

REMARA

Rede EBSEERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos

**Protocolos operacionais
padrão**

Apresentação

É com grande satisfação que damos as boas-vindas aos pesquisadores, estudantes, profissionais de saúde e equipes laboratoriais dos hospitais universitários da Rede EBSEH que passam a integrar a Rede EBSEH de Monitoramento de *Aspergillus* spp. Resistentes a Antifúngicos (REMARA). Estamos muito felizes em iniciar este projeto de abrangência nacional, cuidadosamente planejado para ter aplicação direta no Sistema Único de Saúde (SUS), fortalecendo a integração entre assistência, ensino, pesquisa e vigilância em saúde. A participação ativa dos centros, envolvendo profissionais da saúde, docentes, residentes, pós-graduandos e estudantes de graduação, é fundamental para o êxito da Rede e para a formação de recursos humanos qualificados, comprometidos com a qualificação do cuidado aos pacientes e com a produção de evidências científicas relevantes para a saúde pública brasileira.

Desde sua concepção, o projeto foi estruturado de forma organizada, padronizada e plenamente compatível com a rotina hospitalar, com o objetivo de facilitar a adesão dos centros e assegurar a qualidade e a comparabilidade dos dados gerados, destacando-se como diferencial central desta iniciativa a oferta de diagnóstico em tempo real para os pacientes. Todo o material necessário para esta etapa clínico-laboratorial está disponibilizado aos centros participantes, incluindo Protocolos Operacionais Padrão (POPs), manuais clínicos e laboratoriais, cartazes e folders informativos, modelos padronizados de ficha de solicitação de exames, Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Termos de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), além de um Caderno de Registros para o controle físico das amostras, acompanhamento dos resultados e organização dos fluxos locais. O registro, a organização e o gerenciamento dos dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da Rede serão realizados por meio da plataforma REDCap, adotada como sistema oficial do projeto, garantindo rastreabilidade, segurança das informações e integração entre os centros.

Um diferencial estratégico adicional desta iniciativa é a padronização diagnóstica baseada no uso de kits comerciais desenvolvidos especificamente para o projeto. No âmbito do Edital CNPq RAM – 2022, a empresa parceira CECOM, de São Paulo, desenvolveu um kit de triagem para aspergilose inédito no Brasil, concebido para atender às necessidades desta Rede Nacional. Adicionalmente, será utilizado um kit rápido para detecção de IgG anti-*Aspergillus*, uma inovação no cenário nacional, cujos resultados poderão contribuir de forma decisiva para a avaliação do desempenho diagnóstico e para futuras estratégias de incorporação dessa tecnologia no SUS.

Um dos pontos cruciais do projeto será o envio dos isolados clínicos obtidos nos centros participantes ao centro coordenador, para identificação de espécies, confirmação fenotípica e molecular da resistência antifúngica, assegurando maior robustez analítica, padronização dos resultados e fortalecimento da vigilância nacional.

Embora estruturado como uma rede colaborativa de abrangência nacional, o projeto respeita e estimula a autonomia científica dos centros participantes, permitindo o desenvolvimento de estudos locais de prevalência, caracterização clínica e perfil epidemiológico da aspergilose, bem como a utilização dos dados para atividades de

iniciação científica, trabalhos de conclusão de curso, dissertações e teses, sempre em consonância com os princípios éticos e com as diretrizes de governança da Rede. Essa abordagem favorece a produção científica descentralizada, ao mesmo tempo em que preserva a padronização metodológica necessária para análises multicêntricas integradas.

Do ponto de vista estratégico, a adoção de insumos comerciais padronizados, aliada à organização rigorosa dos fluxos clínicos e laboratoriais, permitirá não apenas o aprimoramento do diagnóstico e do manejo terapêutico da aspergilose, mas também a geração de evidências sólidas para a realização de um estudo final de custo-efetividade. Esses dados são fundamentais para subsidiar processos de avaliação de tecnologias em saúde e apoiar decisões relacionadas à incorporação de métodos diagnósticos e estratégias terapêuticas no âmbito do SUS. Assim, ao integrar assistência, vigilância, inovação diagnóstica e avaliação econômica, a Rede REMARA consolida-se como uma iniciativa de relevância científica, assistencial e estratégica para o enfrentamento da aspergilose e da resistência antifúngica no Brasil.

Campo Grande, dezembro de 2025

James Venturini
Coordenador Geral

Perguntas e respostas

1. O que é a aspergilose e por que ela é importante para o SUS?

A aspergilose é um conjunto de doenças causadas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. fumigatus*, podendo se manifestar em diferentes formas clínicas, como aspergilose pulmonar crônica e aspergilose invasiva. Trata-se de uma condição de grande relevância no contexto hospitalar, sobretudo em pacientes com doenças pulmonares prévias, indivíduos críticos e pessoas imunocomprometidas, com impacto direto na morbimortalidade e na utilização de recursos assistenciais no SUS.

2. Por que a resistência antifúngica é uma preocupação crescente?

Os antifúngicos azólicos constituem a base do tratamento da aspergilose, e o aumento da resistência de *A. fumigatus* a esses medicamentos tem sido associado a falhas terapêuticas e elevadas taxas de mortalidade. A resistência antifúngica, portanto, é um desafio clínico emergente e uma prioridade para vigilância, diagnóstico oportuno e decisão terapêutica adequada.

3. Qual é a relação entre ambiente, agricultura e resistência antifúngica?

O uso extensivo de fungicidas azólicos na agricultura pode favorecer o surgimento de isolados ambientais resistentes, com potencial de exposição humana por inalação. Esse cenário reforça a necessidade de compreender a resistência antifúngica sob a perspectiva da Saúde Única (One Health), integrando dimensões da saúde humana, ambiental e animal.

4. Por que este projeto está sendo realizado?

No Brasil, poucos laboratórios realizam testes de suscetibilidade antifúngica para fungos filamentosos na rotina hospitalar, o que limita a detecção precoce da resistência e a geração de dados comparáveis entre serviços. Este projeto cria uma Rede Nacional de Vigilância no âmbito da EBSEH, com metodologia padronizada, suporte técnico e integração de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, visando fortalecer o diagnóstico e o monitoramento da resistência.

5. Qual é o papel do meu hospital na Rede?

Cada centro participante é essencial para o sucesso da Rede REMARA e contribuirá, de acordo com sua capacidade local, na identificação e inclusão de pacientes com suspeita clínica de aspergilose (aspergilose invasiva e aspergilose pulmonar crônica), na coleta de dados clínicos a partir dos prontuários, na obtenção de amostras biológicas conforme protocolo, na realização de exames de rotina e na triagem inicial de isolados de *Aspergillus* spp.. Quando indicado, os isolados poderão ser encaminhados ao centro coordenador para identificação de espécies e confirmação fenotípica e molecular da resistência. O registro e a organização dos dados serão realizados em caderno físico e, online, no REDCap, sempre respeitando os fluxos assistenciais e laboratoriais já estabelecidos em cada hospital.

6. Quem são os pacientes incluídos no estudo?

De modo geral e a depender de cada centro colaborador, serão incluídos pacientes desde a idade ≥ 2 anos, atendidos em ambulatórios, enfermarias ou unidades de terapia intensiva, com suspeita clínica de aspergilose definida segundo critérios padronizados do projeto, incluindo aspergilose pulmonar crônica e aspergilose invasiva. A participação está condicionada à assinatura do TCLE e, quando aplicável, do TALE.

7. Quais materiais biológicos serão coletados e o que será analisado?

Conforme indicação clínica e protocolo do estudo, poderão ser coletadas amostras respiratórias (por exemplo, escarro, lavado broncoalveolar e aspirado traqueal), sangue e exames de imagem, quando disponíveis. As amostras serão utilizadas para os objetivos do projeto, sem formação de biorrepositório, incluindo identificação de espécies, testes de suscetibilidade antifúngica, detecção de antígenos ou anticorpos no contexto da aspergilose, detecção de fenótipos resistentes/não selvagens, análises moleculares de mecanismos de resistência e estudos de epidemiologia molecular com correlação clínica. A coleta de material biológico constitui uma etapa crucial para o diagnóstico e solicitação de medicamentos antifúngicos pelo Ministério da Saúde.

8. Quais materiais e ferramentas serão disponibilizados aos centros participantes?

Serão disponibilizados POPs, manuais clínicos e laboratoriais, cartazes e folders, modelos de ficha de solicitação de exame, TCLE/TALE e caderno de registros para controle de amostras e resultados. O projeto também disponibiliza kits comerciais padronizados desenvolvidos pela CECON (São Paulo), incluindo um kit de triagem inédito no Brasil e um kit rápido para detecção de IgG anti-*Aspergillus*, além da plataforma REDCap para registro e gerenciamento dos dados da Rede.

9. Os centros poderão realizar estudos locais de prevalência e análises próprias?

Sim. O projeto incentiva a autonomia científica dos centros, permitindo o desenvolvimento de estudos locais de prevalência e caracterização clínica-epidemiológica, bem como o uso dos dados em atividades acadêmicas (iniciação científica, TCC, dissertações e teses), em consonância com os princípios éticos e com as diretrizes de governança e autoria estabelecidas pela Rede.

10. Quais são os resultados esperados e por que o estudo de custo-efetividade é importante?

Espera-se aprimorar o diagnóstico da aspergilose, detectar precocemente a resistência antifúngica, qualificar o direcionamento terapêutico e fortalecer a vigilância epidemiológica nacional. Além disso, a padronização diagnóstica com kits comerciais e a organização rigorosa dos fluxos permitirão gerar evidências robustas para um estudo final de custo-efetividade, essencial para subsidiar processos de avaliação de tecnologias em saúde e apoiar decisões de incorporação de métodos e tecnologias no SUS, especialmente no que se refere a estratégias de triagem e ao uso do teste rápido de IgG anti-*Aspergillus*.

Fluxograma Projeto REMARA

Suspeita de Aspergilose Pulmonar Crônica (APC): soro para teste rápido para detecção de IgM/IgG anti-*Aspergillus*.

Suspeita de Aspergilose Invasiva (AI): soro, lavado broncoalveolar ou aspirado traqueal para teste rápido para detecção de Galactomanana (GM).

+

acompanhada de amostra respiratória para cultura, isolamento de *Aspergillus* spp. e teste de sensibilidade antifúngica

Inclusão do paciente no estudo + TCLE no REDCap (POP 09) + envio de amostra para testes rápidos e culturas

ISOLAMENTO POP (01)

Compatível com *Aspergillus*

Não

Descarte

Sim

REDCap - atualização dos dados (POP 09, registro 3)

Purificação (POP02)

Repetir a purificação

Não

Purificação uniforme e homogênea indica pureza

Sim

Armazenamento + Atualização REDCap (POP 09 Registro 3)

Disco-difusão POP 05) + atualização do REDCap - Registro 3

Testes de triagem (POP 04) + atualização do REDCap - Registro 3

contactar o médico assistente ou setor responsável

Se fenótipo de resistência em qualquer uma das metodologias

Envio dos isolados (POP 08) + atualizar o REDCap (POP 09) - Registro 3

Figura 1: Fluxograma do Projeto REMARA, descrevendo as etapas de inclusão de pacientes, isolamento, purificação, testes de triagem e resistência de *Aspergillus* spp., bem como o registro em REDCap e armazenamento dos isolados.

SUMÁRIO

POP 01 – Isolamento de Fungos do Gênero <i>Aspergillus</i> de Amostras Respiratórias.....	05
• Objetivo.....	05
• Materiais e Equipamentos.....	06
• Procedimentos.....	06
• Ambiente de trabalho.....	06
○ Preparação do local.....	07
○ Identificação das placas.....	07
○ Isolamento de acordo com o tipo de amostra (escarro, lavado, tecido etc.)	08
○ Leitura de crescimento.....	09
○ Análise dos resultados.....	09
POP 02 – Purificação de cultura de <i>Aspergillus</i>.....	12
• Objetivo.....	12
• Materiais e Equipamentos.....	13
• Procedimentos de Purificação.....	13
• Verificação da Pureza.....	14
• Armazenamento.....	14
• Definições gerais das estruturas encontradas em espécies de <i>Aspergillus</i>	15
POP 03 – Identificação presuntiva de quatro seções do gênero <i>Aspergillus</i>.....	17
• Objetivo.....	17
• Materiais e Equipamentos.....	18
• Procedimentos.....	18
○ Método da Fita Adesiva.....	18
• Resultados.....	19
• Armazenamento.....	19
• Registro 1 POP 3.....	19
POP 04 – Teste de triagem de resistência a antifúngicos (<i>four-well-plate</i>).....	22
• Objetivo.....	22
• Materiais e Equipamentos.....	23
• Procedimentos.....	23
○ Cultivo dos fungos.....	24
○ Preparo do inóculo.....	24
○ Inoculação.....	24
• Análise e Interpretação dos Resultados.....	25
• Envio dos isolados.....	26

POP 05 – Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em <i>Aspergillus</i> spp.	29
• Objetivo.....	29
• Materiais e Equipamentos.....	30
• Procedimentos.....	30
o Cultivo.....	31
o Preparo do Inóculo.....	31
o Inoculação das Placas.....	32
o Adição dos Discos.....	32
o Incubação.....	33
o Leitura do Teste.....	33
• Análise e Interpretação.....	34
• Registro 1 POP 5	36
POP 08 – Envio e armazenamento de amostras.....	39
• Objetivo.....	39
• Procedimentos.....	40
POP 09 – REDCap de amostras clínicas.....	42
• Objetivo.....	42
• Dados Clínicos-Demográficos.....	49
• Registro Laboratoriais.....	55
POP 10 – ASPERGILLUS Immune Chromatography Technology -ICT (LDBIO) IgG-IgM.....	60
• Objetivo.....	60
• Materiais e Equipamentos.....	61
• Procedimentos.....	61
• Leitura e Interpretação.....	63
POP 11 – Aspergillus Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY).....	65
• Objetivo.....	65
• Materiais e Equipamentos.....	66
• Preparação das amostras.....	66
• Procedimentos.....	66
• Leitura e Interpretação.....	68

**Título: isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* de amostras respiratórias****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

OBJETIVO

Fornecer procedimentos técnicos para isolamento de fungos do gênero *Aspergillus*.

ABRANGÊNCIA

Equipe técnica do Projeto de Pesquisa Rede de Hospitais EBSEERH para identificação e monitoramento de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp resistentes aos antifúngicos.

RESTRIÇÃO

Esse documento é destinado apenas à equipe técnica.

DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido impresso e em versão online junto ao Laboratório do Centro Participante.

APROVAÇÃO

Este POP foi aprovado por Prof. Dr. James Venturini, em 29/09/2025.



Título: isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* de amostras respiratórias

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

1. APLICAÇÃO

Este POP se destina ao procedimento de isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* a partir de amostras respiratórias (escarro, secreção traqueal, lavado bronco-alveolar, saliva ou tecido obtido por biópsia).

Cabe considerar que este POP não substitui os procedimentos usuais do laboratório para isolamento de fungos a partir de amostras respiratórias.

2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Alça de inoculação
- Bisturi e placa de Petri pequena (60 mm de diâmetro), para fragmentação de tecidos
- Envelope 1 com etiquetas de isolamento
- Microtubo de 2mL contendo água
- Pipeta Pasteur de 3 mL descartáveis estéreis
- Placa de Petri contendo ágar DRBC
- Recipiente para descarte
- Solução de álcool 70%
- Solução de N-acetil-cisteína
- Tubo centrífuga de 15 mL
- Tubo centrífuga de 50 mL
- Cabine de segurança biológica contendo lâmpada UV ou bancada com bico de Bunsen
- Centrífuga
- Estufa bacteriológica 35°C ± 2,0°C

3. PROCEDIMENTOS

3.1 Ambiente de Trabalho

- Laboratório de nível de segurança NB-2.

**Título: isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* de amostras respiratórias****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

3.2 Preparação do Local

- Desinfetar a superfície de trabalho com álcool 70%
- Repetir o mesmo processo após o uso

3.3 Identificação das Placas

- Retirar do refrigerador as placas de Petri contendo ágar DRBC e deixá-las por 15 minutos em temperatura ambiente
- Para identificação, preencher e colocar as etiquetas no verso da placa de Petri

3.4 Isolamento

- Para o procedimento de plaqueamento, serão utilizados \pm 500 μ L da amostra
- Recomenda-se seguir os procedimentos padronizados adotados pelo hospital

3.5 Amostras de escarro e secreção traqueal

- Transferir a enzima N-acetil-cisteína para o frasco de coleta contendo a amostra de escarro ou de secreção traqueal. O volume da enzima deverá ser aproximadamente o mesmo da amostra biológica.
- Manter por um período de 3 a 12 h em repouso, à 35 + 2 °C em estufa.
- Transferir o conteúdo para o tubo centrífuga de 15 mL.
- Centrifugar o tubo a 2500 rpm, por 10-15 m, em temperatura ambiente.
- Desprezar o sobrenadante e pipetar o sedimento (+ 500 μ L ou 10 gotas), com pipeta Pasteur.
- Espalhar o líquido com auxílio da alça de inoculação, conforme a técnica de esgotamento (Figura 01).
- Incubar as placas de Petri em uma estufa a 35 + 2 °C, sempre com a parte que contém o ágar para cima (placa invertida).
- A partir de 48 h, observar diariamente o aparecimento de colônias na superfície do meio de cultura.

**Título: isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* de amostras respiratórias****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

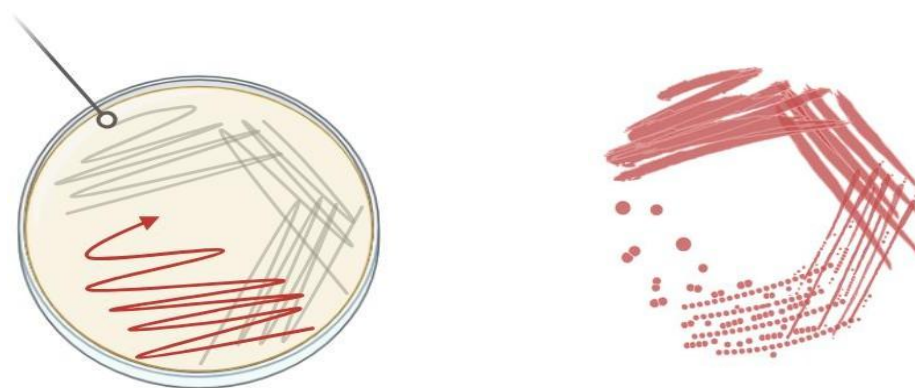


Figura 01. Ágar após a semeadura pela técnica de esgotamento.

3.6 Amostras de lavado bronco-alveolar e saliva

- Transferir toda a amostra para o tubo centrífuga de 15 mL ou de 50 mL de acordo com o volume obtido durante o procedimento.
- Centrifugar o tubo a 2500 rpm, por 10-15 m, em temperatura ambiente.
- Desprezar o sobrenadante e pipetar o sedimento (+ 500 µL ou 10 gotas), com pipeta Pasteur. Espalhar o líquido com auxílio da alça de inoculação, conforme a técnica de esgotamento (Figura 01)
- Incubar as placas de Petri em uma estufa a 35 + 2°C, sempre com a parte que contém o ágar para cima (placa invertida).
- A partir de 48 h, observar diariamente o aparecimento de colônias na superfície do meio de cultura.

3.7 Amostras de tecido

- Transferir o tecido para uma placa de Petri e fragmentá-lo ao máximo, com auxílio do bisturi.
- Semear todos os fragmentos no ágar, com auxílio da alça de inoculação, de modo a manter dispersos os fragmentos.
- Incubar as placas de Petri em uma estufa a 35 + 2°C (não inverter a placa).

**Título: isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* de amostras respiratórias****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

- A partir de 48 h, observar diariamente o aparecimento de colônias na superfície do meio de cultura.

3.8 LEITURA DE CRESCIMENTO

- Observar o aparecimento de colônias entre 48 h a 7 dias. Identificar cada colônia (letras) no verso da placa.
- Realizar análise morfológica de cada colônia.

3.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Com base nos aspectos morfológicos de cada colônia, conforme Anexo I, verificar e proceder:

- Presença de crescimento fúngico, sem suspeita de *Aspergillus* spp., desprezar a(s) colônia(s).
- Colônias com aspectos distintos, seguir para purificação no POP 02.
- Colônias com morfologia semelhante, seguir para o POP 03.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Aspergillus são fungos com hifas hialinas e o início de crescimento mostra colônias brancas. A formação de conídios (esporos) acontece a partir das 48h e confere coloração às culturas.

A. Seção *Fumigati* (*Aspergillus fumigatus* e outras espécies)

Alguns membros deste complexo (*A. fumigatus* sensu stricto e *A. thermomutatus*) são termotolerantes e capazes de crescer em até 50°C. Colônias verde-acinzentadas esfumadas ou verde-azuladas são produzidas a partir de 48h. A textura da superfície da cultura se assemelha a um pó (polverulenta). Um pigmento amarelo pode ser produzido por algumas cepas, o qual é visto no reverso das colônias. Para outras cepas, o reverso pode ser branco a castanho.

**REMARA**Rede EBSERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO****POP 01****Título: isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* de amostras respiratórias****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

B. Seção Flavi (*Aspergillus flavus* e outras)

As colônias da seção Flavi são verde-amareladas (às vezes, verde-limão), a partir de 48h. O reverso da colônia tem cor dourada a marrom-avermelhada.

C. Seção Terrei (*Aspergillus terreus* e outras)

Os fungos da seção Terrei geralmente produzem colônias em tonalidades da cor canela. A pigmentação das colônias também pode ser marrom, bege, marrom-alaranjada ou amarelo. O reverso da cultura apresenta tons de caramelo. A pigmentação é observada a partir de 48h.

D. Seção Nigri (*Aspergillus niger* e outras)

Os fungos da seção Nigri englobam as espécies mais facilmente identificáveis do gênero *Aspergillus* devido ao efeito característico de "pimenta preta" observado em colônias esporuladas. As colônias são, inicialmente, cobertas com micélio (conjunto de hifas) aéreo, branco, amarelo e com textura cotonosa. À medida que a colônia amadurece, se torna coberta por denso agregado de conídios pretos, criando uma sobreposição semelhante à de "sal e pimenta". Uma borda branca (micélio ainda sem esporos) ao redor de colônia madura é típica desta seção. O reverso da colônia é bege, castanho, amarelo, branco ou creme.

Atenção: Preencher o REDCap (POP 09) e a ficha do isolado após análise.



REMARA

Rede EBSEH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos

**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO**

POP 01

Título: isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* de amostras respiratórias

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

BIBLIOGRAFIA

Manual de coleta, acondicionamento e transporte de amostras para exames laboratoriais/
(organizado por) Elza Gadelha Lima. (et al.) – 2ª. ed. Fortaleza: SESA, 2013.

SILVA, R. R. S. Semeadura Primária de Amostras Biológicas em Laboratório de Microbiologia.
Disponível em: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/microbiologia/avaliacoes_especificas/40-SEM]

**TÍTULO: Purificação de cultura de *Aspergillus*****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
3	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

OBJETIVO

Padronizar o procedimento de purificação das culturas obtidas em hospitais terciários participantes do estudo com isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp., assegurando a integridade, a rastreabilidade, a qualidade e a comparabilidade dos resultados.

ABRANGÊNCIA

Equipe técnica do Projeto de Pesquisa Rede de Hospitais EBSEERH para identificação e monitoramento de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp resistentes aos antifúngicos.

RESTRIÇÃO

Esse documento é restrito apenas à equipe técnica.

DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido impresso e em versão online junto ao Laboratório do Centro Participante.

APROVAÇÃO

Este POP foi aprovado por Prof. Dr. James Venturini, em 29/09/2025.

**TÍTULO: Purificação de cultura de *Aspergillus*****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
3	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

1. APLICAÇÃO

Este procedimento aplica-se a todos os profissionais envolvidos na manipulação, processamento e purificação das amostras clínicas e ambientais em laboratórios vinculados ao estudo.

2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Alça de inoculação
- Lactofenol azul algodão
- Lâmina de microscopia
- Lamínula
- Placa de Petri contendo ágar batata dextrose
- Microscópio
- Estufa Bacteriológica 35°C ± 2°C

3. PURIFICAÇÃO DA(S) COLÔNIA(S)

- Nas colônias recuperadas na placa de Petri, diferenciar as de aspecto leveduriforme (cremosa) das de aspecto filamentosas (POP 3).
- Identificar com uma letra, no verso da placa, cada colônia de fungo filamentosas.
- Examinar cada colônia em uma gota de lactofenol azul algodão entre lâmina e lamínula sob aumento de 400x.
- Selecionar as colônias de interesse (suspeitas de *Aspergillus* spp.) para retirar uma porção e semear por esgotamento (Figura 01) em outra placa contendo meio ágar batata, identificando corretamente cada placa com etiqueta.
- Manter em estufa 35 ± 2°C até o aparecimento das colônias (máximo de 7 dias).

**TÍTULO: Purificação de cultura de *Aspergillus*****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
3	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

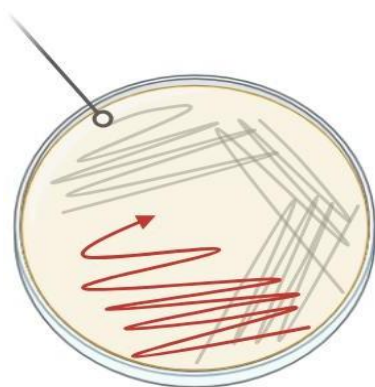


Figura 01. Esquema de crescimento de colônias isoladas em á gar, após a semeadura pela técnica de esgotamento

3.1 Verificação da Pureza

- Analisar aspectos da(s) colônia(s) e verificar se elas são uniformes.
- Repetir o processo até a obtenção de colônias com morfologias semelhantes, indicando cultura pura.
- Realizar exame microscópico de uma colônia isolada confirmando estruturas compatíveis com *Aspergillus* spp. e seguir para POP 03.

**TÍTULO: Purificação de cultura de *Aspergillus*****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
3	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Anexo 01**Definições gerais das estruturas encontradas em espécies de
*Aspergillus*****(imagens ilustrativas estão disponíveis no Manual Laboratorial)****Conidióforo:** hifa com função reprodutiva que dá origem à vesícula**Vesícula:** extremidade dilatada (arredondada ou ovalada) do conidióforo de *Aspergillus***Fiálide:** projeção da vesícula, em forma de frasco, produz conídios, pode ser bisseriada ou unisseriada**Métula:** ramo sobre vesícula, dando origem a fiálides**Unisseriada:** camada única de fiálides**Bisseriadas:** duas fiálides sobrepostas**Colunar:** disposição de conídios em cadeias justapostas, semelhante a colunas**Irrradiadas:** disposição de conídios em forma de raios dispersos**Identificação de *Aspergillus*****Observação:** Se atender a três ou mais critérios, considerar a seção.**Seção Fumigati (*Aspergillus fumigatus* e outras espécies)**

Hifas hialinas e septadas.

Conidióforos de paredes lisas e curtos.

Fiálides unisseriadas e compactadas, conferindo aparência colunar às cabeças conidiais.

Seção Flavi (*Aspergillus flavus* e outras espécies)

Hifas hialinas e septadas.

**TÍTULO: Purificação de cultura de *Aspergillus*****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
3	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Conidióforos de comprimento variável, ásperos, com sulcos e espinhosos.
Fíalides podem ser unisseriadas ou bisseriadas.
Métulas cobrem quase toda a vesícula em cepas bisseriadas.

Seção Terrei (*Aspergillus terreus* e outras espécies)

Hifas hialinas e septadas.
Fiálides apenas na metade superior da vesícula.
Cabeças conidiais compactas, colunares e bisseriadas.
Conidióforos hialinos e de parede lisa.
Produção de conídios ao longo das hifas (conídios acessórios).

Seção Nigri (*Aspergillus niger* e outras espécies)

Hifas hialinas e septadas.
Conidióforos longos e lisos.
Fiálides bisseriadas ao redor de toda a vesícula, com conídios cobrindo a superfície.
Conídios pretos ou acastanhados, ásperos e globosos.

Atenção: Preencher o REDCap (POP 09) e a ficha do isolado após análise.

**Título: Identificação presuntiva de quatro seções do gênero *Aspergillus*****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Stefanes	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

OBJETIVO

Padronizar os procedimentos para a identificação de fungos do gênero *Aspergillus* das seções Fumigati, Terrei, Nigri e Flavi.

ABRANGÊNCIA

Equipe técnica do Projeto de Pesquisa Rede de Hospitais EBSEERH para identificação e monitoramento de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp. resistentes aos antifúngicos.

RESTRIÇÃO

Esse documento é restrito apenas à equipe técnica.

DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido impresso e em versão online junto ao Laboratório do Centro Participante.

APROVAÇÃO

Este POP foi aprovado por Prof. Dr. James Venturini, em 29/09/2025.

**Título: Identificação presuntiva de quatro seções do gênero *Aspergillus*****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Stefanes	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

1. APLICAÇÃO

Este Procedimento Operacional Padrão (POP) é destinado à identificação presuntiva de quatro seções do gênero *Aspergillus* spp. provenientes de amostras biológicas, utilizando análise morfológica das colônias e análise microscópica das colônias pelo método rápido por fita adesiva.

2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Álcool 70%
- Fita adesiva transparente
- Lâmina de microscopia previamente desengordurada em álcool
- Placa de Petri contendo a cultura pura sob suspeita de *Aspergillus* spp.
- Cabine de segurança biológica contendo lâmpada UV ou bico de Bunsen
- Microscópio

3. PROCEDIMENTOS**3.1 Ambiente de Trabalho**

- Laboratório de nível de segurança NB-2.

3.2 Preparação do Local

- Desinfetar a superfície de trabalho com álcool a 70%
- Repetir o mesmo processo após o uso

3.3 Análise morfológica das colônias

- Utilizar a folha de Registro 1-POP 3 para documentar as características que permitem identificação presuntiva da seção de *Aspergillus* spp.

**Título: Identificação presuntiva de quatro seções do gênero *Aspergillus*****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Stefanes	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

3.4 Método da fita adesiva transparente

- Prender um pedaço (+5 cm) de fita adesiva transparente à ponta de uma alça descartável
- Aplicar a parte adesiva, suavemente, sobre a superfície da colônia para retirada de porção dos esporos.
- Colar a fita adesiva, contendo micélio, em uma lâmina de microscopia previamente identificada.
- Focar o conteúdo da fita sob microscopia (100 x ou 200x)
- Passar para aumento de 400x para identificar as estruturas: hifas, vesículas e conídios (Anexo 01 - POP 2).

4. RESULTADOS

De acordo com a análise da morfologia da colônia e das estruturas microscópicas identificar o isolado, de modo presuntivo, em uma das seguintes possibilidades:

- Seção Fumigati
- Seção Terrei
- Seção Nigri
- Seção Flavi
- *Aspergillus* spp.
- Fungo filamentoso

Registrar o resultado de identificação presuntiva no banco de dados REDCap (POP 09).

5. ARMAZENAMENTO

- Retirar 2 alçadas de esporos e colocar em cada um de 2 Microtubos contendo água destilada estéril
- Manter os 2 Microtubos em geladeira
- Utilizar um Microtubo para a realização dos testes de triagem (POP 04) e Disco-difusão (POP 05), além de servir como cópia de segurança.
- Enviar o outro Microtubo para o laboratório referência, para identificação de espécie e determinação da concentração inibitória mínima (MIC).

**REMARA**Rede EBSERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO****POP 03****Título: Identificação presuntiva de quatro seções do gênero *Aspergillus*****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Stefanes	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Registro 1 POP3**Identificação presuntiva da seção de *Aspergillus*****A. Seção Fumigati (*Aspergillus fumigatus* e outras espécies)**

Colônias verde-acinzentadas ou verde azuladas, com textura semelhante a pó (pulverulenta). Culturas com mais de 7 dias podem liberar névoa de esporos que “esfumaçam” a tampa da placa de Petri. Pigmento amarelo pode ser produzido por alguns isolados, o qual é visto pelo verso da placa; para outros o reverso pode ser branco a castanho.

B. Seção Flavi (*Aspergillus flavus* e outras)

Colônias verde-amareladas, às vezes, verde-limão, com aspecto de “grama” a partir de 48 h. O reverso da colônia tem cor dourada a marrom-avermelhada.

C. Seção Terrei (*Aspergillus terreus* e outras)

Colônias em tonalidades da cor canela, partir de 48 h; podem ainda ser marrom, bege, marrom-alaranjada ou amarelo, semelhante à terra marrom. O reverso da cultura apresenta tons de caramelo.

D. Seção Nigri (*Aspergillus niger* e outras)

Colônias escuras, com aspecto de “pimenta preta” muito característico da seção. As colônias são, inicialmente, brancas, levemente amareladas e com textura cotonosa. À medida que as colônias amadurecem, se tornam cobertas por denso agregado de conídios pretos. Uma borda branca (micélio ainda sem esporos) ao redor de colônia madura negra é típica desta seção. O reverso da colônia é bege, castanho, amarelo, branco ou creme.

Atenção: Preencher o REDCap (POP 09) e a ficha do isolado após análise.



REMARA

Rede EBSEH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos

**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO**

POP 03

Título: Identificação presuntiva de quatro seções do gênero *Aspergillus*

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	24/06/25	5	Emissão inicial	Wesley Stefanes	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

BIBLIOGRAFIA

LACAZ, Carlos da Silva; PORTO, Edward; HEINS-VACCARI, Elizabeth Maria; MELO, Natalina Takahashi de. **Guia para Identificação Fungos Actinomicetos Algas de Interesse Médico**. São Paulo: Sarvier, 1998. 445 p.

**Título: Teste de triagem de resistência a antifúngicos (*four-well-plate*)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

OBJETIVO

O objetivo é fornecer um guia para auxiliar no teste de triagem de resistência, considerando o isolado como não sensível ou não selvagem, a antifúngicos azólicos e equinocandinas.

ABRANGÊNCIA

Equipe técnica do Projeto de Pesquisa Rede de Hospitais EBSEERH para identificação e monitoramento de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp. resistentes aos antifúngicos.

DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido impresso e em versão *online* junto ao Laboratório do Centro Participante.

RESTRIÇÃO

Esse documento é restrito apenas à equipe técnica.

APROVAÇÃO

Este POP foi aprovado por Prof. Dr. James Venturini, em 29/09/2025.

**Título: Teste de triagem de resistência a antifúngicos (*four-well-plate*)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

1. APLICAÇÃO

Este POP se destina a detectar isolado fúngico de *Aspergillus* como não sensível a antifúngico azólico e/ou não selvagem a equinocandina, considerado como resistente no teste de triagem.

2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Álcool 70%
- Água de injeção e microtubo para envio de amostras
- Cartão de Wikerham (McFarland), envelope 2
- Envelope 2 de etiquetas do teste de triagem
- Escala de McFarland tubo 0,5
- Eppendorf 2mL contendo solução salina e *Tween 20*[®]
- 1 placa com 4 orifícios contendo meio de cultura adicionado de itraconazol, voriconazol, posaconazol e um sem antifúngico
- 1 placa com 4 orifícios contendo meio de cultura adicionado de anidulafungina, micafungina e dois orifícios sem antifúngico
- Ponteira de 200 µL para pipetar 25 µL
- *Swab*
- Tubo de ensaio de vidro
- Cabine de segurança biológica contendo lâmpada UV ou bico de Bunsen
- Estufa bacteriológica 35°C ± 2°C
- Placa de Petri contendo ágar batata para obtenção de cultura fúngica

Observação: todos os materiais devem ser estéreis.

3. PROCEDIMENTOS**3.1 Ambiente de Trabalho**

- Laboratório de nível de segurança NB-2.

3.2 Preparação do Local

**Título: Teste de triagem de resistência a antifúngicos (*four-well-plate*)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Atenção: Realize o teste de triagem no mesmo dia e com o mesmo inóculo preparado para o teste de disco-difusão (POP 05).

- Desinfetar a superfície de trabalho com álcool 70%;
- Repetir o mesmo processo após o uso
- A escala de McFarland deve ser mantida em geladeira e no escuro
- Retirar da geladeira 30 min. antes do uso as placas de 4 orifícios contendo ágar
- Identificar o Microtubo e o tubo de ensaio em que será preparado o inóculo, bem como a placa de 4 orifícios, com número do isolado e data de execução

3.3 Cultivo dos Fungos

- Retirar o tubo contendo suspensão fúngica armazenada e cultivar (1mL) em ágar batata distribuído em placa de Petri por esgotamento da alça
- Incubar a placa a 35°C ± 2°C por 48 h a 96 h, até esporular
- Confirmar a pureza da cultura e se for o caso, retomar POP 2 até a purificação
- Preparar cultura de cepa-padrão sob os mesmos procedimentos descritos para os isolados fúngicos

3.4 Preparo do Inóculo

- Utilizar a cultura da placa de Petri e passar suavemente um *swab* umedecido, na solução salina com *Tween 20*®, para extrair conídios, evitando retirar hifas
- Mergulhar o *swab* contendo esporos na solução salina com *Tween 20*® para o preparo da suspensão fúngica no Microtubo
- Deixar sedimentar por 5 min., aproximadamente, para garantir que eventuais hifas sejam decantadas
- Transferir o sobrenadante para um tubo de ensaio de ensaio (deve ser idêntico ao da escala McFarland)
- Homogeneizar a suspensão fúngica por inversão do tubo
- Ajustar a turbidez da suspensão, igual a do tubo 0,5 da escala de McFarland (corresponde a 1-5 x 10⁶ células/mL), adicionando mais solução salina se ficar mais forte do que a escala. No caso de ficar mais fraco do que a escala, retirar mais um pouco de esporos da cultura e adicionar ao tubo contendo salina e *Tween 20*®, repetir o procedimento.

3.4 Inoculação e Incubação da Placa de 4 poços

**Título: Teste de triagem de resistência a antifúngicos (*four-well-plate*)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

- Pipetar 25 µL da suspensão fúngica, no centro de cada poço contendo ágar, conforme Figura 1.
- Pipetar primeiro nos dois poços contendo ágar sem antifúngico destinados a controle positivo de crescimento e, em seguida, pipetar sobre cada ágar adicionado de um antifúngico
- Um poço não será adicionado de inóculo pois servirá como controle negativo de crescimento
- Aguardar até a absorção do inóculo no ágar
- Incubar a placa assim inoculada em estufa bacteriológica 35°C ± 2°C por 48 h para conferir aparecimento, ou não, de colônias presumivelmente resistentes

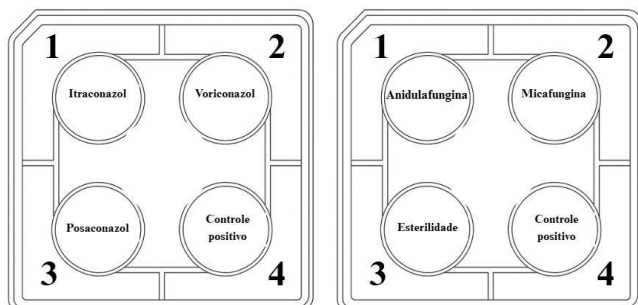


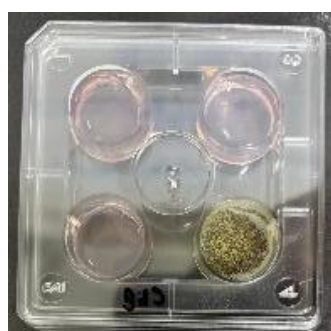
Figura 1. Esquema de placa para teste de triagem de resistência a antifúngicos azólicos e equinocandinas

4. ANALISE E INTERPRETAÇÃO

- Avaliar o crescimento de colônias após 48 h para azóis e 24h para equinocandinas.
- O poço de controle de crescimento deve produzir crescimento para validar os resultados. Exemplos de crescimento de colônias constam da Figura 2. Qualquer quantidade de colônias nos poços contendo antifúngicos conta como crescimento para os propósitos deste ensaio e devem ser interpretados como resistência.
- Marcar resultado para cada um dos 5 antifúngicos (Folha de Registro 1 POP 4)
- Marcar resultado para cada um dos 5 antifúngicos no arquivo REDCap.

**Título: Teste de triagem de resistência a antifúngicos (*four-well-plate*)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem



(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 2. Exemplos de crescimento de colônias no teste de triagem de resistência. A. Controle positivo com crescimento; B. Crescimento fraco sem esporulação; C. Crescimento moderado sem esporulação D. Crescimento abundante com início de esporulação.

4.1 LEITURA DO TESTE PARA EQUINOCANDINAS

- A leitura do teste deve considerar o aspecto da colônia que, em caso de ser sensível, apresenta alteração morfológica, não algodonosa, compacta e sem margem radiada contendo micélio. (Figura 3 A).
- Colônia resistente ou com resistência presumível (Figura 3 B) é semelhante ao controle positivo (Figura 3 C), com aspecto algodonoso e margem radiada de micélio.



EUCAST E.Def 10.3, 2025

**Título: Teste de triagem de resistência a antifúngicos (*four-well-plate*)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

5. ENVIO DOS ISOLADOS RESISTENTES NA TRIAGEM PARA LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA

- Em caso de crescimento de colônias, presumivelmente resistentes (não sensíveis a azóis ou não selvagens a equinocandinas), estas devem ser enviadas ao laboratório de referência.
- Retirar as colônias com swab e eluir na água contida no Microtubo.
- Identificar o Microtubo com o número do isolado acrescido de uma das siglas:
 - RI (resistente a itraconazol),
 - RV (resistente a voriconazol),
 - RP (resistente a posaconazol),
 - RA (resistente a anidulafungina ou
 - RM (resistente a micafungina).



REMARA

Rede EBSERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos

**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO**

POP 04

Título: Teste de triagem de resistência a antifúngicos (*four-well-plate*)

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

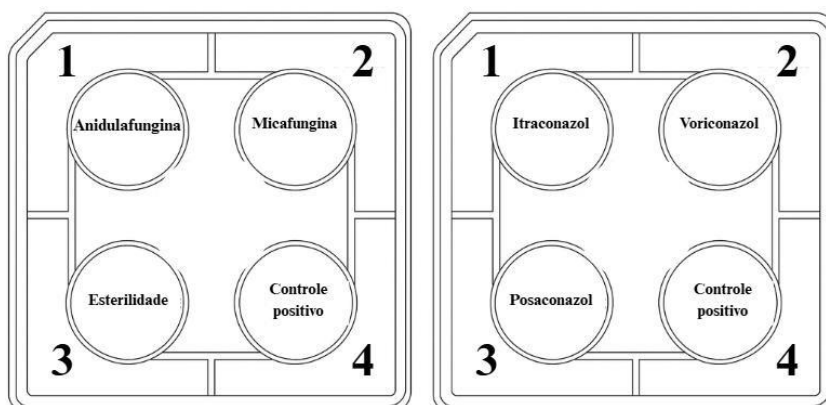
Folha de Registro 1 POP4

Resultado de teste de triagem a antifúngicos

Isolado: _____

Data: _____

Responsável: _____



Placa de azólicos

Placa de equinocandinas

Itraconazol: Resistente Sensível

Voriconazol: Resistente Sensível

Posaconazol: Resistente Sensível

Anidulafungina: Resistente Sensível

Micafungina: Resistente Sensível

Atenção: Preencher o REDCap (POP 09) e a ficha do isolado após análise.

**Título: Teste de triagem de resistência a antifúngicos (*four-well-plate*)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	23/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

BIBLIOGRAFIA

Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard - M38 Third Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for antifungal susceptibility testing as recommended by EUCAST. 2018. Version 2.0, 2018.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST E.Def 10.3. Screening method for the detection of azole and echinocandin resistance in *Aspergillus* using antifungal- containing agar plates, exemplified by *A. fumigatus*. 2025.

**REMARA**Rede EBSEERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO****POP 05****TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

OBJETIVO

Implementação do método de triagem a antifúngicos por meio de disco-difusão Cecon (Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos LTDA).

ABRANGÊNCIA

Equipe técnica do Projeto de Pesquisa Rede de Hospitais EBSEERH, para identificação e monitoramento de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp. resistentes aos antifúngicos.

DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido impresso e em versão *online* junto ao Laboratório do Centro Participante.

RESTRIÇÃO

Esse documento é restrito apenas à equipe técnica.

APROVAÇÃO

Este POP foi aprovado por Prof. Dr. James Venturini, em 29/09/2025.

**TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

1. APLICAÇÃO

Este POP se destina ao procedimento de disco-difusão antifúngico.

2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Álcool 70%
- Algodão ou gaze estéril
- Alça inoculadora
- Cartão de Wikerham (McFarland), envelope 2
- Discos-difusão da cecon
- Envelope 2, etiquetas para o teste disco-difusão
- Eppendorf 2mL contendo solução salina e Tween 20®
- Tubo 0,5 da escala de McFarland
- Pinça para manusear discos
- Kit de Placas de Petri/batata (CECON)
- Kit de Placas de ágar/Mueller-Hinton (CECON)
- Régua milimetrada (CECON)
- Swabs
- Tubo de vidro
- Cabine de segurança biológica contendo lâmpada UV ou bancada com bico de Bunsen
- Estufa Bacteriológica 35°C ± 2°C

Observação: todos os materiais devem ser estéreis.

3. PROCEDIMENTOS**3.1 Ambiente de Trabalho**

Laboratório de nível de segurança NB-2.

3.2 Preparação do Local

**TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Atenção: Realize o teste de disco-difusão no mesmo dia e com o mesmo inóculo preparado para o teste de triagem (POP 04).

- Desinfetar a superfície de trabalho com álcool a 70%.
- Repetir o mesmo processo após o uso.
- A escala de McFarland deve ser mantida em geladeira e no escuro.
- Os discos devem ser retirados da geladeira 30 minutos antes da sua utilização.
- As etapas de preparação do teste, incluindo preparo do inóculo, semeadura no ágar e aplicação dos discos nas placas de Petri, devem ser realizadas em cabine de segurança biológica.
- O tubo em que será preparado o inóculo, bem como a placa de Petri onde será realizado o teste, devem ser previamente identificadas com número do isolado e data de execução.

3.3 Cultivo dos Fungos

- Retirar o tubo contendo suspensão fúngica armazenada e cultivar por esgotamento (1 mL) em ágar batata.
- Incubar a 35°C ± 2°C 48h ou até esporular (máximo 7 dias).
- Confirmar a pureza da cultura e, se for o caso, retornar ao POP 2 até purificação.
- Preparar cultura de cepa-padrão, segundo as mesmas instruções deste POP, para avaliar cada lote de placa preparada com meio Mueller-Hinton e a cada novo lote de discos.

3.4 Preparo do Inóculo

- Utilizar a cultura da placa de Petri e passar suavemente um *swab* umedecido, na solução salina com *Tween 20*®, para extrair conídios, evitando retirar hifas
- Mergulhar o *swab* contendo esporos na solução salina com *Tween 20*® para o preparo da suspensão fúngica no Microtubo (microtubo)
- Deixar sedimentar por 5 min., aproximadamente, para garantir que eventuais hifas sejam decantadas
- Transferir o sobrenadante para um tubo de ensaio de ensaio (deve ser idêntico ao da escala McFarland)
- Homogeneizar a suspensão fúngica por inversão do tubo
- Ajustar a turbidez da suspensão, igual a do tubo 0,5 da escala de McFarland (corresponde a 1-5 x 10⁶ células/mL), adicionando mais solução salina se ficar mais forte do que a escala. No caso de

**TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

ficar mais fraco do que a escala, retirar mais um pouco de esporos da cultura e adicionar ao tubo contendo salina e Tween 20®, repetir o procedimento.

3.5 Inoculação das Placas

- A inoculação da suspensão fúngica deve ser feita dentro de 15 min. após ajuste da turbidez e, se não for possível, armazenar a suspensão na geladeira por até duas horas.
- Mergulhar um *swab* estéril na suspensão e remover o excesso de fluido pressionando o algodão contra a parede interna do tubo.
- Inocular a superfície seca de ágar Mueller-Hinton de modo uniforme e em toda a placa usando o *swab*;
- Repetir o procedimento mais duas vezes, girando a placa, aproximadamente 60°, a cada vez, para garantir distribuição uniforme e sobre toda a superfície do ágar.
- Reintroduzir o *swab* na suspensão e esgotá-lo na parede do tubo, caso o *swab* fique seco, garantindo que toda a superfície do ágar seja inoculada.

3.6 Adição dos discos contendo antifúngicos

- Aguardar absorção total do inóculo no ágar.
- Colocar o disco CECON sobre o ágar inoculado, com auxílio de pinça desinfetada em álcool 70%.
- Colocar no máximo 3 discos, em uma placa de 90 x 150 mm (Figura 01), desinfetando sempre a alça antes do uso.

ATENÇÃO: Os discos devem ser distribuídos de modo uniforme, mantendo uma distância mínima de 2cm de centro a centro e 1 cm da borda da placa de Petri.

Não mover um disco já depositado que tenha ficado fora do lugar desejado, pois a difusão do antifúngico no ágar se inicia imediatamente. Neste caso e se necessário, colocar um novo disco em outro local.



TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

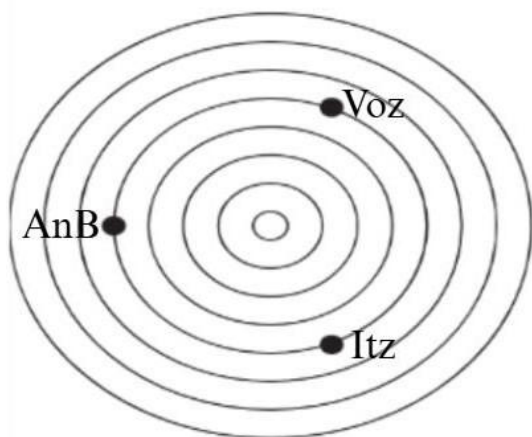


Figura 01. Desenho guia de placa de Petri para teste de disco-difusão ilustrando posição de 3 discos

3.7 Incubação das Placas

- Incubar as placas à $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por até 48 h. Caso não haja crescimento nesse período, manter em estufa até 48h ou até o desenvolvimento de colônias (máximo 7 dias).

3.8 Leitura do Teste

- Ler as placas somente se as colônias estiverem confluentes e formando um tapete homogêneo de crescimento.
- Examinar cada placa em busca do halo de inibição de crescimento fúngico formado pela difusão do antifúngico, a partir de cada disco (Figuras 02 e 03).
- Medir o halo com halômetro, no verso da placa, centralizando em cada disco.



TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

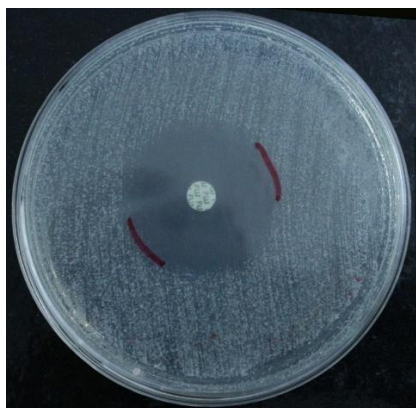


Figura 02. Exemplo de ponto de leitura do halo de inibição no teste de disco-difusão

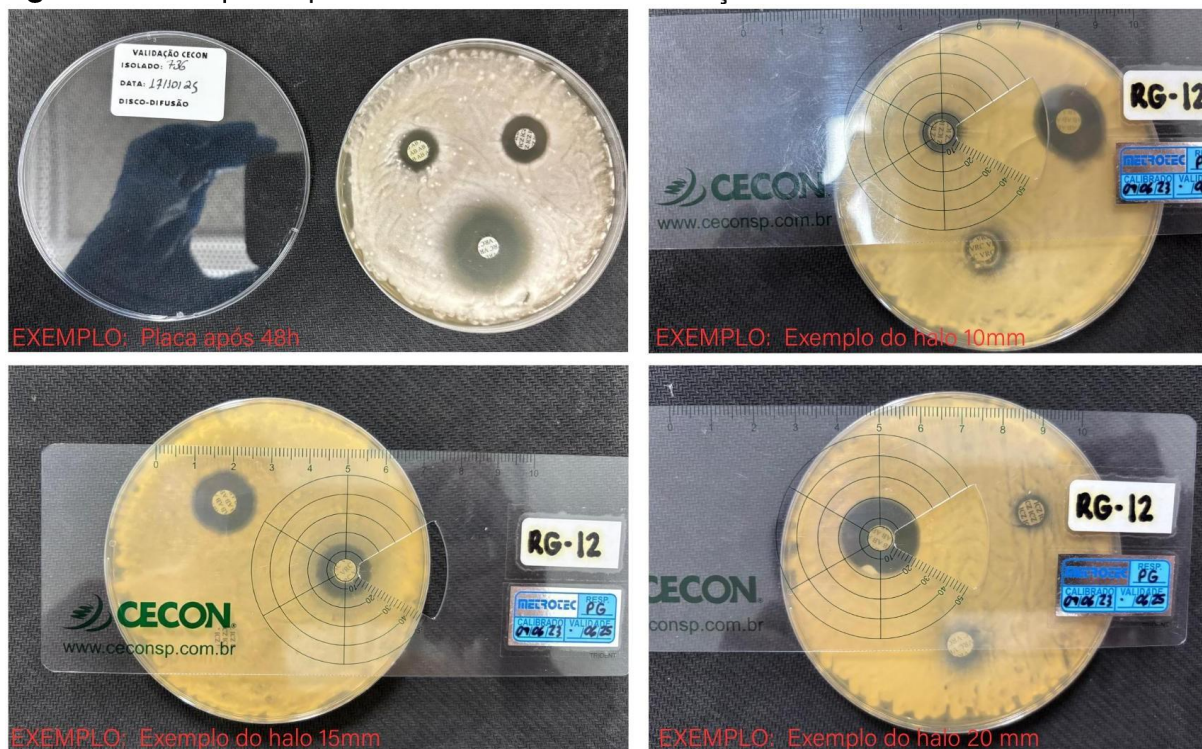


Figura 03. Exemplo de mensuração do halo de inibição com halômetro

**TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

4 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO

- Anotar o valor (mm) do halo de inibição em Folha de Registro 1 POP 5.
- Registrar o resultado no REDCap.
- Interpretar o resultado como: sensível, intermediário ou resistente para cada antifúngico, seguindo o Quadro 01.

Antifúngico Sigla	Concentração no Disco	Zona de Inibição (mm)	Interpretação
Anfotericina B AB	100 mcg	≥ 16 -- < 16	Sensível -- Resistente
Voriconazol VRC	1 mcg	≥ 13 -- 13 >	Sensível -- Resistente
Itraconazol ICZ	10 mcg	≥ 13 -- 13 >	Sensível -- Resistente

Quadro 01. Interpretação de resultados. 1º Versão (Revisão 01/10/2025).



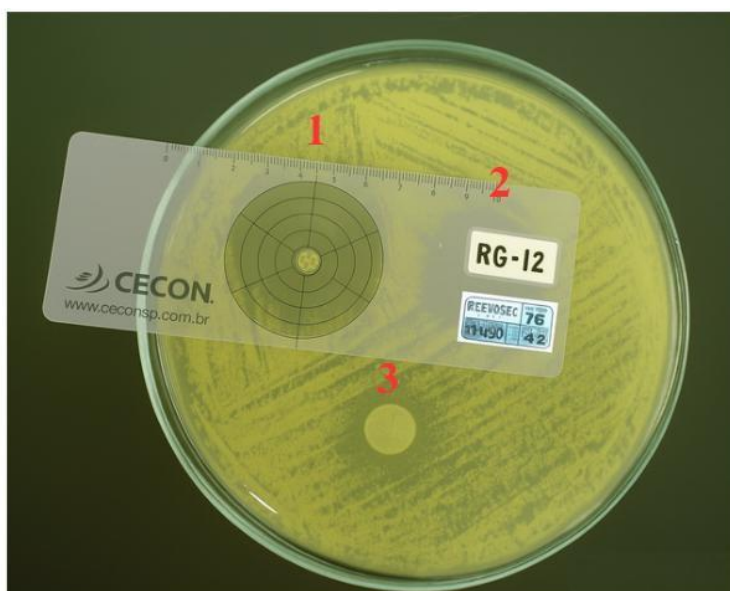
TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem



A



B

Figura 4. Teste de disco-difusão com *Aspergillus fumigatus*. Com 2 discos apresentando halo de inibição/resistência (Disco 1 e 2) e o ultimo apresentando ser sensível (Disco 3). A figura B mostra como interpretar um halo de inibição no verso da placa.



REMARA

Rede EBSERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos

**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO**

POP 05

TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Folha de Registro 1 POP5

Resultado de teste de disco-difusão

Isolado: _____

Data: _____

Responsável: _____

Interpretação dos halos inibitórios

Itraconazol: Resistente Sensível

Voriconazol: Resistente Sensível

Anfotericina B: Resistente Sensível

Atenção: Preencher o REDCap (POP 09) e a ficha do isolado após análise.



TÍTULO: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
05	16/06/25	8	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

BIBLIOGRAFIA

CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. CLSI document M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. CLSI document M51-S1. Wayne, PA: CLSI, 2010. 64 p. ISBN 1-56238-725-1.

CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility of Yeasts. 3rd ed. CLSI guideline M44. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

**REMARA**Rede EBSEERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO****POP 8****TÍTULO: Envio e armazenamento de amostras****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
1	16/06/25	3	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

OBJETIVO

Padronizar o procedimento de envio e armazenamento das amostras coletadas nos hospitais terciários participantes do estudo sobre isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp. resistentes aos antifúngicos, garantindo a integridade, rastreabilidade, qualidade e comparabilidade dos isolados fúngicos durante o transporte até o laboratório coordenador do projeto.

ABRANGÊNCIA

Equipe técnica do Projeto de Pesquisa Rede de Hospitais EBSEERH para identificação e monitoramento de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp resistentes aos antifúngicos.

RESTRIÇÃO

Esse documento é restrito apenas à equipe técnica.

DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido impresso e em versão online junto ao Laboratório do Centro Participante.

APROVAÇÃO

Este POP foi aprovado por Prof. Dr. James Venturini, em 29/09/2025.

**TÍTULO: Envio e armazenamento de amostras****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
1	16/06/25	3	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

1. APLICAÇÃO

Este procedimento aplica-se a todos os profissionais envolvidos na manipulação, processamento e envio das amostras ambientais de ar, nos laboratórios vinculados ao estudo sobre isolados de *Aspergillus* spp. resistentes aos antifúngicos.

2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Criotubos estéreis (1,5 mL ou 2,0 mL);
- Água para suspensão;
- Envelope 2, de etiquetas para identificação do REDCap;
- *Swab*;
- Parafilm, para embalar os microtubos;
- Caixa de transporte;
- Formulário REDCap preenchido;

3. PROCEDIMENTO**3.1 Suspensão**

- Identifique o Microtubos estéreis com as etiquetas de envio (ENVELOPE 3);
- Com um *Swab* estéril, toque cinco pontos distintos da colônia (5 pick's) — centro, bordas e zonas intermediárias — para obter representatividade morfológica e genética.
- Transfira esse material para um criotubo estéril contendo cerca de 1 mL de solução salina.
- A suspensão deve conter fragmentos visíveis, mas não deve estar excessivamente densa ou turva.

3.2 Preparo de envio

- Identifique o tubo com o código obtido no REDCap (POP 08);
- Feche o microtubo firmemente e lacre com Parafilm para evitar vazamentos;
- Coloque o microtubo identificado em uma caixa para envio;
- Etiqueta com o código de envio gerado previamente;



REMARA

Rede EBSEH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos

**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO**

POP 8

TÍTULO: Envio e armazenamento de amostras

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
1	16/06/25	3	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

3.3 Envio da Amostra

- Envie a caixa para o laboratório coordenador do projeto, conforme o endereço previamente definido.
- Após envio, comunique o laboratório coordenador.

**REMARA**Rede EBSEERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO****POP 09****TÍTULO: REDCap de amostras clínicas****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

OBJETIVO

Padronizar o procedimento para o registro de informações no banco de dados REDCap relacionadas à coleta de amostras clínicas hospitalares terciárias participantes do estudo sobre isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp. resistentes aos antifúngicos, assegurando a qualidade, a padronização e a comparabilidade dos dados coletados.

ABRANGÊNCIA

Equipe técnica do Projeto de Pesquisa Rede de Hospitais EBSEERH para identificação e monitoramento de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp resistentes aos antifúngicos.

RESTRIÇÃO

Esse documento é restrito apenas à equipe técnica.

DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido impresso e em versão online junto ao Laboratório do Centro Participante.

APROVAÇÃO

Este POP foi aprovado por Prof. Dr. James Venturini, em 29/09/2025.

**REMARA**Rede EBSEH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO****POP 09****TÍTULO: REDCap de amostras clínicas****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

1. PROCEDIMENTO

- O teste de resistência, realizado a partir de amostra respiratória, com solicitação de cultura, é fundamental para a detecção precoce de cepas resistentes e para o fortalecimento da vigilância em saúde.
- O formulário do REDCap deve ser preenchido apenas para pacientes com suspeita clínica de aspergilose, conforme uma das duas manifestações clínicas da doença: Aspergilose Invasiva (AI) ou Aspergilose Pulmonar Crônica (APC).
- A inclusão deve ocorrer somente se o paciente atender simultaneamente aos Critérios I e II de uma das manifestações presentes a seguir.

1.1 ASPERGILOSE INVASIVA (AI)

Critério I - Pelo menos um dos seguintes fatores de risco:

- Neutropenia (< 500 neutrófilos/mm³ por mais de 10 dias).
- Transplante de células-tronco alogênicas.
- Uso prolongado de corticosteroides (> 0,3 mg/kg/dia por mais de 3 semanas)
- Imunossupressão por agentes de ação em células T (por > 90 dias)
- Deficiência imunológica hereditária grave
- Neoplasias hematológicas ou oncológicas em quimioterapia
- Uso de ibrutinibe
- Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou infecção respiratória viral (influenza, SARS-CoV-2, etc.)
- Cirrose hepática, insuficiência hepática, diabetes mellitus ou alcoolismo crônico
- Outras doenças crônicas, cirurgia cardíaca ou ventilação mecânica invasiva

Critério II - Pelo menos um dos sintomas ou achados clínicos:

- Febre por mais de 3 dias, apesar de antibioticoterapia adequada
- Dor torácica pleurítica
- Dispneia, hemoptise ou insuficiência respiratória persistente

**REMARA**Rede EBSERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO****POP 09****TÍTULO: REDCap de amostras clínicas****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

1.2 ASPERGILOSE PULMONAR CRÔNICA (APC)

Critério I - Pelo menos um dos fatores de risco:

- História atual ou prévia de tuberculose pulmonar
- Alterações estruturais no parênquima pulmonar (ex: bronquiectasias, cavitações ou cistos)

Critério II - Pelo menos um dos sintomas ou achados clínicos:

- Tosse crônica, dispneia, hemoptise, dor torácica, perda de peso ou fadiga
- Alterações radiológicas novas ou progressivas compatíveis com aspergilose (ex: espessamento de cavidade, presença de aspergiloma)
- Importante: Caso o paciente não atenda a ambos os critérios (I + II) de AI ou APC, não prosseguir com a inclusão neste momento.

1.3 INCLUSÃO DE AMOSTRA

- Para a inclusão do paciente no estudo, devem ser coletadas amostras respiratórias e/ou de soro para investigação de doenças infecciosas, conforme a rotina do hospital. E, para os fins específicos deste projeto, é fundamental observar a coleta dos materiais indicados abaixo, de acordo com a manifestação clínica suspeita:

- Nesta inclusão, a suspeita clínica é de Aspergilose Invasiva (AI). Portanto, deve-se observar:

1. Coleta para detecção de galactomanana (teste rápido): A amostra poderá ser obtida a partir de soro, lavado broncoalveolar (LBA) ou secreção traqueal, conforme a disponibilidade clínica.

Esta etapa é de grande relevância para o benefício imediato do paciente, pois contribui para um diagnóstico mais precoce e fornece subsídios para a liberação de antifúngicos pelo Ministério da Saúde.

2. Coleta para triagem de resistência a antifúngicos: A triagem deverá ser realizada a partir do cultivo de qualquer material respiratório disponível. Em pacientes sem sintomas respiratórios, a coleta de saliva poderá ser realizada exclusivamente para o isolamento e triagem de resistência de *Aspergillus* spp.



REMARA

Rede EBSEERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos

**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO**

POP 09

TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

- Esta etapa é essencial, pois permite identificar, em até 7 dias, a presença de *Aspergillus* spp. resistentes a antifúngicos, viabilizando o ajuste terapêutico precoce em caso de resistência confirmada.

- Para a inclusão de novas amostras seguir os próximos passos no link https://redcap.link/inclusao_ram_aspergillus_ebserh :

Inclusão do Paciente



REMARA
Rede EBSEERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos

Por favor, complete o formulário e faça o upload do TCLE/TALE nos campos indicados.

Figura 01. Acesse o link para iniciar a inclusão do paciente.

- Nessa etapa será importante colocar os dados conforme o centro participante conforma a figura 02.

Identificar o Centro Participante

* must provide value

1 - Hospital das Clínicas da UFMG (HC) / Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

2 - Hospital Universitário Antônio Pedro (Huap) / Universidade Federal Fluminense (UFF)

3 - Hospital Universitário da UFGD (HU) / Universidade Federal da Grande Dourados

4 - Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora / Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares

5 - Hospital Universitário de Brasília (HUB) / Universidade de Brasília

6 - Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) / Universidade Federal de Santa Maria

7 - Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Junior (HU) / Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

8 - Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP) / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

9 - Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA) / Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

Figura 02. Identificar o centro participante.



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

- Selecionar a suspeita clínica de Aspergilose, conforme os critérios citados (Figura 03).

Baseado nos critérios acima, qual é a principal suspeita clínica de aspergilose para este paciente?
* must provide value

Aspergilose Invasiva (IA) ←

Aspergilose Pulmonar Crônica (APC)

reset

Figura 03. Principal suspeita.

- Preencher os critérios de risco, podem ser indicados com 1 ou mais. (Figura 07).

Entendido. A Suspeita Clínica é Aspergilose invasiva.
Critério 1 - Indicar pelo menos um dos seguintes fatores de risco:
* must provide value

neutropenia (< 500 neutrófilos/mm³ por > 10 dias) ←

recebimento de um transplante de células-tronco alogênicas

corticosteroides > 0,3 mg/kg/dia (equivalentes da prednisona) por > 3 semanas

tratamento com imunossupressor de células T reconhecido por mais de 90 dias

deficiência hereditária grave

malignidade hematológica ou oncológica subjacente tratada com agentes citotóxicos

tratamento com ibrutinibe

doença pulmonar obstrutiva crônica

infecção por influenza

infecção por SARS-CoV2

outra infecção respiratória. (Especificar)

cirrose

insuficiência hepática

diabetes mellitus

abuso crônico de álcool

doenças crônicas. (Especificar)

cirurgia cardíaca

uso de ventilação mecânica invasiva

Suspeita Clínica: Aspergilose Invasiva
Critério II - Indicar pelo menos uma das seguintes características clínicas:

febre refratária > 3 dias de antibioticoterapia, ←

dor torácica pleurítica

dispneia

hemoptise ou insuficiência respiratória apesar do suporte ventilatório

Figura 07. Critérios de risco.



REMARA

Rede EBSERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos

**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO**

POP 09

TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

- Preencher os dados do paciente conforme demonstrado na Figura 08.

Data de Inclusão do Paciente no Estudo
* must provide value
27-06-2025 Today D-M-Y

Nome Completo do Paciente
* must provide value
WESLLEY STEFANES

Número de Registro de Prontuário do Paciente
* must provide value
1234567

Data de Nascimento
* must provide value
20-11-1998 Today D-M-Y

Idade do Paciente
26 View equation

O paciente está orientado e em condições de fornecer o consentimento livre e esclarecido?
* must provide value
 Sim
 Não
reset

Contato do Paciente/Responsável (telefone)
* must provide value
(67)9 9229-1699

Figura 08. Dados do paciente.

- Nesta próxima etapa, é fundamental incluir o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos pacientes (Figura 09).

Realizar o upload do TCLE assinado pelo paciente/responsável com idade mínima de 18 anos
* must provide value
Upload file

Figura 09. Upload do TCLE assinado pelo paciente.



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

- Indicar o tipo de amostra biológica coletada para os testes rápidos e para a semeadura (Figura 10).

* must provide value

Soro/Plasma

Lavado broncoalveolar (LBA)

Aspirado Traqueal

Escarro

Saliva

Biopsia (Especificar)

Importante: garantir o adequado registro da origem das amostras coletadas e o encaminhamento conforme os procedimentos do centro participante.

Figura 10. Indicar o tipo de amostra biológica utilizada no teste rápido e na cultura.

- Antes de finalizar com o nome do profissional responsável pela coleta e registro dos dados clínicos neste formulário de inclusão.
- Aplicação e arquivamento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e/ou Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), conforme aplicável à faixa etária.
- Verificação e conferência das amostras biológicas coletadas (soro, secreção respiratória, saliva).
- Garantia de que a coleta dos materiais biológicos está de acordo com a rotina do laboratório e também alinhado para este projeto, de acordo com a manifestação clínica suspeita (Aspergilose Invasiva ou Pulmonar Crônica).
- Encaminhamento adequado das amostras ao setor/laboratório responsável.
- Identificar e salvar, conforme a Figura 11.

Nome do profissional responsável pela inclusão do paciente.

Instrução:
Este campo deve ser preenchido pelo profissional que realizou todas as etapas abaixo:

- Coleta e registro dos dados clínicos neste formulário de inclusão
- Aplicação e arquivamento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e/ou Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), conforme aplicável à faixa etária
- Verificação e conferência das amostras biológicas coletadas (soro, secreção respiratória, saliva)
- Garantia de que a coleta dos materiais biológicos está de acordo com a rotina do laboratório e também alinhado para este projeto, de acordo com a manifestação clínica suspeita (Aspergilose Invasiva ou Pulmonar Crônica)
- Encaminhamento adequado das amostras ao setor/laboratório responsável

* must provide value

WESLLEY STEFANES

Figura 11. Profissional responsável e submeter.



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

2 DADOS CLÍNICO-DEMOGRÁFICOS

- Nessa etapa, é necessário preencher os dados demográficos dos pacientes, bem como, sua cor/raça (Figura 12).

Cor
* must provide value

Branco
 Preta
 Parda
 Amarela (Oriental)
 Indígena
 Ignorado / Sem informação

Figura 12. informar a cor/raça.

- Preencher o nível de escolaridade do participante (Figura 13).

Escolaridade
* must provide value

Sem instrução
 Ensino fundamental incompleto
 Ensino fundamental completo
 Ensino médio incompleto
 Ensino médio completo
 Ensino superior incompleto
 Ensino superior completo
 Ignorado / Sem informação

Figura 13. Nível de escolaridade.

- Indicar a naturalidade, estado e município de residência (Figura 14, 15 e 16).



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Naturalidade - Município

* must provide value

Cidade

Figura 14. Naturalidade.

Residência - Estado

* must provide value

Mato Grosso do Sul

Figura 15. Estado que reside.

Residência - Município

* must provide value

Cidade

Figura 15. Município que reside.

- Informar hábitos e exposições relevantes (Figura 16).

Exposição / Hábitos

* must provide value

- Etilismo
- Uso de drogas ilícitas
- Privado de liberdade
- Área de lavoura
- Situação de rua
- Outro
- Nenhum

Figura 16. Exposições relevantes.

- Registrar doenças infecciosas prévias (Figura 17).



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Doenças infecciosas prévias
* must provide value

- HIV/aids
- Tuberculose
- Histoplasmose
- Aspergilose pulmonar
- Coccidioidomicose
- Paracoccidioidomicose
- Leishmaniose Visceral (LV)
- Toxoplasmose
- Sífilis
- Outra
- Nenhuma

Figura 17. Exposições relevantes.

- Indicar alterações observadas na tomografia computadorizada (Figura 18).

Alterações observadas na TC de tórax
* must provide value

- Consolidação
- Opacidade em vidro fosco
- Micronodular perilinfático
- Nódulos/ massa bem definida
- Árvore em brotamento
- Micronodular miliar
- Linfadenopatia mediastinal
- Derrame pleural
- Espessamento / retração pleural
- Enfisema
- Bandas parenquimatosas (fibrose)
- Bronquiectasias
- Cisto
- Atelectasia
- Granulomas calcificados
- Espessamento de septo interlobular
- Cavidade
- Infiltrado paracavitário
- Bola fungica
- Espessamento pleural adjacente à cavidade
- Sinal do halo
- Sinal do halo invertido
- Espessamento adrenal
- Outra
- Não realizado

Figura 18. Alterações observadas na TC de tórax.

ATENÇÃO: Algumas alterações observadas na TC de tórax, como a presença de cavidades, abrirão um novo tópico de componentes para o preenchimento da localização dessas possíveis cavidades.



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

- Registrar se houve diagnóstico laboratorial da AI e qual foi realizado (Figura 19, 20 e 21).

Confirmação laboratorial da AI?
* must provide value

Sim ←

Não

Figura 19. Confirmação laboratorial.

Qual (is) exame (s) positivo (s) para AI?
* must provide value

Micológico direto

Cultura

Galactomanana *Aspergillus* ←

Histopatológico

Figura 20. Qual exame positivou.

Qual (is) amostra (s) biológica (s) positiva (s)?
* must provide value

Escarro espontâneo

Escarro induzido ←

Lavado bronco-alveolar

Secreção traqueal

Biópsia de pulmão

Sangue (soro/plasma)

Figura 21. Qual amostra biológica foi positiva.



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

- Indicar antifúngico(s) instituído(s) após diagnóstico (Figura 22).

Antifúngico(s) instituído(s) após o diagnóstico
* must provide value

- Anfotericina B complexo lipídico
- Anfotericina B desoxicolato
- Anfotericina B lipossomal
- Anidulafungina
- Caspofungina
- Isavuconazol
- Itraconazol
- Micafungina
- Posaconazol
- Voriconazol





Figura 22. Antifúngico instituído após o diagnóstico.

- Registrar se houve necessidade de troca de antifúngico e apontar o(s) motivo(s) para a troca de antifúngico (Figura 23, 24 e 25).

Houve necessidade de troca de antifúngico?
* must provide value

Sim

Não



Motivo(s)
* must provide value

- Transição para tratamento de manutenção
- Resistência detectada em teste de sensibilidade antifúngica
- Falha terapêutica com agravamento clínico
- Efeitos adversos relacionados ao antifúngico
- Outro motivo




Figura 24. Antifúngico instituído após o diagnóstico.



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Antifúngico(s) após mudança
* must provide value

- Anfotericina B complexo lipídico
- Anfotericina B desoxicolato
- Anfotericina B lipossomal
- Anidulafungina
- Caspofungina
- Isavuconazol
- Itraconazol
- Micafungina
- Posaconazol
- Voriconazol

Figura 25. Antifúngico após mudança.

- Informar o desfecho clínico primário do paciente e salvar e concluir o registro no sistema (Figura 26 e 27).

Desfecho Clínico Primário - 30 dias
* must provide value

- Óbito
- Cura clínica: resolução completa dos sinais e sintomas atribuídos à infecção
- Melhora clínica parcial: redução significativa dos sinais e sintomas, sem resolução total
- Em tratamento, sem alterações clínicas relevantes (estável)
- Transferência para outra unidade ou serviço

Usuário responsável pelo registro das informações
* must provide value
wesley.stefanes

Form Status
Complete? Unverified

Save & Exit Form Save & ... - Cancel -

Figura 27. Concluir a etapa 2.

- Sempre indicar: Incomplete: selecionar quando ainda há dados faltando no formulário



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Unverified: selecionar quando concluiu o preenchimento de todos os campos, mas a informação ainda não foi verificada pela coordenação local ou central.

Complete: selecionar somente pela coordenação Local ou Geral após a conferência completa e validação de todos os dados do formulário.

- Registro do Critério Diagnóstico (Figura 28).

Critério Diagnóstico de AI:

1. AI COMPROVADA
- Presença de invasão fúngica em tecido obtido por biópsia de sítio estéril

2. AI PROVÁVEL (todos os itens)
- Fatores de risco clássicos ou emergentes
- Manifestações clínicas
- Imagem compatível
- Identificação microbiológica ou presença de biomarcador

3. AI POSSÍVEL (todos os itens)
- Fatores de risco clássicos ou emergentes
- Manifestações clínicas
- Imagem compatível
- Sem identificação microbiológica ou biomarcador

* must provide value

AI Comprovada
 AI Provável
 AI Possível
 AI Descartada

Critério Diagnóstico de APC:

(I) Critério clínico: perda ponderal, tosse persistente e/ou hemoptise por três meses;

(II) Critério radiológico: cavitação progressiva na imagem do tórax e/ou bola fúngica intracavitária e/ou espessamento pleural, fibrose pericavitária ou infiltrados adjacentes às cavidades

(III) Critério micológico/ sorológico: detecção de anticorpos anti-Aspergillus IgG positivo, pesquisa de fungos e/ou cultura em materiais de vias aéreas com resultado compatível com *Aspergillus* spp.

* must provide value

APC Comprovada (Critérios I + II + III)
 APC Provável (Critérios I + II OU Critérios I + III)
 APC Descartada

Figura 28. Indicar o desfecho.

Aspergilose Invasiva (AI):

A classificação segue os critérios de AI Comprovada, AI Provável, AI Possível ou AI Descartada, de acordo com as combinações de fatores clínicos, laboratoriais e de imagem.

Aspergilose Pulmonar Crônica (APC):

A classificação segue os critérios de APC Comprovada, APC Provável ou APC Descartada, conforme a associação entre manifestações clínicas, achados radiológicos e resultados micológicos/sorológicos.

- Caso não haja informação suficiente para definição imediata do critério, manter o campo em aberto até confirmação médica.



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

3 REGISTROS LABORATORIAIS

- No passo 01, será necessário informar a realização do teste rápido (Figura 29)

Passo 01 - Realização do Teste Rápido

Resultado - Teste Rápido Galactomanana Aspergillus

* must provide value

Positivo

Negativo

Não-realizado

reset

Passo 02 - Realizar o cultivo da amostra biológica e identificar a placa (numero definido pelo centro colaborador)

Figura 29. Informar o resultado do teste.

- No passo 02, realizar o cultivo da amostra biológica e identificar a placa (número definido pelo centro colaborador), demonstrado na Figura 30.

Passo 02 - Realizar o cultivo da amostra biológica e identificar a placa (numero definido pelo centro colaborador)

Identificação da Placa

* must provide value

001

Número

Figura 30. Identificação por centro colaborador.

- No passo 03, realizar a leitura da placa e identificar se houve crescimento fúngico compatível com *Aspergillus* (Figura 31).



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Passo 03 - Leitura da Placa

Houve crescimento fúngico compatível com *Aspergillus*?

* must provide value

Sim Não

Código do Registro do Isolado REMARA - Clínico: ____

A codificação é composta por números que são formados pelos códigos do hospital + numero da placa + Internal ID REDCap

Macromorfologia do Isolado

* must provide value

Crescimento compatível com *Aspergillus fumigatus*. Crescimento compatível com *Aspergillus* diferente de *fumigatus*
 Suspeita inicial de crescimento de *Aspergillus*, porém não confirmada após análise complementar
 Isolado fúngico inviável para continuidade da análise (morte do cultivo)

Figura 31. Morfologia do isolado.

- No passo 04, registro dos testes de sensibilidade por triagem (*Screening*) e disco-difusão (Figura 32 e 33).

Passo 04) Testes de Sensibilidade a Antifúngicos

TESTE DE TRIAGEM

	Resistente	Suscetível
Itraconazol * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Voriconazol * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Posaconazol * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Anidulafungica * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Micafungica * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>

Data do Teste de Triagem
* must provide value

11/08/2025

Figura 32. Teste de triagem.



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

Passo 04) Testes de Sensibilidade a Antifúngicos
TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

	Resistente	Suscetível
Itraconazol * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Voriconazol * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Posaconazol * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Anidulafungica * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Micafungica * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Anfotericina B * must provide value	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>

Data do Teste de Disco Difusão
* must provide value
11/08/2025

Figura 33. Disco-difusão.

- No passo 05, Envio dos isolados para o centro coordenador (Figura 34).

Passo 5 - Envio dos Isolados para o Centro Coordenador

Data do Envio pelo Remetente
* must provide value
11-08-2025 Today D-M-Y

Código do Rastreo
* must provide value
123

Data do Recebimento pelo Destinatário
* must provide value
11-09-2025 Today D-M-Y

Figura 34. Envio ao centro coordenador.



TÍTULO: REDCap de amostras clínicas

I - CONTROLE HISTÓRICO

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	19	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini Dra. Marcia Melhem

- Salvar e completar etapa 3 (Figura 35).

Usuário responsável pelo registro das informações
* must provide value
wesley.stefanes

Form Status
Complete?
Unverified
Save & Exit Form Save & ...
- Cancel -

Figura 35. Concluir a etapa 3.

- O registro pode ser acompanhado pelo recurso "Record Status Dashboard", que permite continuar o preenchimento em qualquer etapa do processamento das amostras (Figura 36).

Data Collection
Survey Distribution Tools
Record Status Dashboard
Add / Edit Records
Show data collection instruments

Displaying: Instrument status only | [Lock status only](#)

Record ID	Inclusão do Paciente	Dados Clínico-Demográficos	Registros Laboratoriais
5	●	●	●

Figura 36. Local de acesso ao "Record Status Dashboard" e seleção da etapa a ser preenchida ou editada.

**REMARA**Rede EBSEERH de Monitoramento
de *Aspergillus* spp.
Resistentes a Antifúngicos**PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO****POP 10****TÍTULO: ASPERGILLUS Immune Chromatography Technology -ICT (LDBIO)
IgG-IgM****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

OBJETIVO

Padronizar o procedimento para o teste rápido, baseado na tecnologia de imunocromatografia (fluxo lateral), para detecção simultânea de ambas as classes de anticorpos, IgG e IgM, anti-*Aspergillus* em soro humano.

ABRANGÊNCIA

Equipe técnica do Projeto de Pesquisa Rede de Hospitais EBSEERH para identificação e monitoramento de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp resistentes aos antifúngicos.

RESTRIÇÃO

Esse documento é restrito apenas à equipe técnica.

DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido impresso e em versão online junto ao Laboratório do Centro Participante.

APROVAÇÃO

Este POP foi aprovado por Prof. Dr. James Venturini, em 15/09/2025.

**TÍTULO: ASPERGILLUS Immune Chromatography Technology -ICT (LDBIO)
IgG-IgM****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

1. PROCEDIMENTO

ASPERGILLUS ICT IgG-IgM é um teste unitário de uso único para um diagnóstico qualitativo. É baseado no princípio de *sandwich* homogêneo, ou seja, reação imunológica de dois epítomos antigênicos semelhantes e com dois locais de ligação de um anticorpo bivalente. A positividade indica presença de IgG e/ou IgM direcionados contra o agente infeccioso, pois o teste não distingue o tipo de anticorpos presentes.

- O teste é composto de um cassete composto por:

- Uma tira de nitrocelulose na qual estão duas bandas reativas: os antígenos, purificados de cultura de *Aspergillus fumigatus*, da banda de "teste" (banda T) e as gamaglobulinas de coelho da banda de controle (banda C).
- Um suporte de fibra de vidro (bloco conjugado), impregnado de partículas de **látex pretas** conjugadas com antígenos de *A. fumigatus* (látex "teste" = látex T) e partículas de **látex azul** conjugadas com IgG anti-coelho de cabra (látex controle = látex C).

- O teste é realizado por dispensação da amostra de soro ou plasma e uma solução de eluição (eluente), sucessivamente, a partir do poço existente no cassete. A migração, por cromatografia, é concomitante do soro e das partículas de látex. Esta migração fica completa em 20-30 minutos.

- Se anticorpos (IgG e/ou IgM) específicos para *Aspergillus* estiverem presentes na amostra, é formado um complexo entre o látex T e os anticorpos do paciente que são capturados pela banda T. Disto resulta o aparecimento de uma **linha preta**, que indica teste positivo.

- A captura direta do látex C pela banda C resulta no aparecimento de uma linha azul, o que significa que a corrida cromatográfica decorreu dentro da normalidade. O aparecimento da **linha azul** independe do estado sorológico do paciente.

- Ambas as letras "T" e "C" estão impressas no cassete, indicando a área de leitura correspondente.

2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Micropipeta para dispensar volumes de 15ul

**TÍTULO: ASPERGILLUS Immune Chromatography Technology -ICT (LDBIO)
IgG-IgM****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

- Ponteiras descartáveis para dispensar volumes de 15ul
- Cronômetro

3. PRECAUÇÕES DE USO

- O teste é, apenas, para uso *in vitro*. Manipular de acordo com as Boas Práticas de Laboratório e considere qualquer reagente e qualquer amostra como, potencialmente, tóxico e/ou infeccioso e devem ser manipuladas com cuidado.
- Apenas para uso profissional. Apenas para técnicos devidamente qualificados.
- Use jaleco, luvas e óculos de proteção; não beba, coma ou fume no laboratório. Não pipete com a boca.
- Armazene a embalagem original selada entre 2 e 8°C. Não congelar o cassete. Os cassetes podem ser usados até a data de validade escrita na etiqueta da embalagem. Não usar após a data de validade.
- A primeira abertura de um saco de 10 testes deve ocorrer, pelo menos, 15 minutos depois de colocar a embalagem à temperatura ambiente de forma a evitar condensação dentro da embalagem.
- Após abertura da embalagem, mantenha-a à temperatura ambiente (18-30°C), cuidadosamente fechada com zip, com o pacote dessecante no seu interior.
- Após a abertura, os cassetes podem ser usados em até 2 meses.
- O eluente é estável por 2 meses à temperatura ambiente (18-30°C) e até a data de validade especificada no kit, se mantido entre 2 e 8°C.
- Permita que o eluente permaneça, pelo menos, 15 minutos à temperatura ambiente antes de usá-lo.

4. PROCEDIMENTOS

- O teste pode ser realizado com soro ou plasma.
- A coleta da amostra deve ser realizada sob assepsia em tubo seco ou contendo heparina, citrato ou EDTA.
- A amostra não pode ser coletada em tubo com gel, pois poderá levar a resultados falsos positivos.
- Evite hemólise tanto quanto possível.
- Mantenha as amostras a 2-8 °C até serem processadas. Se necessitarem de ser armazenadas, congele abaixo de -15°C. Evite ciclos de congelamento/descongelamento repetidos.

**TÍTULO: ASPERGILLUS Immune Chromatography Technology -ICT (LDBIO)
IgG-IgM****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanés	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

- Não use amostras contaminadas.
- Retire, do saco zip, o número necessário de cassetes e depois feche, cuidadosamente, a embalagem com o fecho mantendo o dessecante no interior enquanto retira o máximo de ar possível.
- Identifique cada cassete com a referência de cada amostra a ser analisada, não faça corridas concomitantes com mais de 10 cassetes. Duas corridas sucessivas de 10 cassetes devem ser separadas por alguns minutos, de forma a poder ser feita a leitura nos tempos recomendados (use 2 cronômetros).
- Com a micropipeta dispense 15 µL de soro ou plasma no poço indicado para amostra. Faça o mesmo para todas os cassetes, antes de prosseguir para o passo seguinte.
- Dispense 4 gotas de eluente do *kit*. Não use eluente de um lote diferente. Mantenha o dispensador, verticalmente, enquanto dispensa. Feche o dispensador depois de usá-lo.
- Comece a contar o tempo quando o eluente é dispensado em todos os cassetes da corrida.

5. LEITURA E INTERPRETAÇÃO

- A leitura deve ser efetuada próximo de uma janela ou sob luz branca direta. Evite sombras na área de leitura.
- A leitura deve ser efetuada entre 20 e 30 minutos depois de ser acionado o cronômetro.

Não considere resultados de leituras efetuadas depois de 30 minutos.

Teste Positivo: 2 linhas, uma **preta** "T" e uma azul "C" nas áreas correspondentes. Todas as linhas "T" devem ser consideradas positivas, mesmo que tenham uma intensidade muito tenue. Para linhas muito tenues, realize a leitura com o olho, verticalmente, acima da área de leitura.

Teste Negativo: Não aparece nenhuma linha preta. Apenas a linha "C" é visível.

Teste Ambíguo: Em casos muito raros, uma linha cinzenta, difusa e sem limites claros pode aparecer na banda "T". Este resultado deve ser considerado negativo, mas confirmado com nova amostra ou por outra técnica.

Teste Inválido: A linha "C" não aparece. Leia uma vez mais as instruções e repita o teste. Se o problema persistir, contate o fabricante ou o seu distribuidor.

**TÍTULO: ASPERGILLUS Immune Chromatography Technology -ICT (LDBIO)
IgG-IgM****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	6	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

Notas: Este é um teste qualitativo. A intensidade da linha preta não reflete a quantidade de anticorpos anti-*Aspergillus* na amostra.

Um teste positivo prova que existiu contato do doente com o agente infeccioso, mas não determina a data de contato ou o estado clínico do paciente.

6 LEITEIRA E INTERPRETAÇÃO

- A linha azul "C" permite a validação da corrida do teste.
- No entanto, é recomendada a incorporação na corrida, de tempos a tempos, de amostra positiva fraca com resultado conhecido.

Nota: Com alguns soros pode ser visualizada uma segunda banda preta ligada à banda azul (=duplicação da banda "C"). A segunda banda não prejudica o resultado do teste que deve ser lido apenas na linha "T".

6.1 LIMITAÇÕES DO TESTE

- Não use soro com demasiado tempo de coleta com esta técnica. Amostras congeladas com menos de 2 anos podem ser utilizadas.
- O teste com outros fluidos corporais (urina, LCR, saliva, sangue total...) não foi validado.
- O uso de amostras hemolisadas, ictéricas ou lipídicas não é recomendado, pois causa interferências: amostras muito hemolisadas podem mascarar um teste positivo fraco, devido à significativa coloração vermelha da hemólise.
- Não dispense menos (3 gotas) ou mais (5 gotas) de eluente, desviando-se do recomendado (4 gotas).
- Não use eluente diferente do que foi fornecido com os cassetes e nem de outro lote.
- O diagnóstico de uma doença infecciosa não pode ser estabelecido com base nos resultados de um único teste.
- Os resultados sorológicos devem ser interpretados de acordo com a informação disponível (p.e., epidemiológica, clínica, imaginológica, biológica etc.) de forma a estabelecer um diagnóstico.

**TÍTULO: *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

OBJETIVO

Padronizar o procedimento para o teste rápido de fluxo lateral *Aspergillus* Galactomannan (AGM LFA, *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay), não automatizado, imunocromatográfico, para a detecção qualitativa do antígeno galactomanana de *Aspergillus*, em amostras de soro e lavados broncoalveolares (LBA) de pacientes com suspeita de aspergilose.

ABRANGÊNCIA

Equipe técnica do Projeto de Pesquisa Rede de Hospitais EBSEERH para identificação e monitoramento de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp resistentes aos antifúngicos.

RESTRIÇÃO

Esse documento é restrito apenas à equipe técnica.

DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido impresso e em versão online junto ao Laboratório do Centro Participante.

APROVAÇÃO

Este POP foi aprovado por Prof. Dr. James Venturini, em 15/09/2025.

**TÍTULO: *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

1. PROCEDIMENTO

- O AGM LFA é um teste que, quando usado em conjunto com outros procedimentos de diagnóstico, como cultura microbiológica, exame histológico de amostras de biópsia e evidências radiográficas, auxilia no diagnóstico de aspergilose.
- O teste deve ser utilizado com leitor (sõna LFA Cube Reader, IMMY, código LFARDR).
- Deve realizado, apenas, por profissionais de laboratório com a devida formação.

2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Agitador vórtex
- Banho maria aquecido
- Centrífuga capaz de atingir, pelo menos, 10 000 g
- Pipeta(s) capaz(es) de medir 300, 120, 100, 80 e 40 µL
- Ponteiras descartáveis
- Tubos de microcentrífuga, com tampa de rosca, capacidade 1,5-2,0 mL, capazes de suportar aquecimento até 120°C por bloco de aquecimento (Tubo A – Microtudo de 1,5mL)
- Tubos descartáveis para microcentrifugação (Tubo B – Microtudo de 1,5mL)

3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**3.1 Tratamento de soro e LBA**

- Coloque 300 µL de soro ou LBA, coletados no mesmo dia (ou congelados), no Tubo A (tampa de rosca, resistente ao calor, para microcentrifugação).
- Adicione 100 µL de tampão de tratamento prévio de amostras (no. de REF: AFSPB1) ao mesmo tubo A.
- Aperte bem a tampa do tubo e processe a amostra (30 ") no agitador vórtex.
- **Deixe o tubo em um Banho-Maria durante 6-8 minutos aquecido a 100°C.**
- Centrifugue, imediatamente, a amostra durante 5 minutos entre 10.000-14.000 g à temperatura ambiente.
- Após o tratamento prévio, a amostra tratada (sobrenadante com sedimento) pode ser armazenada entre 2 e 8 °C até 7 horas, antes da realização do teste. Se a análise da amostra exigir um novo teste, deve se proceder ao tratamento prévio de outra alíquota da amostra.

**TÍTULO: *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

4. PROCEDIMENTO

- Pipete 40 µL de Tampão de Execução *Aspergillus* GM LFA (N.o de REF: AFLFRB2) para o Tubo A (tubo limpo).
- Pipete 80 µL de sobrenadante do soro/LBA tratado, previamente, para cada tubo da etapa acima.
- Coloque uma Tira de Teste de Fluxo Lateral *Aspergillus* GM (no. de REF:LFAF50,30) em cada tubo ou placa de titulação contendo uma amostra ou um controle.
- Mantenha o teste à temperatura ambiente durante 30 minutos.

4.1 Controle de qualidade

- O procedimento de controle de qualidade, positivo e negativo, verifica se o *kit* funciona conforme esperado e garante que o produto não tem falhas e nem foi contaminado.
- Faça a testagem dos controles a cada novo lote do *kit*.
- Adicione 120 µL de Controle Positivo *Aspergillus* GM (no. de REF. AFPC01+) a um tubo limpo e adicione 120 µL de Tampão de Execução *Aspergillus* GM LFA [tampão de execução - controle negativo] (no. de REF. AFLFRB2) a outro tubo limpo.
- Insira uma tira de teste (Tira de Teste de Fluxo Lateral *Aspergillus* GM2) nos tubos e leia após 30 minutos.
- O controle positivo deve produzir um valor índice $\geq 0,50$ e o controle negativo deve produzir um valor índice $< 0,50$.

NOTA: Não ferva os controles positivos e/ou negativos.

4.2 Estabilidade e armazenamento do reagente

- Todo o *kit* de teste AGM LFA deve ser armazenado entre 2 e 30°C até a data de validade impressa no rótulo do produto. Não é possível garantir a qualidade do produto após a data de validade.
- As tiras de teste não utilizadas devem ser armazenadas no exsiccador com a tampa fechada com firmeza.

**TÍTULO: *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

5. LEITURA DO TESTE

- Leia e registre os resultados dentro de 10 minutos após a conclusão do teste com o sōna LFA Cube Reader. Os resultados lidos após o tempo de leitura de 10 minutos são inválidos.

- Execute o sōna AGM LFA de acordo com o procedimento acima.

1. Pressione o botão na parte superior do sōna LFA Cube Reader duas vezes até que o visor mostre RFID.
2. Leia o identificador RFID específico do lote, localizado na parte inferior do tubo de Tiras de Teste de Fluxo Lateral *Aspergillus* GM, colocando-o sobre o visor no leitor cúbico. Um sinal sonoro confirmará a leitura do identificador RFID e TEST surgirá no visor.
3. Inspeccione a tira de teste e verifique se não existem artefatos a interferir na estrutura de leitura entre o teste e a linha de controle.
4. Quando a tira de teste estiver pronta para ser analisada, insira corretamente a Tira de Teste de Fluxo Lateral *Aspergillus* GM no leitor cúbico, de forma a que as setas de amostra da tira estejam voltadas para a mesma direção que as setas de amostra no próprio adaptador. Os resultados devem ser lidos dentro de 10 minutos após a conclusão da incubação de 30 minutos do teste.
5. Assim que TEST for apresentado no leitor cúbico, pressione o botão uma vez para executar o teste. RUN aparecerá no visor durante a leitura da tira.
6. Os resultados serão apresentados como um valor numérico para a linha de teste, procedido por POS ou NEG e por um valor numérico para a linha de controle.
7. Registre os resultados do teste apresentados.

Resultados	Visor	Valor índice
Positivo	POS	≥0,50
Negativo	NEG	<0,50
Inválido	INV	N/A

-Para ter um teste válido, a linha de controle deve estar presente. Se a linha de controle não estiver presente ou for muito fraca, surgirá no leitor cúbico INV e o teste será considerado inválido. A falta

**TÍTULO: *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

de uma linha de controle ou uma linha de controle fraca pode ser indicativa de um tratamento prévio incompleto da amostra.

- Os resultados $\geq 0,50$ são considerados positivos e serão apresentados como POS. Os resultados $< 0,50$ são considerados negativos e serão exibidos como NEG.
- Os resultados negativos não excluem o diagnóstico da doença. A amostra pode ter sido coletada antes do antígeno detectável estar presente.
- As linhas de teste parciais, que aparecem apenas na metade da tira de teste, devem ser consideradas inválidas, e o teste deve ser repetido para confirmar os resultados positivos ou negativos.

5.1 Limpeza do leitor

1. Remova o sôna LFA Cube Reader do adaptador pressionando a aba do adaptador suavemente para baixo e levantando o leitor cúbico para fora do adaptador.
2. Limpe o adaptador do LFA Cube Reader com um desinfetante. Consulte "Cuidados" na bula do teste.
3. Limpe a lente do leitor cúbico com um pano sem fibras.
4. Coloque novamente o leitor cúbico no adaptador, fazendo corresponder o canto de ângulo reto do leitor cúbico com o canto de ângulo reto do adaptador do leitor cúbico. Pressione, ligeiramente, para baixo a aba do adaptador e insira o leitor cúbico, começando pela traseira. Pressione o leitor cúbico firmemente e solte a aba do adaptador. O leitor cúbico deve estar firmemente encaixado no adaptador antes de ser utilizado.

5.2 Limitações do teste

1. As características de desempenho do teste não foram estabelecidas para outras matrizes além de soro e fluido LBA.
2. A testagem de amostras de soro hemolisado pode levar a falsos negativos e falsos positivos devido à intensa cor de fundo na tira.
3. A reatividade cruzada de amostras de fluido de LBA com *Mycoplasma pneumoniae* ou medicamentos/lubrificantes anestésicos usados para anestésiar a área do pescoço/garganta para o processo de aspiração não foi avaliada.

**TÍTULO: *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY)****I - CONTROLE HISTÓRICO**

REVISÃO	DATA	Nº PÁGINAS	HISTÓRICO ALTERAÇÃO	ELABORAÇÃO	VERIFICAÇÃO	APROVAÇÃO
01	27/06/25	7	Emissão inicial	Wesley Vareiro Alves Stefanos	Dr. Wellington Santos Fava Dra. Bárbara Amorim	Dr. James Venturini

4. A reatividade cruzada foi observada graças a algumas amostras de casos de histoplasmose, candidíase e coccidioidomicose.
5. Os resultados devem ser interpretados de acordo com a informação disponível (p.e., epidemiologia, clínica, imaginológica, biológica etc.) de forma a estabelecer um diagnóstico.
6. O sōna AGM LFA poderá apresentar uma detecção reduzida de galactomanana em pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC) e síndrome de Job.
7. O sōna AGM LFA não se destina à terapia de monitorização.
8. O uso da terapia antifúngica ativa contra o fungo em alguns pacientes com aspergilose invasiva pode resultar em sensibilidade reduzida com o sōna AGM LFA.
9. O sōna AGM LFA não foi avaliado em pacientes neonatais.
10. O teste não deve ser realizado como procedimento de triagem para a população em geral. O valor preditivo de um resultado sorológico, positivo ou negativo, depende da probabilidade de presença de aspergilose em testagem prévia. O teste só deve ser feito quando a evidência clínica sugere o diagnóstico de aspergilose.
11. Deve ser mantido um contato adequado entre o tubo com tampa de rosca e o bloco de aquecimento durante a fervura, que ocorre na etapa de tratamento prévio.
12. A frequência da aspergilose depende de vários fatores, incluindo a população de doentes, o tipo de instituição e a epidemiologia. A prevalência esperada de aspergilose invasiva varia de 5 a 20%.