultures, avoiding the time required for subculture, significantly reduces diagnostic time compared to conventional methods, providing identification in minutes.

The approach of this study was designed to determine the agreement between the proposed method and the conventional method, as well as to evaluate the reproducibility and repeatability of the proposed method. The results obtained demonstrate the reliability of the evaluated method, demonstrating a high percentage of agreement in relation to the conventional method.

**Keywords:** Bloodstream infection, Sepsis, Blood cultures, Microbial identification, Mass spectrometry.



## Índice

1.Introdução .....	1
1.1. Infecções da corrente sanguínea .....	4
1.2. Impacto da terapêutica empírica.....	6
1.3. Hemoculturas: Princípios e desafios Laboratoriais.....	8
1.3.1 Inovação no Diagnóstico Microbiológico.....	12
1.3.2 Espectrometria de Massa: Maldi-TOF MS.....	14
2. Materiais e Métodos.....	17
2.1.Tipo de estudo.....	17
2.2. População e Amostra.....	17
2.3. Procedimento.....	17
2.4. Análise estatística .....	19
3. Resultados .....	21
3.1 Análise da Repetibilidade e Reprodutibilidade .....	25
4. Discussão .....	27
5. Conclusão.....	29
6. Referências Bibliográficas.....	30
Anexos .....	34



## Índice de Tabelas

Tabela 1- Comparação entre o método convencional e a identificação direta por MALDI-TOF .....	16
Tabela 2- Dados resumidos do estudo experimental.....	21
Tabela 3- Medida de concordância (Kappa de Cohen) .....	23
Tabela 4- Resultados intraensaio da identificação microbiana .....	25
Tabela 5- Medida de concordância entre ensaios.....	26
Tabela 6- Resultados interensaio da identificação microbiana .....	26



## Índice de Figuras

Figura 1–Evolução do conceito de sépsis.....	1
Figura 2–Evolução da taxa de incidência de bacteriemia de origem hospitalar .....	5
Figura 3–Procedimento de Colheita de Hemocultura .....	9
Figura 4–Equipamentos de incubação de hemoculturas .....	10
Figura 5–Subcultura de hemocultura em Gelose de sangue.....	10
Figura 6–Sistema de antibiograma automatizado Vitek2 vs antibiograma manual .....	12
Figura 7–Estrutura de um espectrómetro de massa.....	13
Figura 8–Metodologia MALDI–TOF MS.....	14
Figura 9–Resultados de Espectros de massas MALDI–TOF MS para <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Citrobacter sp. e Proteus</i> .....	15
Figura 10–Processamento das amostras utilizando o kit de extração da FASTinov® <b>Erro! Marcador não definido.</b>	



## Índice de Gráficos

Gráfico de Distribuição do tipo de hemoculturas analisadas; ANA-anaerobiose; AR-aerobiose; MIC-micológica.....	21
Gráfico 2 - Casos Concordantes vs Casos não Concordantes.....	22
Gráfico 3 - Tempo de positividade da totalidade das hemoculturas testadas .....	22
Gráfico 4 - Microrganismos Concordantes entre identificação direta e identificação pelo método convencional.....	23



## Lista de Siglas e Abreviaturas

ATCC - *American Type Culture Collection*

C - Concordante

CMI - Concentração mínima inibitória

ESBL - Betalactamase de Espectro Estendido

ICS - Infecções corrente sanguínea

MALDI-TOF MS - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massa por Desorção e Ionização a Laser Assistida por Matriz - Tempo de Voo)

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

N/C - Não Concordante

NGS - *Next Generation Sequencing*, ou Sequenciamento de Nova Geração

PCR - Proteína C reativa

PCT - Procalcitonina

PPCIRA - Programa Nacional para a Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos

SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistémica

SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*

SPC - Serviço de Patologia Clínica

SSC - Campanha Sobrevivendo à Sépsis

UCI - Unidade de Cuidados Intensivos



## 1. Introdução

A sépsis é uma condição clínica grave, de elevada prevalência e impacto socioeconómico, responsável por uma das principais causas de mortalidade em contexto hospitalar(1). Representa uma emergência médica cuja evolução rápida e potencialmente fatal exige reconhecimento precoce e intervenção imediata. Estima-se que milhões de novos casos ocorram anualmente em todo o mundo, com custos substanciais para os sistemas de saúde, associados a longos períodos de internamento, elevada taxa de complicações e sobrecarga dos serviços de saúde (1). Historicamente, a sépsis foi alvo de múltiplas redefinições, refletindo a complexidade do seu enquadramento clínico e fisiopatológico. Nesse contexto, três grandes conferências internacionais de consenso foram realizadas com o propósito de uniformizar conceitos, reduzir ambiguidades terminológicas e melhorar a aplicabilidade dos critérios diagnósticos na prática clínica (Figura 1).

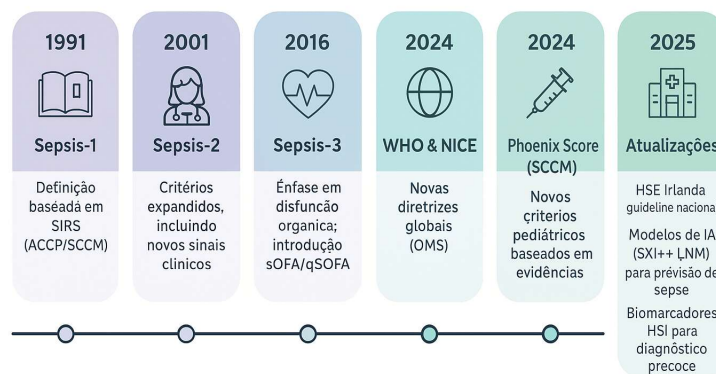


Figura 1–Evolução do conceito de sépsis (Imagem criada no Biorender.com).

A primeira conferência (Sepsis-1, 1991) representou um marco ao introduzir o conceito de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistémica (SIRS, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) e ao propor a primeira definição estruturada de sépsis, tendo sido propostos termos adicionais como sépsis grave, choque séptico e disfunção multiorgânica (1). Conceito como septicemia e síndrome séptico foram, entretanto, abandonados pela sua ambiguidade.

O modelo baseado em SIRS foi formalizado em 2001 (revisto em 2003) na *International Sepsis Definitions Conference* (ISDC). O diagnóstico de sépsis era baseado na suspeita de uma infeção com evidência clínica ou microbiológica pela presença de pelo menos dois dos quatro critérios SIRS estabelecidos: temperatura corporal acima de 38 ° C ou abaixo de 36 ° C, frequência cardíaca maior que 90 batimentos por minuto, frequência respiratória maior que 20 batimentos por minuto ou pressão



parcial de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) abaixo de 4,3 kPa e neutrófila acima de 12000 por  $\text{mm}^3$  ou neutropenia abaixo de 4000 por  $\text{mm}^3$  com 10% ou mais de neutrófilos de sangue periférico não segmentados. Esta primeira definição de sépsis não era específica o suficiente para distinguir doentes com sépsis daqueles que tinham uma resposta inflamatória normal à infeção ou uma condição inflamatória não causada por infeção (2).

A definição de sépsis foi complementada por uma lista de indicadores clínicos e laboratoriais que tornaram mais fácil o diagnóstico. De acordo com esta definição, os doentes com sépsis eram agrupados de acordo com a gravidade da condição clínica: de septicemia a sépsis grave, seguida de falha da função de órgãos vitais e choque séptico como a forma mais grave de sépsis, na qual a hipotensão profunda era o sinal predominante. A nova definição ainda não resolveu o problema da especificidade, mas a incidência de sépsis e choque séptico aumentou significativamente. O aumento desta incidência deveu-se ao aumento de doentes com várias comorbilidades associadas e de imunocomprometidos, mas também à falta de especificidade da definição que inclui doentes com infeção não complicada. Por outro lado, seguir essas diretrizes forneceu tempo suficiente para a deteção oportuna da sépsis e inclusão precoce de terapia válida, o que foi extremamente importante na prevenção da evolução dessa condição para sépsis grave e, especialmente, choque séptico, acompanhado por taxas de mortalidade significativamente mais altas (2).

Este modelo, embora pioneiro, revelou baixa especificidade, uma vez que não distinguia eficazmente entre resposta inflamatória fisiológica a infeção localizada e verdadeira sépsis, nem entre inflamação não infecciosa (ex.: trauma, pancreatite) e infeção sistémica. Este enquadramento resultou num sobre diagnóstico de sépsis, aumentando falsamente a sua incidência (2). Face às limitações do modelo baseado em SIRS, a ISDC propôs critérios mais operacionais e clínicos. Assim, em 2016, a publicação do Sepsis-3 representou um marco conceptual, adotando uma definição centrada na fisiopatologia do hospedeiro: "Sépsis é uma disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infeção". Nesta definição, a disfunção orgânica é objetivamente identificada através do *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)* score, sendo uma variação superior ou igual a 2 pontos associada a risco de mortalidade hospitalar superior a 10%. Paralelamente, para contextos não intensivos, foi introduzido o quick SOFA (qSOFA), uma ferramenta de triagem simples baseada em três parâmetros: frequência respiratória superior ou igual a 22 por min, pressão arterial sistólica inferior ou igual a 100 mmHg e alteração do estado mental (*Glasgow Coma Scale* inferior 15). Apesar de não substituir o diagnóstico formal de sépsis, o qSOFA permite identificar doentes com suspeita de infeção e maior risco de deterioração clínica, constituindo um alerta para avaliação aprofundada e tratamento



célere. As principais vantagens do qSOFA são a facilidade de medição, a dispensa de realização de análises laboratoriais e a rapidez (2,3).

As mudanças mais importantes foram a eliminação dos termos "SIRS" e "sépsis grave". A falência de órgãos passa a ser considerada se houver uma mudança na avaliação sequencial de falência de órgãos relacionada à sépsis (SOFA), onde dois ou mais pontos estão associados a uma taxa de mortalidade hospitalar superior a 10%. E o choque séptico passou a ser caracterizado como um subtipo de sépsis, definido pela necessidade de vasopressores para manter pressão arterial média superior ou igual a 65 mmHg associada a lactato sérico superior a 2 mmol/L, após adequada reposição volêmica. Esta condição reflete uma instabilidade circulatória, celular e metabólica, associada a mortalidade superior a 40% (2,3).

A evolução conceptual da sépsis foi acompanhada por iniciativas globais, em particular a *Surviving Sepsis Campaign* (SSC), lançada em 2004 e atualizada regularmente nos anos 2008, 2012, 2016, 2018 e 2021. As suas diretrizes, sustentadas em evidência científica, definem intervenções clínicas padronizadas para diagnóstico precoce, início rápido da administração da terapêutica antimicrobiana, ressuscitação hemodinâmica e monitorização sistemática. Estas diretrizes, têm demonstrado impacto positivo na redução da mortalidade e na uniformização da prática clínica internacional (3).

Em síntese, a sépsis continua uma condição crítica, cuja deteção precoce e intervenção adequada são determinantes na redução da mortalidade. A integração de critérios clínicos, laboratoriais e microbiológicos é essencial para o diagnóstico oportuno e para a orientação terapêutica. Os sinais clínicos mais comuns destacam-se hipotermia, taquipneia, hipotensão e alterações do estado de consciência. Entre os parâmetros laboratoriais, a identificação de microrganismos na corrente sanguínea por hemocultura, caracterizando a infeção da corrente sanguínea (ICS), representa um contexto clínico de especial relevância. Embora a ICS não seja sinónimo de sépsis, a sua rápida deteção permite iniciar terapêutica antimicrobiana dirigida, prevenindo a evolução para choque séptico e disfunção orgânica grave. Adicionalmente, biomarcadores como proteína C reativa (PCR), procalcitonina (PCT) contribuem para uma avaliação do estado inflamatório. Novos biomarcadores como presepsina e citocinas estão a ser investigados para um diagnóstico rápido e mais preciso (1,3).



## 1.1. Infecções da corrente sanguínea

As ICS representam uma condição clínica grave caracterizada pela presença de microrganismos viáveis na circulação sistêmica, geralmente identificadas através de hemoculturas. As ICS podem ser causadas por bactérias, fungos e mais raramente por vírus. Podem ser classificadas, como: comunitárias, quando adquiridas na comunidade; infecções associadas aos cuidados de saúde, quando adquiridas 48 horas após o internamento; ou relacionadas com o uso de dispositivos médicos (4).

Uma das principais razões da importância clínica das ICS é a sua elevada mortalidade, particularmente quando o diagnóstico e a terapêutica não são estabelecidos de forma precoce. A progressão para choque séptico pode ocorrer rapidamente, culminando em disfunção orgânica múltipla e risco elevado de óbito. A incidência anual de ICS é estimada entre 113 e 204 episódios por 100.000 habitantes por ano, com variações conforme a região geográfica e a estrutura do sistema de saúde (4).

As ICS são causadas por microrganismos Gram positivo, Gram negativo a grande maioria e em menor percentagem por fungos como a *Candida spp.* (principalmente em doentes imunocomprometidos), o que dificulta o tratamento e piora o prognóstico(5) e também por microrganismos multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) ou carbapenemases (6).

A deteção do agente etiológico das ICS depende fundamentalmente de hemoculturas, cuja sensibilidade pode ser limitada por múltiplos fatores. Entre os mais relevantes destacam-se: baixa carga microbiana, volume de sangue colhido inferior ao recomendado pelas diretrizes, colheita de apenas uma hemocultura por episódio clínico, e realização da colheita após o início de antibioterapia empírica. Adicionalmente, variáveis logísticas, como o tempo de transporte e o período de incubação nos sistemas automatizados de deteção, podem afetar a positividade da cultura. Estas limitações têm impacto direto na precisão do diagnóstico microbiológico e podem condicionar significativamente o curso clínico e a escolha terapêutica do doente (5).

A resistência a antimicrobianos tem apresentado, em Portugal, desde 2013, tendência globalmente decrescente em termos dos microrganismos que são habitualmente monitorizados, sendo a rede de vigilância epidemiológica bastante larga e significativa. O decréscimo de resistência do *Acinetobacter* aos carbapenemos é significativo, diminuindo de 70% em 2013 para 15% em 2020. O decréscimo da taxa de resistência do *Staphylococcus aureus* à metilina é também importante, mas necessita de manutenção, uma vez que é ainda a 4.<sup>a</sup> mais elevada entre os 29 países europeus participantes na rede.



Preocupante é a evolução da taxa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenemos, que tem sido crescente, aumentando quase seis vezes nos últimos seis anos de 2,0 para 11,6%. (7).

A incidência de ICS é considerada um importante marcador de qualidade nos cuidados de saúde, variando de 15% a 30%, podendo ultrapassar 50% em casos de choque séptico (6).

Em Portugal, através do Programa VE-INCS, verificou-se entre 2015 e 2020, uma redução em 22,2% da taxa de incidência de bacteriemia adquirida no hospital por 1000 dias de internamento. A taxa de incidência de bacteriemia primária diminuiu em 33,3%, nesse mesmo período (7).

Segundo os dados do Relatório do Programa Prioritário PPCIRA de 2021, no período entre 2015 e 2020, verificou-se uma redução de 33,3% da taxa de incidência de bacteriemia primária por 1000 dias de internamento. Foi também possível verificar uma redução da taxa de incidência de bacteriemia por 1000 dias de CVC (Figura2) (8).

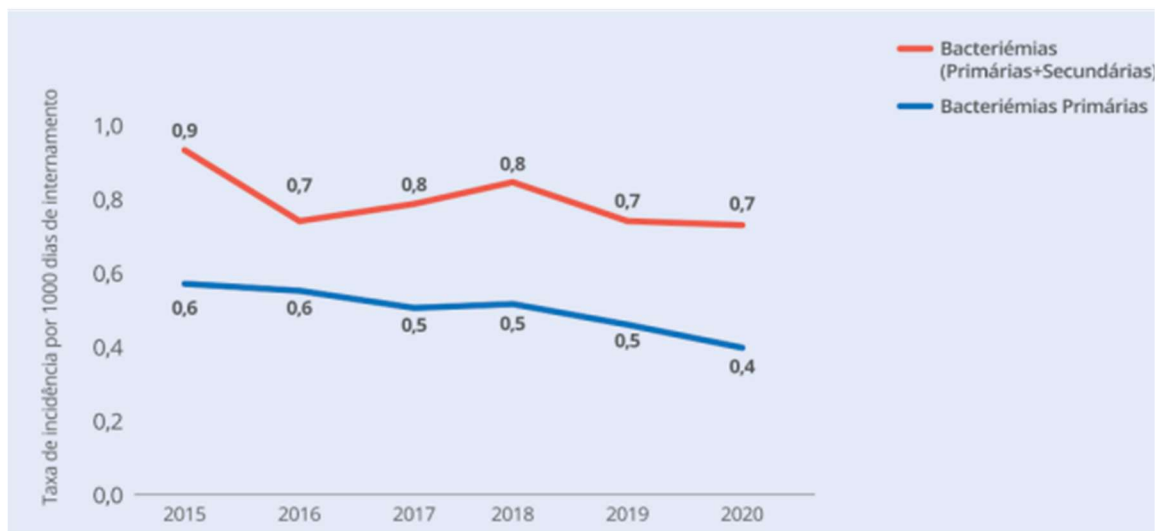


Figura 2–Evolução da taxa de incidência de bacteriemia de origem hospitalar (primária/desconhecida secundária) por 1000 dias de internamento (2015–2020) (8)

As ICS estão frequentemente relacionadas com o uso de dispositivos invasivos, como cateteres venosos centrais, uso de antibióticos de amplo espectro, imunossupressão ou comorbidades graves. São classificadas como primárias quando não há um foco infeccioso evidente ou quando a infeção está relacionada com um cateter, sem outra fonte identificável ou como secundárias quando a ICS é consequência de uma infeção em outro local do corpo, como pielonefrite, pneumonia entre outras. A prevenção envolve práticas rigorosas de controle de infeção, como higienização das mãos, uso de barreiras estéreis, educação dos profissionais de saúde sobre as práticas recomendadas (6).



Taxas elevadas podem indicar falhas nos protocolos de higiene e segurança, assepsia e manuseamento de dispositivos. Os doentes com ICS, geralmente requerem internamentos prolongados, uso de antibióticos de amplo espectro, suporte intensivo e monitorização contínua, o que aumenta significativamente os custos hospitalares (9).

Em Portugal, foi aprovado em 2007 o Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde (PNCI), que tinha como plano de intervenção a implementação de um sistema de Vigilância Epidemiológica (VE) em rede, a formação e informação dos profissionais de saúde e a elaboração e divulgação de recomendações de boas práticas. Este programa centra-se em quatro grandes linhas de atuação e de suporte que são a organização, o desenvolvimento individual e organizacional, o registo, a monitorização e comunicação. O grande objetivo é fornecer orientações e instrumentos facilitadores de melhoria na organização dos serviços, na prestação de cuidados e na medição dos resultados de todas as unidades de saúde (10).

Em 2013, foi criado o PPCIRA, que resultou da fusão do Programa Nacional de Controlo da Infecção com o Programa Nacional de Prevenção da Resistência Antimicrobiana, surgindo como resposta integrada na abordagem de ambos os problemas, potenciando as oportunidades geradas pela sua interligação. (10).

## **1. 2. Impacto da Terapêutica Empírica**

O uso de antimicrobianos nas unidades de cuidados intensivos (UCI), e em outros internamentos é amplamente difundido, com estimativas indicando que aproximadamente 75% dos doentes internados recebem pelo menos um antibiótico. Esta terapêutica destina-se tanto ao tratamento de infeções graves de origem comunitária quanto a infeções associadas aos cuidados de saúde adquiridas antes ou durante o internamento em UCI e em outras unidades de internamento(11). Grande parte das prescrições é realizada de forma empírica, ou seja, iniciadas antes da identificação do agente etiológico, frequentemente sem confirmação da presença de infeção ou determinação do foco infeccioso. Estudos retrospectivos indicam que uma proporção significativa de doentes submetidos a terapêutica antimicrobiana empírica não apresenta critérios de infeção documentada, e que entre 25% e 50% dessas terapêuticas empíricas acabam por se revelar inadequadas. O emprego de antimicrobianos de amplo espectro, característico da terapêutica empírica, pode alterar a microbiota comensal, favorecendo a colonização por microrganismos hospitalares potencialmente patogénicos (11).

A sépsis, é uma emergência médica, com altas taxas de morbimortalidade, particularmente quando o diagnóstico e o início da terapia antimicrobiana apropriada são atrasados. O tempo de intervenção é



crítico: cada hora de atraso no tratamento efetivo está associada ao aumento significativo da mortalidade(3).

As diretrizes mais recentes da campanha SSC, publicadas em 2021, incluem recomendações no diagnóstico de origem e tratamento de infeção e recomendações adicionais de tratamento terapêutico. As diretrizes recomendam a administração imediata de antimicrobianos – preferencialmente dentro de uma hora – em casos de choque séptico, e até três horas nos casos de sépsis sem choque, após exclusão de causas não infecciosas. É fortemente recomendada a obtenção de amostras microbiológicas antes do início da terapêutica, permitindo reavaliação contínua e descontinuação da terapia empírica caso seja identificada uma etiologia não infecciosa. De fato, aproximadamente um terço dos doentes inicialmente suspeitos de sépsis apresenta uma condição de causa não infecciosa (2).

Diante da necessidade de ação rápida, a terapêutica antimicrobiana é uma prática clínica amplamente adotada. A decisão de iniciar terapêutica empírica baseia-se em múltiplos critérios, incluindo a epidemiologia microbiana local, histórico clínico do doente e propriedades farmacológicas dos antibióticos disponíveis. No entanto, embora essencial num primeiro momento, a terapêutica empírica pode ser inadequada ou desnecessariamente ampla, contribuindo para o aumento da resistência antimicrobiana, toxicidade medicamentosa e custos hospitalares (12). Comparações internacionais do consumo hospitalar de antibióticos devem ser interpretadas com cautela, dado que a tipologia das instituições e a metodologia de vigilância variam entre países. Portugal apresenta valores de consumo estáveis na última década, sistematicamente abaixo da média europeia. Em Portugal, o consumo de carbapenemos, classe de antibióticos de mais largo espectro, em DDD por 1000 habitantes por dia, diminuiu em 25%, entre 2015 e 2019. Este é, também, um dos objetivos específicos fundamentais do PPCIRA. Portugal é um dos cinco países europeus em que houve uma tendência decrescente significativa no consumo desta classe de antibióticos (Bélgica, Finlândia, Noruega, Portugal e Eslovénia), entre 2011 e 2019. No entanto, o consumo de carbapenemos mantém-se acima da média europeia e aumentou em 7,8% de 2019 para 2020, avaliado em DDD por 1000 habitantes por dia (7) A transição precoce para uma terapêutica direcionada, fundamentada na identificação precisa do agente patogénico e no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, é, essencial para o sucesso do tratamento e para o uso racional dos antimicrobianos. A rápida disseminação de bactérias multirresistentes constitui uma ameaça crescente, especialmente em UCI. AS *Enterobacterales*, devido à sua elevada capacidade de adaptação e à mobilização de genes de resistência por plasmídeos, representam um desafio particular. A escolha da terapêutica empírica para infeções intra-abdominais ou urinárias requer o conhecimento da variabilidade



microbiológica intrínseca de cada hospital ou UCI, bem como da fonte de infeção, segurança ou toxicidade dos antibióticos, interação com outros medicamentos, regime posológico e presença de fatores de risco. Os carbapenemos são os antimicrobianos de escolha em caso de suspeita de infeção por *Enterobacterales*, produtoras de ESBL. Novos medicamentos, como a ceftazidima/avibactam e ceftolozano/tazobactam, abriram novos horizontes no tratamento de enterobacterales multirresistentes (11).

### 1.3. Hemoculturas: Princípios e desafios Laboratoriais

As hemoculturas constituem exames laboratoriais fundamentais para a deteção e isolamento de microrganismos presentes na corrente sanguínea, sendo imprescindíveis no diagnóstico ICS. A sua colheita está indicada perante sintomas ou sinais clínicos sugestivos de infeção sistémica, como febre, calafrios e astenia, ou em contextos específicos como endocardite, após cirurgias cardíacas, comprometimento do funcionamento do sistema imunitário, pneumonia grave, meningite, suspeita de infeção hospitalar ou presença de dispositivos invasivos, como cateteres venosos e drenos cirúrgicos(13).

O princípio básico das hemoculturas consiste na inoculação de uma amostra de sangue em meios de cultura de cultura ricos, que favorecem o crescimento microbiano, permitindo a posterior identificação do agente etiológico e a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana (14).

Apesar da importância clínica, o estudo microbiológico das ICS, desde a colheita até à interpretação do resultado, envolve vários desafios que influenciam diretamente a sensibilidade e especificidade do diagnóstico. Assim, a colheita da amostra deve seguir rigorosos protocolos de assepsia para evitar contaminação com a microbiota cutânea, que pode gerar resultados falsos positivos e comprometer a interpretação clínica. Além disso, o volume de sangue colhido é um fator crítico para a sensibilidade do exame, uma vez que baixas concentrações microbianas no sangue podem dificultar a deteção (14).

De acordo com as normas da Direção-Geral da Saúde recomenda-se em adultos a inoculação de 10 a 30 ml e 1 a 5 ml em crianças de sangue por conjunto de hemocultura em cada episódio clínico.

O enchimento insuficiente das garrafas de hemoculturas diminui a sensibilidade das mesmas, sendo que uma das formas de melhorar este parâmetro é a implementação de inspeção sistemática do seu enchimento à cabeceira do doente. A importância do volume colhido está relacionada com a concentração de microrganismos no sangue, que nos adultos é baixa. Apesar de haver pouca evidência estima-se que varie entre 1-3 UFC/ml ou menos: em cerca de 50% dos episódios de ICS varia entre 0,1 - 1 UFC/ml (15).



A aplicação rigorosa de técnica asséptica (Figura 3) – incluindo a correta higienização das mãos ou uso de luvas estéreis, desinfeção adequada da pele com iodopovidona ou clorexidina alcoólica e secagem completa ao ar antes da punção venosa – é imprescindível para minimizar a contaminação pela microbiota cutânea, a qual pode corresponder a 3%–5% dos resultados positivos, gerando potenciais condutas terapêuticas inadequadas (13).



Figura 3–Procedimento de Colheita de Hemocultura (16)

A incubação das hemoculturas é realizada em sistemas automatizados, como o (A) BD BACTEC FX (Becton Dickinson), ou o (B) BacT/ALERT (bioMérieux) Figura 4, que monitorizam o crescimento microbiano através da deteção de dióxido de carbono proveniente do metabolismo microbiano ou alterações físico-químicas no meio de cultura. No equipamento (A) BD BACTEC FX (Becton Dickinson), o crescimento microbiano é detetado pela fluorescência emitida por um sensor, no equipamento (B) BacT/ALERT (bioMérieux), o crescimento microbiano é detetado por sensores colorimétricos.

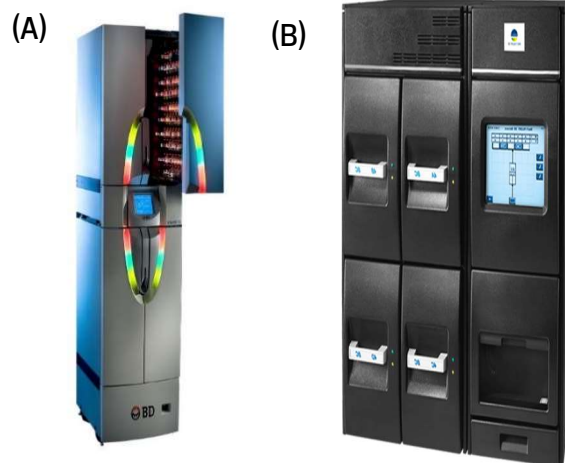


Figura 4-Equipamentos de incubação de hemoculturas: (A) é o (B) Equipamento BacT/ALERT (Imagem do site da <https://www.biomerieux.com/fr/fr.html> e <https://www.bd.com/pt>).

Estes sistemas permitem uma monitorização contínua e notificação imediata da positividade, promovendo maior agilidade no processamento laboratorial. No entanto, microrganismos de crescimento fastidioso ou estritamente anaeróbios podem apresentar crescimento tardio ou até mesmo não serem detetados, exigindo métodos complementares de investigação (15).

Após sinalização de uma hemocultura positiva pelo equipamento, é necessário realizar uma subcultura para a obtenção de colónias para posterior identificação e realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. São utilizados habitualmente meios enriquecidos, como gelose sangue (Figura 5), A incubação dos meios de cultura provenientes da subcultura acresce um intervalo de 24 a 48 horas ao tempo total de diagnóstico, impactando na rapidez da decisão clínica (16).



Figura 5-Subcultura de hemocultura em Gelose de sangue (18,19)

Este período de incubação é imprescindível, uma vez que a identificação microbiana na rotina laboratorial depende de métodos tradicionais, que incluem testes bioquímicos manuais (ex.: galerias API, utilizadas já raramente) ou automatizados (ex.: VITEK, Microscan), os quais recorrem a colónias provenientes da subcultura para analisar a metabolização de substratos específicos, garantindo sensibilidade e especificidade diagnóstica adequadas (16).



Este algoritmo tradicional implementado na rotina laboratorial é relativamente demorado, podendo requerer 24 a 72 horas para a disponibilização de resultados definitivos. Essa limitação temporal motivou o desenvolvimento e a implementação de tecnologias mais rápidas e precisas, como a espectrometria de massa por ionização por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com tempo de voo (MALDI-TOF MS, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*). Consolidada como uma ferramenta revolucionária na microbiologia clínica, esta tecnologia permite a identificação rápida, precisa e altamente reprodutível de uma ampla gama de bactérias e fungos diretamente a partir de colónias, transformando significativamente os fluxos laboratoriais e a tomada de decisão clínica (17).

Mais recentemente, têm-se intensificado esforços para adaptar a tecnologia MALDI-TOF à identificação direta de microrganismos em hemoculturas positivas, eliminando a necessidade de subculturas e potencialmente reduzindo significativamente o tempo até à obtenção de resultados diagnósticos. Importa ressaltar que a presença de culturas mistas, baixa carga microbiana, presença de microrganismos raros ou ausentes nos bancos de dados podem dificultar a precisão da identificação (17). Esta abordagem visa reduzir significativamente o tempo entre a positividade da amostra e a obtenção da identificação do agente patogénico, o que pode ser determinante em contextos clínicos graves.

A identificação direta a partir da hemocultura positiva representa um avanço promissor para o tratamento da sépsis, contribuindo para a racionalização do uso de antimicrobianos e para a implementação precoce de medidas terapêuticas específicas (18).

A rápida identificação microbiana proporcionada pelo MALDI-TOF constitui o primeiro passo crítico para a orientação terapêutica, sendo complementada pela avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana, que confirma a eficácia dos agentes selecionados e permite ajustes na terapêutica. A determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana é realizada por métodos fenotípicos clássicos recorrendo normalmente a métodos automáticos, mas também a alguns métodos manuais como a difusão em disco e mais raramente a diluição em caldo ou ágar, que possibilitam a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (Figura 6). Técnicas moleculares emergentes viabilizam a deteção rápida de genes de resistência, acelerando a caracterização dos mecanismos envolvidos(19).



Figura 6-Sistema de antibiograma automatizado Vitek2 vs antibiograma manual- (imagem retirado do site <https://www.biomerieux.com>)

Além do MALDI-TOF, outras tecnologias emergentes prometem transformar o diagnóstico microbiológico da sépsis:

- Inteligência artificial aplicada à análise de espectrogramas MALDI-TOF, melhorando a precisão da identificação microbiana;
- Sequenciação de Nova Geração (NGS) diretamente em amostras clínicas, permitindo a identificação simultânea do agente etiológico e do perfil de resistência antimicrobiana (20);
- Testes rápidos de resistência em tempo real, integráveis aos fluxos clínicos (20);
- Integração com programas de *stewardship* antimicrobiano, garantindo que a celeridade diagnóstica se traduza em decisões terapêuticas mais eficazes, reduzindo mortalidade e resistência microbiana (22).

### 1.3.1 Inovação no diagnóstico microbiológico

O diagnóstico microbiológico tem evoluído significativamente nas últimas décadas, impulsionado pelo desenvolvimento de técnicas analíticas avançadas que permitem a identificação rápida e precisa de microrganismos. Entre estas, a espectrometria de massa destaca-se como uma técnica analítica capaz de determinar a composição química de uma amostra, incluindo as massas e a estrutura de moléculas e átomos. Esta metodologia é amplamente aplicada em áreas como química, bioquímica, farmacologia, microbiologia entre outras, através de um espectrómetro de massa (21).

A espectrometria de massa envolve três etapas fundamentais: ionização, detecção dos iões e interpretação das espectrogramas, auxiliada por bibliotecas de referência integradas no sistema, Figura 7 (22).

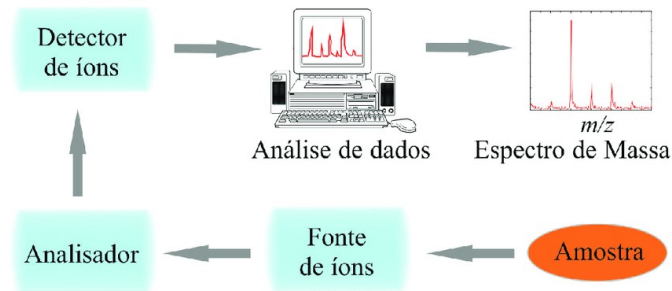


Figura 7-Estrutura de um espectrómetro de massa (22)

Na etapa de ionização, a amostra é convertida em iões (moléculas carregadas) por uma fonte apropriada.

Os métodos de ionização mais comuns incluem:

- Ionização por impacto eletrónico (EI) – comum para moléculas pequenas.
- Ionização por eletrospray (ESI) – adequada para biomoléculas.
- Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) – ideal para proteínas e polímeros(22).

Após a ionização, os iões são separados com base na razão massa por carga ( $m/z$ ), que são detetadas por um analisador de massas, que pode ser: quadrupolo, tempo de voo (TOF), *orbitrap* ou *ion trap* (17).

Na etapa de deteção, os iões são registados e convertidos em espectros de massa, designado espectrograma, que permitem determinar massas moleculares, identificar estruturas moleculares e quantificar compostos (22).

Esta abordagem possui múltiplas aplicações em microbiologia clínica, veterinária e alimentar, bem como na identificação de compostos desconhecidos, análise proteómica e genómica, deteção de drogas e metabólitos, e controlo de qualidade industrial (22).



### 1.3.2 Espectrometria de Massa: MALDI-TOF MS

A MALDI-TOF MS é uma técnica de alta resolução utilizada para a análise de massas moleculares dos compostos orgânicos. A análise das moléculas ocorre através de uma ionização suave. No processo de ionização, um feixe de laser de azoto (337 nm) incide sobre o analito coberto por uma solução matriz, resultando numa fragmentação mínima das moléculas analisadas, Figura 8 (23). A técnica de MALDI-TOF MS tem contribuído para um crescente aumento do conhecimento na identificação/caracterização microbiana (23).

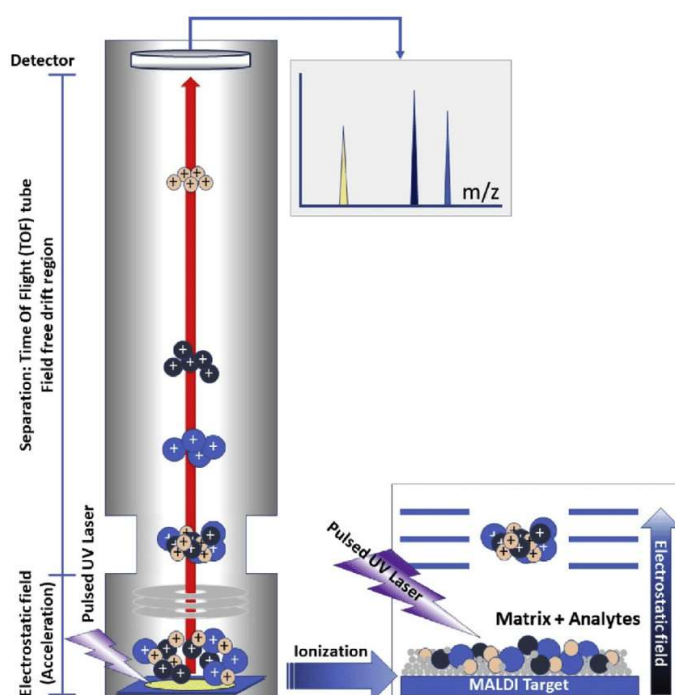


Figura 8–Metodologia MALDI-TOF MS (23)

A amostra é misturada com uma matriz - geralmente uma molécula orgânica pequena e ácida como o ácido sinapínico ou o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. A matriz absorve a energia do laser, facilitando a ionização da amostra sem a sua degradação(17). A mistura é colocada numa placa metálica, onde um pulso de laser ultravioleta vaporiza a matriz e ioniza as moléculas. A maioria dos iões gerados apresenta carga +1 e é acelerada num campo elétrico pelo analisador TOF. Uma vez que todos os iões têm a mesma energia cinética, os mais leves atingem primeiro o detector. O tempo de voo é usado para calcular a razão massa por carga ( $m/z$ )(24).

O MALDI-TOF MS gera espectros de massas de células microbianas intactas na faixa de 2000 a 20000 Da, funcionando como impressões digitais de um taxon específico, Figura 9 (24). Entre as vantagens



desta abordagem destacam-se a rapidez na preparação das amostras (minutos), fiabilidade dos resultados e o baixo custo por análise individual (24). Além disso, a correspondência de massas de biomarcadores a um banco de dados proteómicos permite a identificação precisa de microrganismos, independentemente de variações nos perfis proteicos, nas condições de cultura ou no tratamento da amostra. Um algoritmo pode prever massas de proteínas de um genoma sequenciado e procurar correspondências com massas derivadas experimentalmente. Essa abordagem baseada em bioinformática é superior ao *fingerprinting* bacteriano, pois pode identificar microrganismos apesar das variações nos perfis de proteínas, crescimento da cultura e condições de tratamento da amostra. Pode também estão descritos alguns protocolos que poderão detetar toxinas microbianas e analisar algumas resistências a antibióticos(24).

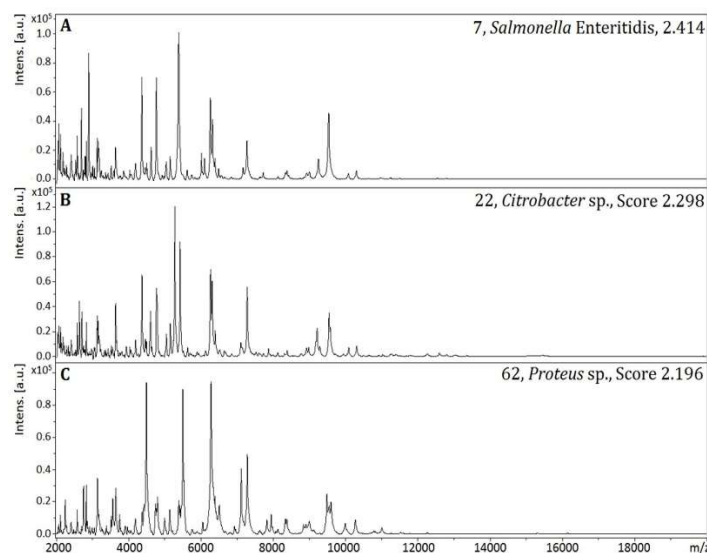


Figura 9-Resultados de Espectros de massas MALDI-TOF MS para *Salmonella enteritidis*, *Citrobacter sp.* e *Proteus*(25)

Assim, ao proporcionar uma identificação mais célere do agente etiológico, a aplicação do MALDI-TOF MS em hemoculturas positivas pode impactar significativamente a gestão clínica da sépsis. Esta metodologia possibilita a revisão precoce da terapêutica empírica, a adequação do tratamento e a potencial melhoria dos desfechos clínicos (26). A redução do tempo para implementação da terapia adequada em doentes com sépsis, com a aplicação de MALDI-TOF direto de hemoculturas positivas, é significativa e tem impacto clínico comprovado (Tabela 1): redução da mortalidade por sépsis, diminuição da duração da terapia antimicrobiana de amplo espectro, redução da resistência bacteriana, menor tempo de internamento hospitalar e diminuição dos riscos e custos associados (26).



Tabela 1- Comparação entre o método convencional e a identificação direta por MALDI-TOF

	Método Convencional	MALDI-TOF Direto
Tempo de identificação	24 a 72 horas	1 a 4 horas
Necessidade de subcultura/testes	Sim (subcultura + testes bioquímicos)	Não

Estudos pioneiros demonstraram taxas de concordância entre 80 e 95% para a identificação ao nível de género e de 70 a 90% ao nível de espécie, quando comparados com os métodos convencionais (26). Contudo, a precisão pode variar em função de fatores como a carga microbiana, a presença de culturas polimicrobianas ou microrganismos fastidiosos, e a qualidade do banco de dados proteico utilizado. Espécies de Gram positivo e leveduras têm apresentado maiores dificuldades de identificação direta, ao passo que bactérias Gram-negativo, como *Enterobacterales* e *Pseudomonas aeruginosa*, tendem a apresentar resultados mais consistentes(27).

Diversos protocolos de pré-tratamento têm sido propostos para melhorar o desempenho da técnica, nomeadamente a utilização de kits comerciais ou métodos laboratoriais caseiros baseados em centrifugação diferencial, lise seletiva de eritrócitos e lavagem celular (28). Estes procedimentos visam eliminar interferências sanguíneas e concentrar os microrganismos, otimizando a qualidade do espectro obtido. O desenvolvimento de kits específicos, como os atualmente disponíveis no mercado, tem permitido padronizar o processamento das amostras, facilitando a implementação da metodologia em laboratórios clínicos de rotina.

Assim, a metodologia de MALDI-TOF MS constitui um avanço significativo no diagnóstico microbiológico, combinando rapidez, precisão e custo-efetividade. Esta metodologia revoluciona a abordagem clínica das ICS, permitindo intervenções terapêuticas mais adequadas e uma monitorização eficiente de microrganismos patogénicos (29).

Este estudo tem como objetivo avaliar a concordância, exatidão, reprodutibilidade e repetibilidade da identificação microbiana em hemoculturas positivas através da tecnologia de MALDI-TOF no Vitek MS utilizando o kit de extração da FASTinov®- QUICKprep (IVDR), com metodologia convencional utilizada no laboratório de Microbiologia, SPC, de ULS de São João.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Tipo de estudo

O presente estudo consiste num estudo experimental, tendo como abordagem a validação de um método analítico, utilizando um kit de extração da empresa FASTinov®- QUICKprep.

### 2.2. População e Amostra

A população deste estudo foi constituída por amostras de hemoculturas previamente classificadas como positivas, pelo sistema automatizado BD BActec FX, oriundas de utentes da Unidade Local de Saúde de São João (ULS de São João). A amostra foi composta por hemoculturas previamente classificadas como positivas, pelo sistema automatizado BD BActec FX, selecionadas de forma aleatória, durante o período da manhã (7 horas às 10 horas), entre os meses de abril a junho de 2025.

A seleção das amostras seguiu os seguintes critérios de inclusão:

- Hemoculturas pediátricas e adultas (aeróbias, anaeróbias e micológicas)
- Uma hemocultura por utente
- Tempo de positividade inferior a 24 horas como recomendado pelo fabricante

### 2.3. Procedimento

Todas as amostras incluídas no estudo seguiram o protocolo microbiológico convencional, instituído no laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica da ULS de São João e o protocolo de identificação direta com o kit de extração da FASTinov®-QUICKprep.

O protocolo microbiológico convencional, segue os seguintes passos: às amostras de hemoculturas previamente classificadas como positivas, pelo sistema automatizado BD BActec FX, são realizadas subculturas para meio sólido de gelose de sangue e é realizada um esfregaço para coloração pelo método de Gram. A gelose de sangue é colocada a incubar durante 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao fim do período de incubação, todas as subculturas com crescimento seguem para identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF no VitekMS e posterior realização do antibiograma manual ou em sistema automatizado, Vitek2.



O processamento das amostras utilizando o kit de extração da FASTinov®-QUICKprep, Figura 10, (Anexo 1), consiste na remoção seletiva das células sanguíneas, bem como de detritos provenientes do meio de cultura, resultando numa amostra concentrada em microrganismos e livre de interferências celulares/detritos indesejadas. Segue os passos deste processamento:

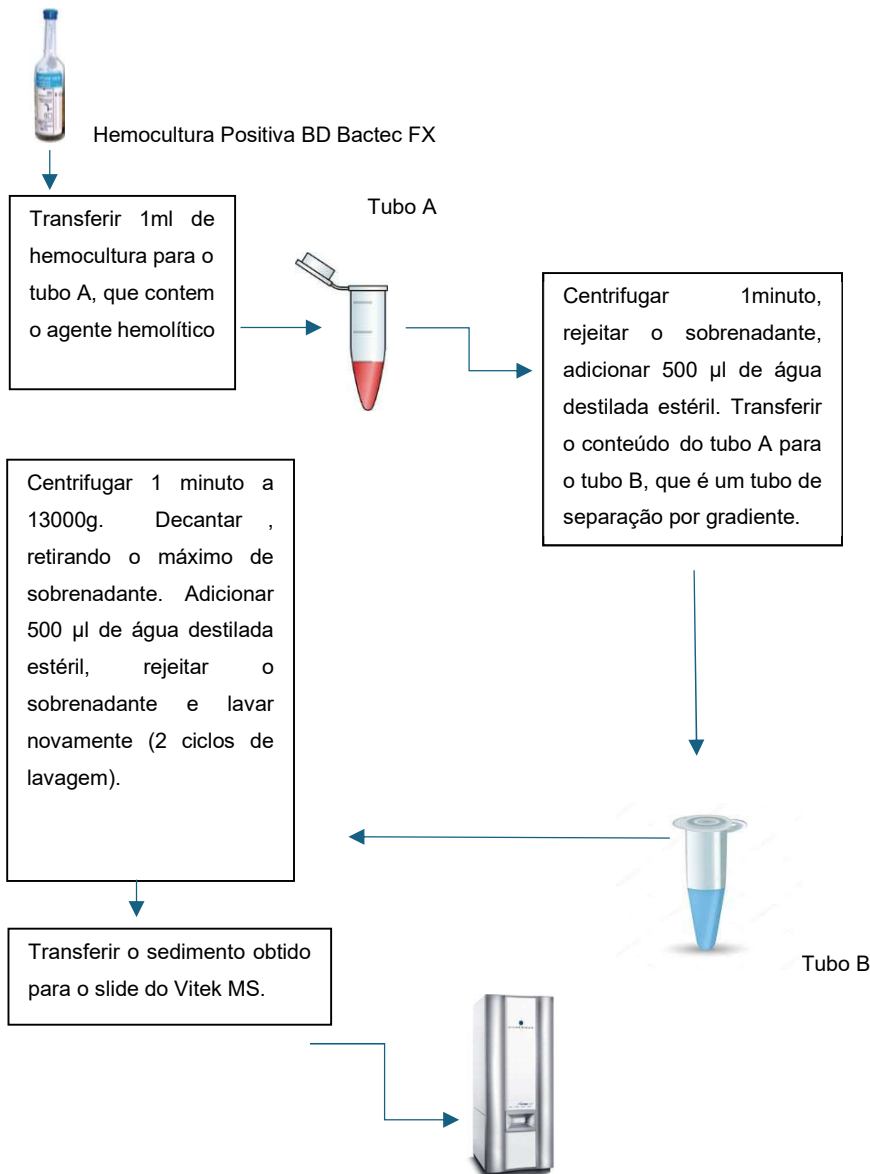


Figura 10-Processamento das amostras utilizando o kit de FASTinov®-QUICKprep.



Em ambos os protocolos foi registado a identificação obtida e o respetivo score de identificação (em percentagem).

Este estudo não teve implicações éticas, uma vez que as amostras utilizadas estavam anonimizadas e o seu resultado só foi utilizado neste trabalho, contudo foi submetido ao Centro de Epidemiologia Hospitalar da ULS de São João e à Comissão de Ética, o qual foi autorizado pelo Conselho de Administração (Anexo2).

#### 2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software Microsoft Excel e IBM SPSS Statistics® versão 29.0.2.

Para avaliar a concordância diagnóstica entre os métodos, os resultados obtidos pelo protocolo de identificação direta com o kit de extração da FASTinov®-QUICKprep (identificação bacteriana e o score de identificação), foram comparados com os resultados obtidos pelo protocolo convencional (identificação bacteriana e score de identificação). Para tal, procedeu-se à construção de tabelas de contingência (2x2) e a concordância global entre os protocolos foi avaliada pelo coeficiente  $kappa$  ( $\kappa$ ) de Cohen, cuja interpretação seguiu os critérios propostos por Landis e Koch(30). Com recurso ao software IBM SPSS Statistics® versão 29.0.2., procedemos ao cálculo do mesmo, sendo que foram eliminadas as amostras onde qualquer uma das colunas esteja vazia ou sem identificação (S/ID), removemos espaços e foram padronizadas as maiúsculas/minúsculas. Sempre que aplicável, foi utilizado o teste de McNemar para a comparação de proporções emparelhadas, considerando-se estatisticamente significativos os resultados com valor de  $p < 0,05$ .

Para a avaliação da precisão do método, foram determinadas a repetibilidade (precisão intraensaio) e a reprodutibilidade (precisão interensaio) utilizando estirpes de referência certificadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC), inoculadas (depois de hidratadas com BHI), em frascos de hemoculturas de aerobiose com 8 a 10ml de sangue. Estas estirpes são tratados utilizando o Kit de extração FASTinov®-QUICKprep. Foram selecionadas estirpes representativas de agentes clinicamente relevantes em ICS, tais como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13882, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Serratia marcescens* ATCC 13880, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *St. epidermidis* ATCC 35984, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12836, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.



Estas estirpes, caracterizadas por estabilidade fenotípica e genotípica, foram processadas repetidamente em diferentes condições experimentais, por distintos operadores e em diferentes dias, de forma a simular variações operacionais reais do laboratório.

A repetibilidade foi avaliada mediante a realização de múltiplas extrações e análises do mesmo inóculo bacteriano (três repetições) no mesmo dia e nas mesmas condições laboratoriais. O cálculo da repetibilidade e repetibilidade entre pares foi efectuado segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Repetibilidade} = \left( \frac{\text{n.º de estirpes com ensaios concordantes}}{\text{n.º total de estirpes}} \right) \times 100$$

$$\text{Repetibilidade (\%)} = \left( \frac{\text{N.º de pares concordantes}}{\text{N.º total de pares}} \right) \times 100$$

Esta análise dupla permite avaliar a consistência total dos ensaios como a estabilidade relativa entre repetições individuais, contribuindo para uma validação robusta do método. A reprodutibilidade foi determinada através da repetição do protocolo em dias distintos, com operadores diferentes e os mesmos reagentes. Os resultados foram avaliados quanto à consistência da identificação microbiana obtida pelo método testado, tendo como critério de sucesso a obtenção de identificações concordantes e reprodutíveis entre as diferentes repetições. O valor de reprodutibilidade foi calculado conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Reprodutibilidade (\%)} = \left( \frac{\text{N.º de concordâncias}}{\text{N.º total de estirpes}} \right) \times 100$$

A exatidão, num ensaio experimental mede a proximidade das medições em relação ao valor verdadeiro ou aceito da grandeza que se está medindo. Ela avalia a ausência ou pequena magnitude de erros sistemáticos (viés), indicando se os resultados do ensaio estão próximos do que é esperado. Foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Número de identificações corretas}}{\text{Número total de testes}} \times 100$$



### 3.Resultados

Foram incluídas no estudo 124 amostras de hemoculturas positivas, processadas em paralelo pelo método de identificação convencional e pela identificação direta com o kit de extração da FASTinov®-QUICKprep. A maioria das amostras correspondeu a hemoculturas de aerobiose (n=113; 91,1%) (Gráfico 1).

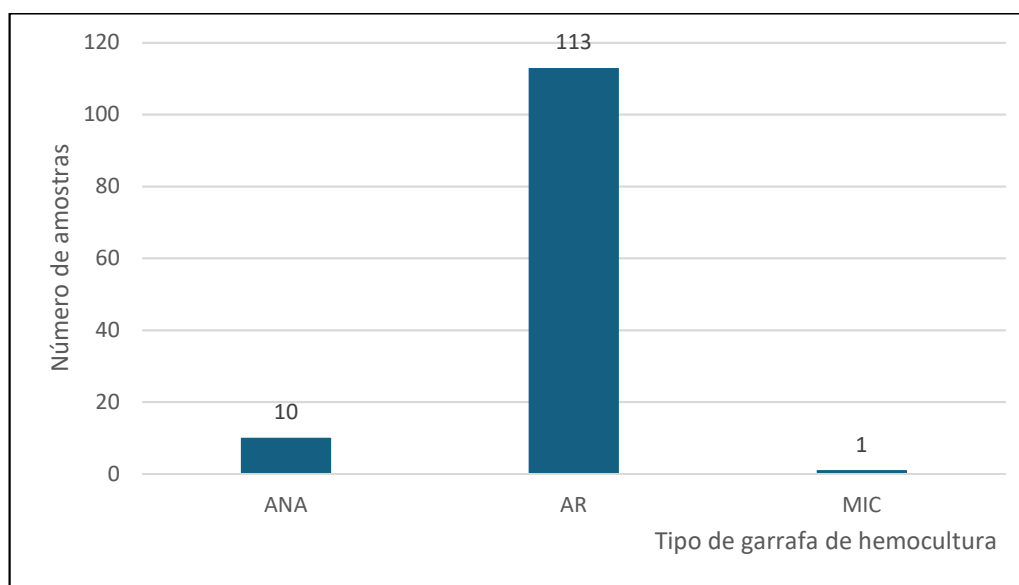


Gráfico 1 - Distribuição do tipo de hemoculturas analisadas; ANA-anaerobiose; AR-aerobiose; MIC-micológica

Dos 124 casos analisados (Anexo 3), 101 (81%) apresentaram concordância entre a identificação direta e a identificação pelo método convencional. Nos casos concordantes, a média do score de identificação foi de 99,9% em ambos os métodos, com um tempo médio de positividade de 16 horas (Tabela 2). Podemos também, concluir que a percentagem correspondente aos casos não concordantes é de 19%, e a percentagem de casos concordantes é de 81%. (Gráfico 2)

Tabela 2-Dados resumidos do estudo experimental

	Casos n (%)	Média do Score de Identificação Direta (%)	Média do Score de Identificação Convencional (%)	Tempo Médio de Positividade (média em horas)
Casos Concordantes	101 (81)	99,9%	99,9%	16,00
Casos não concordantes	23 (19)	87,18%	99,9%	13,83

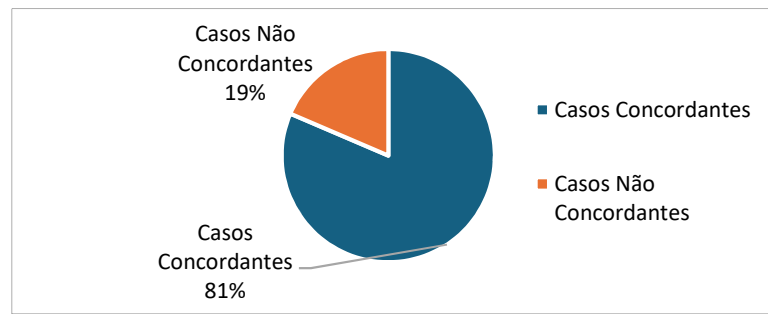


Gráfico 2 - Casos Concordantes vs Casos não Concordantes

Relativamente ao tempo de positividade da totalidade das amostras testadas, verificamos que o valor mais baixo foi de 4 horas e o mais alto 24 horas após colheita (Gráfico 3).

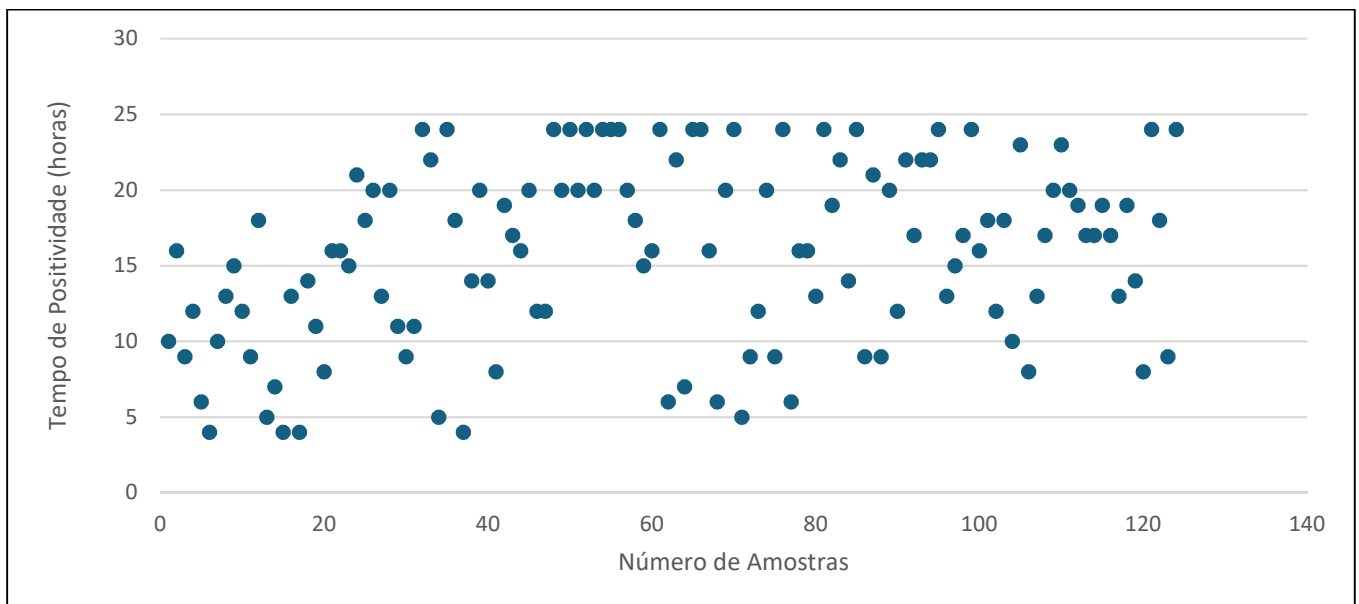


Gráfico 3 - Tempo de positividade da totalidade das hemoculturas testadas



Dos 101 casos concordantes, as estirpes bacterianas mais frequentemente identificadas foram *Staphylococcus epidermidis* (n=14), *Escherichia coli* (n=12), *Klebsiella pneumoniae* (n=11) (Gráfico 4).

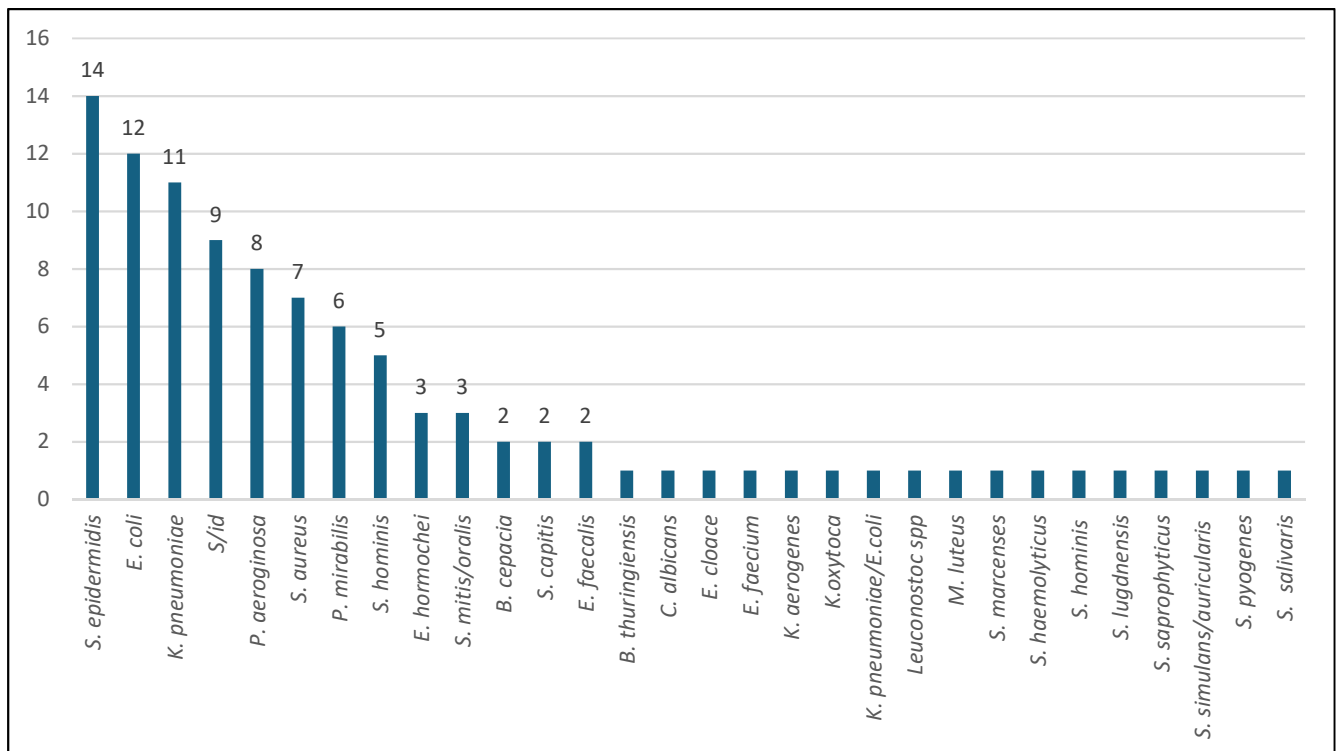


Gráfico 4 - Microrganismos Concordantes entre identificação direta e identificação pelo método convencional

A concordância global entre os protocolos foi confirmada pelo coeficiente kappa ( $\kappa = 0,889$ ;  $p < 0,001$ ), indicando elevada concordância (Tabela 3).

Tabela 3-Medida de concordância (Kappa de Cohen)

Medida de concordância	Valor	Erro-padrão assintótico <sup>a</sup>	Estatística T <sup>b</sup>	Significância aproximada
<b>Kappa</b>	<b>0,889</b>	<b>0,033</b>	<b>32,410</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<b>N de casos válidos</b>	<b>97</b>			



As discordâncias de identificação entre métodos corresponderam a situações de ausência de identificação em um dos métodos ou a identificações divergentes (Tabela 4). A análise revelou padrões de erro associados maioritariamente a microrganismos Gram-positivo, uma média de score de identificação mais baixo (87,18%) e um tempo de positividade inferior.

Tabela 4 - Resultados das identificações não concordantes entre método convencional e identificação direta

Identificação Direta	Score da ID Direta	Identificação Método convencional	Score ID Método Convencional	Tempo Positividade (horas)	Tipo de Garrafa
<i>Clostridium difficile</i>	99,9%	s/id		5	AR
<i>Enterobacter hormaechei</i>	99,9%	s/id		4	AR
<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter hormaechei</i>	50% 50%	<i>E. cloacae</i>	99,9%	24	AR
<i>Levolactobacillus</i>	99,9%	s/id		4	AR
<i>Lysinobacillus</i>	99,9%	s/id		14	AR
<i>Mycobacterium</i> <i>genus</i>	99,9%	<i>Fingoldia magna</i>	99,9%	24	ANA
<i>Plurib.gergoniae</i>	99,9%	<i>Citrobacter koseri</i>	99,9%	9	AR
<i>S. aureus</i>	99,9%	s/id		5	AR
<i>S. capitis</i>	98,5%	s/id		10	AR
<i>S. hominis</i> <i>M. morgani</i> <i>K. pneumoniae</i>	33% 33% 33%	<i>S. epidermidis</i>	99,9%	20	AR
s/id		<i>E. faecalis</i>	99,9%	12	AR
s/id		<i>E. faecalis</i>	99,9%	13	AR
s/id		<i>E. faecalis</i>	99,9%	15	AR
s/id		<i>S. haemolyticus</i>	99,9%	21	AR
s/id		<i>S. epidermidis</i>	99,9%	24	AR
s/id		<i>P. aeruginosa</i>	99,9%	4	AR
s/id		S.coag neg	99,9%	20	AR
s/id		<i>S. epidermidis</i>	99,9%	12	AR
s/id		<i>S. epidermidis</i>	99,9%	24	AR
s/id		<i>S. aureus</i>	99,9%	15	AR
s/id		<i>E. faecium</i>	99,9%	20	AR
s/id		<i>Aeromonas veroni</i>	99,9%	10	AR
<i>Streptococcus pseudintermedius</i> <i>Staphylococcus intermedius</i>	50% 50%	<i>S. epidermidis</i>	99,9%	20	ANA

Legenda: s/id – sem identificação; AR – aerobiose; ANA – anaerobiose



Para a comparação de proporções emparelhadas, aplicou-se o teste de McNemar (Ensaio 1 vs Ensaio 2 (Tabela 5, Anexo 4) | Ensaio 2 vs Ensaio 3 (Tabela 6, Anexo 5) | Ensaio 1 vs Ensaio 3 (Tabela 7, Anexo 6). Com este teste avaliou-se a discrepância de resultados entre ensaios. Contudo, a ausência de resultados, indica que não há discrepâncias (Anexo 2).

### 3.1 Análise da Repetibilidade e Reprodutibilidade

Para avaliar a repetibilidade (precisão intraensaio) e a reprodutibilidade (precisão interensaio) do método de identificação direta com o kit de extração da FASTinov®, foram utilizadas 10 estirpes de referência ATCC. Na Tabela 8, estão apresentados os resultados da identificação microbiana obtidos em cada ensaio.

Tabela 4–Resultados intraensaio da identificação microbiana

Estirpe ATCC	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Concordância
ATCC 12836	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>	C
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	C
ATCC 13882	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	C
ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	s/id	<i>S. aureus</i>	NC
ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	C
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	C
ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	C
ATCC 29906	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	C
ATCC 13880	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	C
ATCC 35984	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	C

Legenda: C – Concordante; NC – não concordantes; s/id – sem identificação

A repetibilidade global por estirpe foi de 90%, enquanto a repetibilidade por pares foi de 93,3%. O índice médio de concordância entre os ensaios, coeficiente kappa foi de ( $\kappa = 0,836$ ;  $p < 0,001$ ), Tabela 9.

As discordâncias ocorreram na estirpe *St. aureus*, com variação entre a identificação correta e sem identificação. A taxa de erro para a estirpe *St. aureus* é de aproximadamente 66,7% considerando as três comparações possíveis entre os ensaios (1 vs 2, 2 vs 3, 1 vs 3).

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados da identificação microbiana obtidos por cada operador. O valor da reprodutibilidade obtido foi de 90%. A exatidão foi determinada através da fórmula e o valor obtido foi de 81,45%.



Tabela 5- Medida de concordância entre ensaios

Medida de concordância	Valor (kappa)	Índice Médio de concordância entre ensaios
Ensaio1 vs Ensaio 2	0,804	0,836
Ensaio 2 vs Ensaio 3	0,804	
Ensaio 1 vs Ensaio 3	0,901	

Tabela 6-Resultados interensaio da identificação microbiana

Estipes ATCC	Operador 1	Operador 2	Concordância
ATCC 12836	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>	C
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	C
ATCC 13882	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	C
ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	s/id	NC
ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	C
ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	C
ATCC 29906	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	C
ATCC 13880	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	C

Legenda: C – Concordante; NC – não concordantes; s/id – sem identificação



#### 4. Discussão

Os resultados obtidos demonstram que o método proposto para validação, é fiável. Contudo, sendo uma amostragem probabilística, os resultados obtidos não podem ser generalizados para a totalidade das hemoculturas positivas processadas no Serviço de Patologia Clínica da ULS de São João, uma vez que poderá existir uma limitação, já que não foram realizados todos os parâmetros nem realizados ensaios interlaboratoriais.

A frequência das hemoculturas analisadas, refere-se predominantemente às destinadas à deteção de microrganismos aeróbios, o que poderá refletir o tipo de agentes com maior incidência nas infeções associadas a sépsis.

Na avaliação do tipo de microrganismos predominantes concluímos que foram os de Gram positivo, com destaque para o *St. epidermidis* (n=14), e seguidamente os de Gram negativo, com destaque para a *E.coli* (n=12) o que corresponde à realidade num laboratório de rotina hospitalar.

O valor obtido de coeficiente Kappa indicou um nível de concordância muito elevado entre os avaliadores,  $\kappa = 0,889$ , que segundo os critérios de Landis e Koch, 1977, (Anexo 7) é uma concordância quase perfeita (0,81-1,00) (31).

A avaliação dos casos não concordantes não permite concluir sobre a incorreta identificação, já que alguns dos microrganismos identificados não são cultivados no método convencional, as condições de cultura utilizadas (meio, tempo, temperatura) podem não suportar o crescimento viável ou a baixa carga microbiana ou baixo tempo de positividade. Avaliamos alguns casos, como o *Lysinobacillus*, que é uma bactéria gram-positivo, anaeróbio facultativo ou microaerófilo que a não identificação no método convencional pode estar relacionada com o fato de não crescer nos meios de cultura convencionais, além desta amostra apresentar um baixo tempo de positividade, o *Levilactobacillus*, microrganismo que não cresce na cultura convencional em aerobiose. De referir, o facto de este, ao ser identificado numa hemocultura é relevante e exige interpretação cautelosa, porque, apesar de geralmente serem não patogénicas, podem ocasionalmente ser associadas a infeções, sobretudo em doentes imunocomprometidos ou com comorbilidades graves. A sua presença em hemocultura não é comum e deve ser avaliada em contexto clínico (32).

Nos casos de identificação pelo método direto, onde obtivemos resultados de *Mycobacterium*, *Costridium difficile* e *Finegoldia magna*, também não crescem nas culturas convencionais, e assim não poderiam ser identificadas no método de identificação convencional. Não são comuns as septicemias por bactérias anaeróbias, mas existe na literatura, dados que descrevem a sua identificação(33). No caso das amostras onde obtivemos identificações diretas como *Plurib. gergoniae* e a identificação pelo



método convencional *Citrobacter koseri*, mesmo dando não concordantes ambas pertencem a mesma família e ordem o que pode justificar a inconsistência (33).

Relativamente às identificações onde não obtivemos a identificação da espécie, como por exemplo nas amostras com identificações de *St. coagulase negativo* ou *Enterobacter complex*, este resultado poderá estar relacionado com algumas limitações que a base de dados do VitekMs apresenta, comparativamente com outros sistemas (34).

Na avaliação da repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão, o valor obtido foi de 90%, o que significa que o método estudado apresenta 90% de concordância dos resultados esperados. Procedeu-se também ao cálculo da repetibilidade por pares, uma vez que permite garantir consistência, reduzir erros de medição e aumentar a confiança nos dados, além de servir como ferramenta de melhoria contínua, onde o valor obtido foi de 93,3%. Esta análise dupla permite avaliar tanto a consistência total dos ensaios como a estabilidade relativa entre repetições individuais, contribuindo para uma validação mais robusta do método. O índice médio de concordância entre os ensaios, coeficiente kappa foi de ( $\kappa = 0,836$ ;  $p < 0,001$ ). A taxa de erro de 66,7% associada à estirpe *St. aureus* pode dever-se a diversos fatores: técnicos, operacionais e humanos merecendo maior investigação. Algumas variantes de *St. aureus* podem apresentar colónias com aparência incomum (35).

Em síntese, o resultado do método de identificação diretamente da hemocultura positiva (VitekMs) quando comparado com outras metodologias já existente, e validadas para outros sistemas automatizados, apresenta algumas diferenças que importa salientar: neste estudo que pode refletir a incidência de infeções por sépsis/bacteriemias na ULSSJoão, obtivemos mais identificações na identificação de bactérias de Gram positivo, comparado com os resultados do Sepsityper kit (36).



## 5. Conclusão

Os resultados deste estudo experimental evidenciam uma elevada percentagem de concordância entre o método avaliado, identificação direta utilizando o Kit de extração da FASTinov®- QUICKprep e o método convencional, o que demonstra a sua validade. De igual modo, a análise dos parâmetros de repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão confirmam a consistência dos resultados obtidos, sugerindo que o método possui robustez suficiente para ser aplicado em diferentes condições experimentais e contextos operacionais. Estes resultados estão em consonância com a literatura científica, que enfatiza a importância da concordância metodológica e da estabilidade das medições como critérios fundamentais para a consolidação de novos procedimentos analíticos.

Assim, a, enquanto abre perspectivas para futuras investigações destinadas a ampliar a sua evidência reunida neste estudo contribui para o fortalecimento da confiabilidade do método aplicabilidade em diferentes cenários. Contudo, seria importante a realização de estudos adicionais em diferentes amostras, como por exemplo amostras de urina e ou líquido cefalorraquidiano e em condições mais abrangentes, conforme sugerido em diretrizes internacionais de validação metodológica, de modo a consolidar a generalização dos resultados.

O uso do método FASTinov® - QUICKprep, mostrou ser um teste de extração bacteriana de hemoculturas positivas para identificação altamente confiável. A preparação das amostras, com o Kit QUICKprep é rápida, e a amostra obtida pode ser usada para a realização em paralelo tanto da identificação com MALDI-TOF MS e para ser utilizada em testes de suscetibilidade mesmo os rápidos como o da FASTinov. Esta combinação permite economizar tempo, é prática, e apresenta uma excelente precisão.

Com todo este contributo podemos melhorar significativamente a resposta à condição do doente em sépsis.



## 6. Referências Bibliográficas

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). Vol. 315, JAMA – Journal of the American Medical Association. American Medical Association; 2016. p. 801–10.
2. Srzić I, Adam VN, Pejak DT. Sepsis Definition: What's New In The Treatment Guidelines. Acta Clin Croat. 2022 Jun 1; 61:67–72.
3. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Intensive Care Med. 2017 Mar 1;43(3):304–77.
4. CDC, Ncezid, DHQP. Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central Line Associated Bloodstream Infection).
5. Machado Ribeiro F. Sepse: um problema de Saúde pública. Brasília: Conselho Federal de Medicina; 2015. 89 p.
6. Lanceiro M. Prevenção da infeção associada ao cateter venoso central na pessoa em situação crítica: intervenção de enfermagem especializada. Escola Superior de Enfermagem de Lisboa. 2020;
7. Ministério da Saúde D. Infeções e Resistências a Antimicrobianos Relatório do Programa Prioritário PPCIRA [Internet]. 2022 May. Available from: [www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)
8. Infeções e resistências a antimicrobiano relatório do programa prioritário PPCIRA [Internet]. Available from: [www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)
9. Carvalho L. Infeção de Corrente Sanguínea Hospitalar: Uma Revisão Integrativa de Literatura. *braz j infect dis* [Internet]. 2022 [cited 2025 Sep 17]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2022.102609>
10. Geral da Saúde D. Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infeção Associada aos Cuidados de Saúde Lisboa, março de 2007.
11. Gonçalves-Pereira J, Póvoa P. Antibiotics in critically ill patients: A systematic review of the pharmacokinetics of  $\beta$ -lactams. Crit Care. 2011 Sep 13;15(5).
12. Jethwa S. Principles of initiating antimicrobial therapy and empiric prescribing [pharmaceutical-journal.com/article/ld/principles-of-initiating-antimicrobial-therapy-and-empiric-prescribing](http://pharmaceutical-journal.com/article/ld/principles-of-initiating-antimicrobial-therapy-and-empiric-prescribing). 2016.
13. Mutondo AM. Relatório final de Estágio Mestrado em Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas Emergentes e Reemergentes Estudo de Hemoculturas Local do Estágio: Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria.



14. Ransom EM, Burnham CAD. Routine Use of Anaerobic Blood Culture Bottles for Specimens Collected from Adults and Children Enhances Microorganism Recovery and Improves Time to Positivity. *J Clin Microbiol*. 2022 Sep 1;60(9).
15. Sistema de Hemocultura Automático EBD BACT 50/60/100/120/Plus/EX Instruções de uso.
16. Pacheco Orientadora J, Deli Grace de Barros Araújo Coorientador D, Franco Pereira M. Perspectivas sobre a técnica de hemocultura visando a identificação precoce do agente causal da sepse.
17. Tanakai Koich Waki,H., Hido, Y.,Akita, S.Yoshida, Y.and 1988\_Tanaka2, *International Journal of Analytical Mass Spectrometry and Chromatography*, Vol.5 No.1, February 13, 2017.
18. Renato Geraldo da Silva Filho. *Crescimento e Metabolismo Bacteriano*, Universidade Federal Rio de Janeiro, Brasil.
19. Shevchenko O, Tsiurlikova O, Sharapchenko S, Gichkun O, Velikiy D, Gabrielyan N, et al. Upregulated circulating mir-424 and its' diagnostic value for gram-negative bacteremia after thoracic transplantation. *Noncoding RNA Res*. 2022 Dec 1;7(4):217–25.
20. Detecção e Identificação de Bacterias de Importância Médica Modulo V manual\_microbiologia\_mod5. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde, Brasil.
21. Martins Silva J. *Cintica Qumica em Fotorresinas usando Espectrometria de Massa LDI-ToF de Alta Resolucao*-Jefferson da Silva Martins. 2013 Jul;
22. Leal A, De Almeida P, Oliveira G, Totola H, Pimentel J, Sousa P, et al. MALDI-TOF: Importância e Aplicabilidade na Microbiologia Hospitalar.
23. Dass C. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*.
24. De Évora U. Departamento de Química Escola de Ciências e Tecnologia. 2010.
25. Bier D, Tutija JF, Pasquatti TN, Oliveira TL, Araújo FR, Verbisck N V. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2017 Dec;37(12):1373–9.
26. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. Vol. 36, *FEMS Microbiology Reviews*. 2012. p. 380–407.
27. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, et al. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2011;13(6):701–6.
28. Chen JHK, Ho PL, Kwan GSW, She KKK, Siu GKH, Cheng VCC, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser



- desorption ionization–time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun;51(6):1733–9.
29. Pellegrino FLPC. Utilização da técnica de MALDI-TOF MS no diagnóstico microbiológica identificação bacteriana e deteção da resistência aos antimicrobianos.: MALDI-TOF MS no diagnóstico microbiológico. In: *Estudos e Escrita Científica Multidisciplinar em Ciências da Saúde*. Editora Científica Digital; 2023. p. 219–35.
30. Departamento de Matemática. Testes para a proporção e o teste do QUI-QUADRADO., Universidade do Minho, 2021.
31. Tenório PH de M, Vieira MM, Alberti A, Abreu MFM de Nakamoto JC, Cliquet Júnior A. Evaluation of intra- and interobserver reliability of the AO classification for wrist fractures. *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)*. 2018 Nov 1;53(6):703–6.
32. Meng Z, Duan R, Lv D, Bu G, Gao Y, Zhang P, et al. Rare case of bacteremia due to *Lysinibacillus sphaericus* in a person living with HIV. *International Journal of Infectious Diseases*. 2023 Oct 1;135:91–4.
33. Zahar JR, Farhat H, Chachaty E, Meshaka P, Antoun S, Nitenberg G. Incidence and clinical significance of anaerobic bacteraemia in cancer patients: A 6-year retrospective study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11(9):724–9.
34. Rosenthal ME, Rojzman AD, Frank E. *Finegoldia magna* (formerly *Peptostreptococcus magnus*): An overlooked etiology for toxic shock syndrome? *Med Hypotheses*. 2012 Aug;79(2):138–40.
35. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use ich Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1).
36. Cruz S, Abreu D, Gomes R, Martins-Oliveira I, Silva-Dias A, Perez-Viso B, et al. An improved protocol for bacteria identification by MALDI-TOF MS directly from positive blood cultures. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2024 Mar 1;43(3):605–10.



## Anexos

### Anexos 1

#### Protocolo identificação com o Kit de extração da FASTinov® - QUICKprep

1. Agitar a frasco de hemocultura no vortex durante 10 segundos.
2. Retirar 1ml de sangue do frasco de hemocultura e adicionar ao tubo eppendorf FASTprep kit tubo A, que contem o reagente hemolítico.
3. Agitar no vortex durante 10 segundos.
4. Centrifugar 1 minuto a 13000g.
5. Decantar e hidratar o sedimento com 500 µl de água destilada estéril.
6. Transferir o conteúdo do tubo A para o tubo B do kit da FASTprep.
7. Centrifugar 1 minuto a 13000g.
8. Decantar , retirando o máximo de sobrenadante. Adicionar 500 µl de água destilada estéril, rejeitar o sobrenadante e lavar novamente ( 2 ciclos de lavagem).
9. Aplicar em placa do Vitek MS, o sedimento obtido, adicionando a matriz apropriada.
10. Leitura e análise pelo software do equipamento Vitek MS, da BioMérieux, registando a identificação obtida e o score.
11. Em ambos os protocolos foi registado a identificação obtida e o respetivo score de identificação (em percentagem).



Anexo 2

**Centro de Epidemiologia Hospitalar**  
 Tomei conhecimento. Nada a opor. À DC CSH.  
 12 de Setembro de 2025  
 p/a Diretora do Centro de Epidemiologia Hospitalar  
 (Prof.ª Doutora Ana Azevedo)

DIRECÇÃO CLÍNICA

n.º 286 / 2025



• Centro Hospitalar São João •  
em 22/09/25

PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO

Realização de Investigação

De acordo concordar, nos termos legais em vigor.

Exmo(a). Senhor(a) Presidente do Conselho de Administração do Centro Hospitalar Universitário de São João

ADMINISTRAÇÃO DA ULS SÃO JOÃO, EPE - REUNIÃO DE Presidente do Conselho de Administração

**Nome do Investigador Principal:**  
Filipa Alexandra da Silva Alves

**Título da Investigação:**

Identificação direta de microrganismos em hemoculturas, utilizando espectrometria de massa- MALDI-TOF

25 SET. 2025

(Prof.ª Doutora Maria Joao Baptista)

Diretora Clínica para a área dos cuidados de saúde hospitalares	Diretora Clínica para a área dos cuidados de saúde primários	Enfermeiro Chefe	Vogal Executiva	Vogal Executivo
<i>Elisabete Barbosa</i>	<i>Filipa Alves</i>	<i>Paulo Mendes</i>	<i>Fernando De</i>	<i>Vitor Leite</i>

Pretendendo realizar no(s) Serviço(s) de: **PATOLOGIA CLINICA**

a investigação em epígrafe, solicito a V. Exa., na qualidade de Investigador/Promotor, autorização para a sua efetivação.

Para o efeito, anexo toda a documentação referida no dossier da Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário de São João respeitante à investigação, à qual enderecei pedido de apreciação e parecer.

Com os melhores cumprimentos.

O Investigador/Promotor

Porto, 16 de julho de 2025. Filipa Alexandra da Silva Alves  
assinatura

• Centro Hospitalar São João •  
 Centro de Epidemiologia Hospitalar  
 2,9,2025

CES-IM05-2



Tabela dos dados totais do estudo experimental

Identificação	Id direta	Score Id Direta (%)	Id Standard	Score Id Standart (%)	Concordância	Tempo Positividade (Horas)	Tipo Garrafa
1	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	10	AR
2	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	16	AR
3	<i>K.pneumoniae</i>	99,90	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	9	ANA
4	<i>s/id</i>		<i>E.faecalis</i>	99.9	N/C	12	AR
5	<i>s/id</i>		<i>s/id</i>		C	6	AR
6	<i>E.hormaechei</i>	99.9	<i>s/id</i>		N/C	4	AR
7	<i>St.capitis</i>	98.5	<i>s/id</i>		N/C	10	AR
8	<i>s/id</i>		<i>E.faecalis</i>	99.9	N/C	13	AR
9	<i>s/id</i>		<i>E.faecalis</i>	99.9	N/C	15	AR
10	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	12	AR
11	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	9	AR
12	<i>S.epidermidis</i>	63.3	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	18	AR
13	<i>S.epidermidis</i>	62.5	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	5	AR
14	<i>K.aerogenes</i>	99.9	<i>K.aerogenes</i>	99.9	C	7	AR
15	<i>Levolactobacillus</i>	99.9	<i>s/id</i>		N/C	4	AR
16	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	13	AR
17	<i>s/id</i>		<i>s/id</i>		C	4	AR
18	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	14	AR
19	<i>K.oxytoca</i>	99.9	<i>K.oxytoca</i>	99.9	C	11	AR
20	<i>P. aeruginosa</i>	99.9	<i>P.aeruginosa</i>	99.9	C	8	AR
21	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	16	ANA
22	<i>S.hominis</i>	99.9	<i>S.hominis</i>	99.9	C	16	AR
23	<i>S.aureus</i>	99.9	<i>S.aureus</i>	99.9	C	15	AR
24	<i>s/id</i>		<i>S.haemolyticus</i>	99.9	N/C	21	AR
25	<i>S.haemolyticus</i>	99.9	<i>S.haemolyticus</i>	99.9	C	18	AR
26	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.hominis/S.epidermidis</i>	50/50	C	20	AR
27	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	13	ANA
28	<i>St.pseudin/St.inter</i>	50/50	<i>S.epidermidis</i>	99.9	N/C	20	ANA
29	<i>K.pneumoniae/E.coli</i>	50/50	<i>K.pneumoniae/E.coli</i>	50/50	C	11	AR



Tabela dos dados totais do estudo experimental

Identificação	Id direta	Score Id Direta (%)	Id Standard	Score Id Standart (%)	Concordância	Tempo Positividade (Horas)	Tipo Garrafa
30	<i>E.hormaechei</i>	99.9	<i>E.complex</i>	99.9	C	9	AR
31	<i>E.horaeochei</i>	99.9	<i>E.cloace</i>	99.9	C	11	ANA
32	<i>s/id</i>		<i>S.epidermidis</i>	99.9	N/C	24	AR
33	<i>P. mirabilis</i>	99.9	<i>P. mirabilis</i>	99.9	C	22	AR
34	<i>S.aureus</i>	99.9	<i>S/id</i>		N/C	5	AR
35	<i>P. aeruginosa</i>	99.9	<i>P.aeruginosa</i>	99.9	C	24	AR
36	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	18	AR
37	<i>s/id</i>		<i>P.aeruginosa</i>	99.9	N/C	4	AR
38	<i>Lysinobacillus</i>	99.9	<i>s/id</i>		N/C	14	AR
39	<i>s/id</i>		<i>S.coagulase negativa</i>	99.9	N/C	20	AR
40	<i>s/id</i>		<i>s/id</i>		C	14	AR
41	<i>P. aeruginosa</i>	99.9	<i>P.aeruginosa</i>	99.9	C	8	AR
42	<i>S.hominis</i>	99.9	<i>S.hominis</i>	99.9	C	19	AR
43	<i>s/id</i>		<i>s/id</i>		C	17	AR
44	<i>E.hormaechei</i>	99.9	<i>E.hormaechei</i>	99.9	C	16	AR
45	<i>E.faecalis</i>	99.9	<i>E.faecalis</i>	99.9	C	20	AR
46	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	12	ANA
47	<i>s/id</i>		<i>S.epidermidis</i>	99.9	N/C	12	AR
48	<i>P. aeruginosa</i>	99.9	<i>P.aeruginosa</i>	99.9	C	24	MIC
49	<i>S.capitis</i>	99.9	<i>S.capitis</i>	99.9	C	20	AR
50	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	24	AR
51	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	20	ANA
52	<i>C.albicans</i>	96.0	<i>C.albicans</i>	99.9	C	24	AR
53	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	20	AR
54	<i>M. genitalium</i>	99.9	<i>Finegoldia magna</i>	99.9	N/C	24	ANA
55	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	24	AR
56	<i>s/id</i>		<i>S.epidermidis</i>	99.9	N/C	24	AR
57	<i>S.hominis/ M. morganii/ K.pneumoniae</i>	33.3	<i>S.epidermidis</i>	99.9	N/C	20	AR
58	<i>Ent.faecalis</i>	99.9	<i>E.faecalis</i>	99.9	C	18	AR
59	<i>S/id</i>		<i>S.aureus</i>	99.9	N/C	15	AR



	Id direta	Score Id Direta (%)	Id Standard	Score Id Standart (%)	Concordância	Tempo Positividade (Horas)	Tipo Garrafa
60	<i>S.hominis</i>	99.9	<i>S.coagulase negativa</i>	99.9	C	16	AR
61	<i>P. mirabilis</i>	99.9	<i>P. mirabilis</i>	99.9	C	24	AR
62	<i>S/id</i>		<i>s/id</i>		C	6	AR
63	<i>S.aureus</i>	99.9	<i>S.aureus</i>	99.9	C	22	AR
64	<i>S/id</i>		<i>s/id</i>		C	7	AR
65	<i>K.ox/Enter. Xing</i>	50/50	<i>E.cloace</i>	99.9	N/C	24	AR
66	<i>S.lugdneensis</i>	99.9	<i>S.lugdneensis</i>	99.9	C	24	AR
67	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	16	AR
68	<i>s/id</i>		<i>s/id</i>		C	6	AR
69	<i>s/id</i>		<i>E.faecium</i>	99.9	N/C	20	AR
70	<i>M. luteus</i>	99.9	<i>M. luteus</i>	99.9	C	24	AR
71	<i>C.difficile</i>	99.9	<i>s/id</i>		N/C	5	AR
72	<i>Plurib.gergoniae</i>	99.9	<i>C. koseri</i>	99.9	N/C	9	AR
73	<i>P. mirabilis</i>	99.9	<i>P. mirabilis</i>	99.9	C	12	AR
74	<i>S.hominis</i>	99.9	<i>S.hominis</i>	99.9	C	20	AR
75	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	9	AR
76	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	24	AR
77	<i>s/id</i>		<i>s/id</i>		C	6	AR
78	<i>E.faecium</i>	99.9	<i>E.faecium</i>	99.9	C	16	AR
79	<i>P. mirabilis</i>	99.9	<i>P. mirab.</i>	99.9	C	16	AR
80	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	13	AR
81	<i>B.cepacia</i>	99.9	<i>B.cepacia</i>	99.9	C	24	AR
82	<i>S.hominis</i>	99.9	<i>S.hominis</i>	99.9	C	19	AR
83	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	22	AR
84	<i>P. mirabilis</i>	99.9	<i>P. mirabilis</i>	99.9	C	14	AR
85	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	24	AR
86	<i>P. mirabilis</i>	99.9	<i>P. mirabilis</i>	99.9	C	9	ANA
87	<i>S.epidermidis</i>	98.7	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	21	ANA
88	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	9	AR
89	<i>S.aureus</i>	99.9	<i>S.aureus</i>	99.9	C	20	AR
90	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	12	AR
91	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	22	AR
92	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	17	AR



Tabela dos dados totais do estudo experimental

Identificação	Id direta	Score Id Direta (%)	Id Standard	Score Id Standart (%)	Concordância	Tempo Positividade (Horas)	Tipo Garrafa
93	<i>P. aeruginosa</i>	99.9	<i>P.aeruginosa</i>	99.9	C	22	AR
94	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	22	AR
95	<i>B. thuringiensis</i>	99.9	<i>B. thuringiensis</i>	99.9	C	24	AR
96	<i>S. salivaris</i>	99.9	<i>S. salivarius</i>	99.9	C	13	AR
97	<i>S. oralis/ S. mitis</i>	50/50	<i>S. oralis/S. mitis</i>	50/50	C	15	AR
98	<i>S. marcescens</i>	99.9	<i>S. marcescens</i>	99.9	C	17	AR
99	<i>S.aureus</i>	99.9	<i>S.aureus</i>	99.9	C	24	AR
100	<i>S.hominis</i>	99.9	<i>S.hominis</i>	99.9	C	16	AR
101	<i>S.simulans/S.auricularis</i>	50/50	<i>S. simulans</i>	99.9	C	18	AR
102	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	12	AR
103	<i>E.cloace</i>	99.9	<i>E.cloace</i>	99.9	C	18	AR
104	<i>s/id</i>		<i>Aeromonas veroni</i>	99.9	N/C	10	AR
105	<i>S.aureus</i>	99.9	<i>S.aureus</i>	99.9	C	23	AR
106	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	8	AR
107	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	<i>K.pneumoniae</i>	99.9	C	13	AR
108	<i>B.cepacia</i>	99.9	<i>B.cepacia</i>	99.9	C	17	AR
109	<i>S.capitis</i>	99.9	<i>S.capitis</i>	99.9	C	20	AR
110	<i>S. mitis/oralis</i>	99.9	<i>S. mitis/oralis</i>	99.9	C	23	AR
111	<i>S.saprophyticus</i>	99.9	<i>S.saprophyticus</i>	99.9	C	20	AR
112	<i>S.aureus</i>	99.9	<i>S.aureus</i>	99.9	C	19	AR
113	<i>P. aeruginosa</i>	99.9	<i>P.aeruginosa</i>	99.9	C	17	AR
114	<i>P. aeruginosa</i>	99.9	<i>P.aeruginosa</i>	99.9	C	17	AR
115	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	19	AR
116	<i>P. aeruginosa</i>	99.9	<i>P.aeruginosa</i>	99.9	C	17	AR
117	<i>S.pyogenes</i>	99.9	<i>S.pyogenes</i>	99.9	C	13	AR
118	<i>S.aureus</i>	99.9	<i>S.aureus</i>	99.9	C	19	Ar
119	<i>E.coli</i>	99.9	<i>E.coli</i>	99.9	C	14	AR
120	<i>S. mitis/oralis</i>	99.9	<i>S. mitis/oralis</i>	99.9	C	8	AR
121	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	24	AR
122	<i>S.epidermidis</i>	99.9	<i>S.epidermidis</i>	99.9	C	18	AR
123	<i>s/id</i>		<i>S/id</i>		C	9	AR
124	<i>Leuconostoc spp</i>	99.9	<i>Leuconostoc spp</i>	99.9	C	24	AR

Legenda: C – Concordante; NC – não concordantes; s/id – sem identificação



## Anexo 4

Tabela 5 - Teste McNemar Ensaio 1 vs Ensaio 2

		Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)
C	Teste de McNemar-Bowker	,000	0	.
	N de Casos Válidos	9		
NC	Teste de McNemar-Bowker	.	.	. <sup>b</sup>
	N de Casos Válidos	1		
Total	Teste de McNemar-Bowker	.	.	. <sup>a</sup>
	N de Casos Válidos	10		
a. Ambas as variáveis devem ter valores idênticos de categorias.				
b. Computados apenas para uma tabela PxP, em que P deve ser maior do que 1.				
a. Não considerando a hipótese nula.				

## Anexo 5

Tabela 6 - Teste McNemar Ensaio 2 vs Ensaio 3

		Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)
C	Teste de McNemar-Bowker	,000	0	.
	N de Casos Válidos	9		
NC	Teste de McNemar-Bowker	.	.	. <sup>a</sup>
	N de Casos Válidos	1		
Total	Teste de McNemar-Bowker	,000	0	.
	N de Casos Válidos	10		
a. Computados apenas para uma tabela PxP, em que P deve ser maior do que 1.				

## Anexo 6

Tabela 7 - Teste McNemar Ensaio 1 vs Ensaio 3

		Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)
C	Teste de McNemar-Bowker	,000	0	.
	N de Casos Válidos	9		
NC	Teste de McNemar-Bowker	.	.	. <sup>a</sup>
	N de Casos Válidos	1		
Total	Teste de McNemar-Bowker	,000	0	.
	N de Casos Válidos	10		
a. Computados apenas para uma tabela PxP, em que P deve ser maior do que 1.				

**Anexo 7**

Escala de Landis &amp; Koch (1977)

Valor de $\kappa$ (kappa)	Interpretação da concordância
< 0,00	Pobre
0,00 – 0,20	Leve ( <i>slight</i> )
0,21 – 0,40	Razoável ( <i>fair</i> )
0,41 – 0,60	Moderada ( <i>moderate</i> )
0,61 – 0,80	Substancial ( <i>substantial</i> )
0,81 – 1,00	Quase perfeita ( <i>almost perfect</i> )

**P.PORTO**

ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



**M**

**MESTRADO**

DESIGNAÇÃO DO MESTRADO