UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ALINE GOZZI

O papel da reação em cadeia da polimerase
(PCR) de largo espectro no diagnóstico
etiológico da sepse

Ribeirão Preto

2014

ALINE GOZZI

O papel da reação em cadeia da polimerase (PCR) de largo espectro no diagnóstico etiológico da sepse

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do
título de mestre em Ciências

Área de Concentração: Clínica
Médica

Orientador: Prof. Dr. Marcos de
Carvalho Borges

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gozzi, Aline

O papel da reação em cadeia da polimerase (PCR) de largo espectro no diagnóstico etiológico da sepse. Ribeirão Preto, 2014.
79 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Marcos de Carvalho Borges

1. Sepse. 2. PCR de largo espectro 3. Diagnóstico

Esta dissertação recebeu fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2012/01981-2.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALINE GOZZI

O papel da reação em cadeia da polimerase (PCR) de largo espectro no diagnóstico etiológico de sepse

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Clínica Médica

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr.	_____	
Instituição:	_____	
Julgamento:	_____	Assinatura: _____

Prof. Dr.	_____	
Instituição:	_____	
Julgamento:	_____	Assinatura: _____

Prof. Dr.	_____	
Instituição:	_____	
Julgamento:	_____	Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me ter me concedido forças para chegar ao fim desse trabalho, e ter me iluminado na execução das tarefas práticas e teóricas desse projeto. Sei que não recebemos um fardo maior do que podemos suportar, e o Senhor esteve ao meu lado, me carregando nos braços quando não podia andar sozinha.

Agradeço especialmente à minha mãe e a meu pai, Nelci dos Anjos e José Carlos Gozzi, que acreditaram no meu potencial e sempre me apoiaram incondicionalmente. Obrigada pelo amor e carinho que vocês me dedicam em tempo integral, espero um dia poder retribuir da maneira como vocês merecem.

Ao meu orientador, professor Marcos de Carvalho Borges, por ter entrado comigo nessa jornada, e ter sido um sábio conselheiro e amigo durante todas as fases desse trabalho, auxiliando a contornar os obstáculos que surgiram durante esse período. Obrigada por acreditar em mim, e por estar sempre presente para me orientar tanto nas práticas laboratoriais, como em apresentações e trabalhos escritos.

Ao professor Benedito Antônio Lopes da Fonseca, que foi o pilar desse projeto, e por ter me ensinado tudo o que foi necessário para a realização dessa obra. Obrigada por me acolher no seu laboratório, e por tirar minhas dúvidas e dar sugestões frequentemente.

A toda minha família, que compreendeu a necessidade da realização dessa pesquisa, e me escutou e apoiou, até durante os tempos mais difíceis.

Ao meu parceiro de toda a vida, André Riul, pela paciência e compreensão, e também pela amizade e amor.

Aos meus grandes amigos Ana Paula, Nayara, Procópio, Rafael, Taline, Thamires e Tiago, que estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins, conseguiram me mostrar a luz no fim do túnel por inúmeras vezes, e é claro, pela amizade que levarei para sempre.

Aos meus companheiros de laboratório, Alessa, Ana Paula, Andiamira, Camila, Leandra, Rosana, Thamires, Tiago e Vanessa, que compartilharam momentos inesquecíveis de amizade e conhecimento. Obrigada por entender o conceito de PCR, todas as terças-feiras. Obrigada por continuarem perguntando sobre meu projeto, todas as terças-feiras. Obrigada por fazerem minhas terças-feiras mais felizes.

Aos meus companheiros de laboratório adotado, Ana Luísa, Danillo, Emiliana, Fernanda, Flávia, Flávio, João, Luiza, Mariana, Michelli e Taline, pela ajuda e sabedoria

repassada, além das gargalhadas e cultura inútil. Esses dois anos e meio não seriam os mesmo sem todas essas pessoas na minha vida.

A toda a família do centro de pesquisa em virologia, que compartilhou conhecimento e companheirismo, e conseguiu conviver com uma bacteriologista no seu dia-a-dia.

Aos queridos Rodrigo e Tânia, cuja contribuição foi inestimável para execução desse projeto.

Aos doutores Maurício e Rômulo, que tiveram participação fundamental na parte clínica desse estudo, e contribuíram enormemente para seu estabelecimento.

Ao secretário da pós graduação do departamento de Clínica Médica, Emerson, que atendeu a todos os gritos de socorro, e ajudou em diversos momentos da execução do mestrado.

Ao laboratório de microbiologia da Unidade de Emergência (UE-HCFMRP), por me concederem amostras de bactérias, por atenderem aos meus pedidos de ajuda, por opinarem no desenvolvimento do estudo, e principalmente, por terem me preparado para o mestrado. Obrigada Elvira, por mais de três anos de amizade. Obrigada Denissani, pela supervisão, e também por ser a responsável pelo início dessa jornada. Eu não estaria no mestrado se não tivesse passado pelo aprimoramento profissional nesse laboratório.

Às minhas ex-companheiras de república, Amanda, Keila, Kizzy e Natália, que em algum momento nos últimos anos aprenderam e ensinaram a difícil tarefa da convivência, fazendo possível a amizade entre colegas.

Aos pacientes e voluntários desse estudo, que concordaram em participar e auxiliar, de alguma maneira, na consecução e obtenção de resultados e conclusões dessa obra.

A todos os professores e alunos que conheci nessa jornada, companheiros de disciplinas e de bandeirão, que entenderam perfeitamente as inseguranças e responsabilidades da pós graduação, e que muitas vezes abriram minha mente a alternativas teóricas e práticas à realização do meu projeto.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

GOZZI, A. **O papel da reação em cadeia da polimerase (PCR) de largo espectro no diagnóstico etiológico da sepse.** 2014. 79 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A sepse é responsável por uma alta taxa de internação hospitalar e morbimortalidade. Devido à gravidade do quadro clínico e às limitações dos métodos tradicionais para identificação e isolamento bacteriano, é recomendado o início empírico de antimicrobiano(s) de largo espectro. O desenvolvimento da biologia molecular, particularmente da reação em cadeia da polimerase (PCR), tornou possível o diagnóstico rápido de agentes infecciosos. Entretanto, devido à diversidade dos possíveis agentes etiológicos na sepse, a utilização da PCR com *primers* específicos para cada agente se torna pouco prática. Com a PCR de largo espectro é possível que em uma só reação se identifique qualquer bactéria, possibilitando um tratamento precoce e direcionado. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel da PCR de largo espectro no diagnóstico etiológico de pacientes com sepse e a comparação desta técnica com os métodos tradicionais de cultura. Foram incluídos 74 pacientes com diagnóstico de sepse atendidos na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e 14 voluntários sadios. Foi realizada a extração do DNA do soro, plasma e *buffy-coat* dos pacientes, seguida da realização da PCR de largo espectro com dois diferentes pares de *primers*, e sequenciamento das amostras positivas. Dos 74 pacientes, 39 (53%) eram homens; a média de idade foi 55 ± 19 anos; 37 (50%) tiveram sepse grave e 37 (50%) choque séptico; e a mortalidade foi 51%. A maioria das infecções primárias teve origem respiratória (66%), seguida de infecções gênero-urinárias (20%). A hemocultura foi positiva em 22 (30%) pacientes, e sua positividade foi significativamente maior em pacientes mais velhos ($p < 0,05$) e com valores mais altos de proteína C reativa (CRP) ($p < 0,05$). A PCR de largo espectro foi positiva em 44 (59%) pacientes considerando os dois pares de *primers*, sendo sua positividade significativamente maior que a da hemocultura ($p < 0,001$). Para o par Bak11W/Bak2 ela foi positiva em 25 (34%) pacientes, e para o par Taf/Tar, em 29 (39%) pacientes. Em relação às frações do sangue, amostras de 24 pacientes foram positivas na fração soro; 22 na fração plasma; e 18

na fração *buffy-coat*. Nenhuma característica clínica ou demográfica dos pacientes influenciou a positividade da PCR de largo espectro. A PCR de largo espectro foi negativa em todas as frações do sangue dos voluntários sadios. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da PCR foram 59%, 100%, 100% e 32%, respectivamente. Em 40 (54%) pacientes os resultados da PCR e hemocultura foram concordantes. O coeficiente de concordância kappa obtido foi 0,147 ($p = 0,131$). Em relação ao sequenciamento, em 21 amostras de 16 pacientes foi possível identificar um agente etiológico. As bactérias mais detectadas foram *Escherichia coli* (3), *Enterococcus sp.* (2), *Staphylococcus sp.* (2) e *Ralstonia sp.* (2). Em apenas dois pacientes as amostras tiveram a mesma espécie bacteriana detectada na hemocultura e PCR de largo espectro (*E. coli* e *Streptococcus pneumoniae*). Em resumo, a PCR de largo espectro foi mais sensível do que a hemocultura na identificação bacteriana em pacientes com sepse atendidos em um Hospital de Emergência.

Palavras-chave: Sepse. PCR de largo espectro. Diagnóstico.

ABSTRACT

GOZZI, A. **The role of broad-range polymerase chain reaction (PCR) in the etiologic diagnosis of sepsis**. 2014. 79 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Sepsis is responsible for a high rate of hospitalization and mortality. Due to the severity of clinical presentation and limitation of traditional methods for bacterial identification and isolation, it is recommended to initiate empirically broad-spectrum antimicrobial treatment. The development of molecular biology, particularly the polymerase chain reaction (PCR), enabled to realize a rapid diagnosis of infectious agents. However, due to the diversity of possible etiologic agents in sepsis, the use of PCR with specific primers for each agent becomes impractical. With the broad-range PCR, it is possible, in a single reaction, to identify any bacteria, allowing an early and directed treatment. Thus, this study aimed to evaluate the role of broad-range PCR in the etiologic diagnosis of patients with sepsis and compare this technique with traditional methods of culture. Seventy-four patients with sepsis admitted to the Emergency Unit of Clinical Hospital of Ribeirão Preto Medical School – USP and 14 controls were included in the study. DNA from serum, plasma and buffy-coat were extracted from all patients and controls. Broad-range PCR was performed in all samples, followed by DNA sequencing of the amplicons. Out of 74 patients, 39 (53%) were male, mean age was 55 ± 19 years old; 37 (50%) patients had severe sepsis and 37 (50%) septic shock; the mortality rate was 51%. Most of primary infections were from respiratory tract (66%), followed by urinary tract infection (20%). Blood culture was positive in 22 (30%) patients, and its positivity was greater in older patients ($p < 0,05$) and patients with higher levels of C reactive protein (CRP) ($p < 0,05$). Broad-range PCR was positive in 44 (59%) patients, when considering both pairs of primers, and was significantly increased compared to blood culture positivity ($p < 0,001$). Broad-range PCR using Bak11W/Bak2 primers was positive in 25 (34%) patients, and using Taf/Tar primers, in 29 (39%) patients. Related to blood fractions, samples from 24 patients were positive in serum; 22 in plasma fraction; and 18 in buffy-coat. None of clinical and demographic characteristics influenced the broad-range PCR positivity. The sensitivity, specificity, positive predicted value and negative

predictive value, when considered healthy persons as negative control, were 59%, 100%, 100% and 32%, respectively. In 40 (54%) patients, blood culture and PCR results were concordant. The concordance coefficient kappa obtained was 0,147 ($p = 0,131$). Regarding to etiologic agents, in 21 samples, from 16 patients, a bacteria was identified by sequencing. The most common bacteria were *Escherichia coli* (3), *Enterococcus sp.* (2), *Staphylococcus sp.* (2) and *Ralstonia sp.* (2). In only two patients, the same bacterial species were identified in both, blood culture and broad-range PCR (*E. coli* e *Streptococcus pneumoniae*). In conclusion, broad-range PCR was more sensitive than blood culture for bacterial identification in septic patients admitted to an Emergency Unit.

Keywords: Sepsis. Broad-range PCR. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relação entre infecções sistêmicas e SIRS -----	18
Figura 2 – Fisiopatologia da sepse grave e choque séptico -----	19
Figura 3 – Resumo da fisiopatologia da sepse -----	20
Figura 4 – Etapas da reação de PCR de largo espectro para os <i>primers</i> Bak11W/Bak2 e Taf/Tar -----	34
Figura 5 – Etapas da reação em termociclador que antecede o sequenciamento gênico -----	35
Figura 6 – Fluxograma de inclusão dos pacientes no estudo -----	38
Figura 7 – Pacientes em choque séptico apresentaram um escore SOFA significativamente maior que pacientes com sepse grave -----	40
Figura 8 – Pacientes em choque séptico apresentaram um escore APACHE II significativamente maior que pacientes com sepse grave -----	40
Figura 9 – Mortalidade e alta hospitalar para pacientes com sepse grave e choque séptico. Pacientes em choque séptico tiveram uma mortalidade significativamente maior que pacientes com sepse grave -----	41
Figura 10 – Pacientes que foram a óbito apresentaram um escore APACHE II significativamente maior que pacientes que tiveram alta -----	41
Figura 11 – Pacientes que foram a óbito apresentaram um escore SOFA significativamente maior que pacientes que tiveram alta -----	42
Figura 12 – Pacientes que foram a óbito eram mais velhos do que pacientes que tiveram alta -----	42
Figura 13 – Pacientes com hemocultura positiva eram mais velhos que pacientes com hemocultura negativa -----	44
Figura 14 – Pacientes com hemocultura positiva tiveram valores mais altos de proteína C reativa que pacientes com hemocultura negativa -----	44
Figura 15 – Padronização da PCR de largo espectro -----	45
Figura 16 – Gel de agarose a 2% mostrando amostras de três pacientes e controle positivo (<i>E. coli</i>) para o par de <i>primers</i> Taf/Tar -----	45
Figura 17 – Resumo dos resultados de hemocultura e PCR para os 74 pacientes com sepse -----	47
Figura 18 – Resumo dos resultados de hemocultura e PCR de largo espectro (<i>primers</i> Bak11W/Bak2) para os 74 pacientes com sepse -----	47
Figura 19 – Resumo dos resultados de hemocultura e PCR de largo espectro (<i>primers</i> Taf/Tar) para os 74 pacientes com sepse -----	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos reagentes presentes no tubo master mix do kit comercial Top Taq Master Mix (QIAGEN®) para PCR -----	31
Tabela 2 – Sequências e tamanhos de <i>amplicons</i> dos <i>primers</i> Bak11W/Bak2 e Taf/Tar -----	32
Tabela 3 – Descrição dos reagentes da PCR de largo espectro -----	33
Tabela 4 – Protocolo para reação de sequenciamento -----	35
Tabela 5 – Características demográficas e clínicas dos pacientes com sepse -----	39
Tabela 6. Microrganismos identificados na hemocultura de acordo com a quantidade de pacientes de onde foram isolados -----	43
Tabela 7 – Amostras positivas para os dois pares de <i>primers</i> utilizados na PCR de largo espectro para cada fração do sangue dos pacientes -----	46
Tabela 8 – Relação das amostras positivas no sequenciamento e o resultado da hemocultura -----	49

LISTA DE ABREVIações

PCR – Reação em cadeia da polimerase

ACCP – American College of Chest Physicians

SCCM – Society of Critical Care Medicine

SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

MODS – Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos

ESICM – European Society of Intensive Care Medicine

ATS – American Thoracic Society

SIS – Surgical Infection Society

SOFA – Sepsis-related organ failure assessment

LPS – Lipopolissacarídeo

LPA – Lipoteicóico

TLR – Toll-like receptor

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

IL – Interleucina

NO – Óxido Nítrico

EUA – Estados Unidos da América

UTI – Unidade de terapia intensiva

SSC – Campanha de Sobrevivência à Seps

SOAP – Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients

BASES – Estudo Epidemiológico Brasileiro de Seps

PROGRESS – Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis

IMPRESS – International Multicentre Prevalence Study on Sepsis

SPREAD – Sepsis Prevalence Assessment Database

ILAS – Instituto Latino Americano de Seps

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

RFLP – Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dATP – Desoxi-adenosina-trifosfato

dTTP – Desoxi-timidina-trifosfato

dCTP – Desoxi-citosina-trifosfato

dGTP – Desoxi-guanidina-trifosfato

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

UE – Unidade de emergência

HCFMRP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

USP – Universidade de São Paulo

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

CRP – Proteína C reativa

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

APACHE II – Acute physiology and chronic health evaluation II

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – Ultra violeta

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CNS – Conselho Nacional de Saúde

VRE – Vancomycin Resistent *Enterococcus*

MRSA – Meticilin Resistent *Staphylococcus aureus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Seps e suas definições	17
1.2 Fisiopatologia da seps e	19
1.3 Epidemiologia da seps e	21
1.4 Epidemiologia da seps e no Brasil	22
1.5 Diagnóstico etiológico na seps e	23
1.6 O uso da biologia molecular na seps e	25
1.7 Hipótese do estudo	26
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Delineamento do estudo	28
3.2 Local do estudo	28
3.3 Elegibilidade dos pacientes	28
3.4 Critérios de inclusão	28
3.5 Critérios de não inclusão e/ou exclusão	29
3.6 Diagnóstico confirmatório de seps e	29
3.7 Obtenção dos dados laboratoriais dos pacientes	29
3.8 Realização da hemocultura	30
3.9 Coleta e processamento das amostras para realização da PCR de largo espectro	30
3.10 Extração do DNA	31
3.11 Reação em cadeia da polimerase de largo espectro	31
3.11.1 Padronização da PCR de largo espectro	32
3.12 Sequenciamento	34
3.13 Cálculo do tamanho amostral	36
3.14 Análise estatística dos dados clínicos dos pacientes	36
3.15 Aspectos éticos	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Inclusão de pacientes	38
4.2 Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população do estudo	38
4.3 Resultados das hemoculturas	42
4.4 Padronização da PCR de largo espectro	44
4.5 Realização da PCR de largo espectro nas amostras clínicas	45
4.6 Comparação da hemocultura com a PCR de largo espectro	46
4.7 Resultados do sequenciamento das amostras positivas	48
5 DISCUSSÃO	50
5.1 Características dos pacientes	50
5.2 PCR de largo espectro em amostras clínicas	51
5.3 PCR de largo espectro na seps e a identificação dos microrganismos	52
5.4 Sensibilidade da PCR de largo espectro	53
5.5 Sensibilidade dos <i>primers</i> Bak11W/Bak2 e Taf/Tar	55
5.6 Identificação das bactérias por sequenciamento	56

5.7 Considerações finais	59
6 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICES	69
ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Seps e suas definições

Doenças infecciosas são uma preocupação mundial há milênios, sendo inclusive responsáveis pelo extermínio de populações inteiras no passado. Assim, há muito tempo também existe uma grande preocupação com o controle das infecções, particularmente as que apresentam manifestações sistêmicas. A palavra *seps* se origina da língua grega e significa “decompor matéria orgânica animal ou vegetal na presença de bactéria”. O termo apareceu pela primeira vez nos poemas de Homero como derivação do verbo grego *sepo*, que significa apodrecer (1). De fato, por muitos anos acreditava-se ser essa uma doença onde o corpo sofria as ações de uma infecção, resultando em um estado de decomposição de tecidos (2). Apenas recentemente sua etiofisiopatologia foi melhor estudada, sabendo-se hoje que se trata de uma resposta inflamatória do corpo frente à invasão de microrganismos (2, 3).

Com o aumento de casos de doenças infecciosas, em meados do século XX, o uso de terminologias como *bacteremia*, *septicemia*, *seps* e *choque séptico* também foi ampliado consideravelmente. Além desses termos, na década de 80 foram incluídos alguns parâmetros de disfunções de órgãos para definição da “síndrome da seps” (4). Por outro lado, usualmente alguns desses termos eram também utilizados para descrever um estado inflamatório sem a presença de um foco infeccioso (3). Assim, com o intuito de minimizar confusões e servir de base para intervenções terapêuticas, as definições e terminologias foram padronizadas em 1991, em uma conferência realizada em Chicago com a participação das entidades *American College of Chest Physicians* (ACCP) e *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) (2, 5-7).

Nessa conferência, foram introduzidos dois novos termos: síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS). Além disso, foram discriminados termos que caracterizam a gravidade da doença, como seps, seps grave e choque séptico (2, 5-7).

Dessa forma, toda resposta inflamatória generalizada pode ter a denominação de SIRS, se atender a pelo menos dois dos seguintes critérios: temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36°C; frequência cardíaca maior que 90 batimentos por minuto;

contagem de leucócitos anormal (maior que 12 mil células por mm^3 , menor que 4 mil células por mm^3 , ou mais de 10% de bastonetes); e taquipneia (frequência respiratória maior que 20 inspirações por minuto ou PaCO_2 menor que 32 mmHg).

Adicionalmente, se a SIRS for secundária a infecção, e não decorrente de outros fatores responsáveis por inflamação como trauma, queimadura e pancreatite, estabelece-se o diagnóstico de sepse (5, 6, 8). Atualmente, sabe-se que tanto bactérias, como fungos, vírus e parasitas podem acionar a liberação de mediadores inflamatórios e causar sepse (6). A figura 1 ilustra as relações entre SIRS, infecção e sepse.

Figura 1 – Relação entre infecções sistêmicas e SIRS. Adaptado de Bone *et al.* (6)

Uma complicação da SIRS é a disfunção de órgãos, como rins, coração, fígado, sistema nervoso central, etc, podendo chegar a falência de múltiplos órgãos. Por esse motivo, outro termo definido pela conferência foi o MODS. Alguns estudos clínicos retrospectivos (9, 10) mostraram que a mortalidade em pacientes com sepse é decorrente principalmente das complicações que a inflamação pode causar no funcionamento dos órgãos. Dessa maneira, a diferenciação da sepse em seus vários graus de gravidade também

foi introduzida na conferência de 1991, com os termos “sepse”, “sepse grave” e “choque séptico”. Sepse grave foi então definida como sepse associada a disfunção de órgãos, hipoperfusão tecidual, ou hipotensão; e choque séptico como a persistência da hipotensão, mesmo após terapia adequada de reposição de fluidos (6). A figura 2 apresenta a evolução da sepse até o estabelecimento do choque séptico.

Figura 2 – Fisiopatologia da sepse grave e choque séptico. Adaptado de Nguyen *et al.* (11)

Desde a conferência de 1991, a nomenclatura da sepse foi revista inúmeras vezes e sempre foi mantido a classificação em sepse, sepse grave e choque séptico, porém com pequenas alterações nas definições das disfunções de órgãos e com o desenvolvimento de escores de gravidade e de disfunção de órgãos, como, por exemplo, o Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) (12-14).

1.2 Fisiopatologia da sepse

Tendo em vista as definições descritas previamente, é evidente que a resposta inflamatória exerce um papel importante na fisiopatologia da sepse. Nesse sentido, há um desequilíbrio nas respostas pró e anti-inflamatórias, causado pela liberação de mediadores inflamatórios na presença de toxinas bacterianas (2, 11, 15, 16).

Substâncias nocivas como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, o ácido lipoteicóico (LPA) de bactérias Gram-positivas, ou superantígenos como as toxinas de *S. aureus* e *S. pyogenes* são liberadas e entram em contato com as células de defesa. Essas toxinas podem tanto afetar a função de macrófagos, aderindo a eles através de receptores *toll-like* (TLRs) e co-receptores (CD-14), como provocar a ativação de linfócitos T, ambos resultando na produção de mediadores inflamatórios (2, 17).

Citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), e interleucinas (IL-1 β , IL-6, entre outras), induzem a vasodilatação pela produção de óxido nítrico (NO); aumentam a coagulação; e liberam metabólitos do ácido araquidônico, precursor de elementos essenciais na inflamação. Paralelamente, ocorre liberação de mediadores anti-inflamatórios, como IL-4, IL-10 e IL-13. O desequilíbrio entre essas duas vias altera a homeostase e contribui para a progressão da disfunção de órgãos (2, 15, 17, 18). Um resumo da fisiopatologia da sepse encontra-se na figura 3.

Figura 3 – Resumo da fisiopatologia da sepse. TLR-4 e TLR-2: Receptores toll-like; CD14: Co-receptor de monócitos; NF- κ B: fator nuclear kappa B; iNOS: óxido nítrico sintetase induzível; NO: óxido nítrico; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; IL-1 β e IL-10: Interleucinas. Adaptado de: <http://crashingpatient.com/resuscitation/severe-sepsis.htm/#physiology_of_sepsis>

1.3 Epidemiologia da sepse

A padronização da nomenclatura permitiu aos pesquisadores avaliar de maneira mais fidedigna a epidemiologia da sepse. Um grande estudo epidemiológico realizado em 2003 mostrou que entre 1979 e 2000 houve um aumento anual de 8,7% na incidência da sepse nos EUA, passando de cerca de 164 mil casos em 1979 (82,7 por 100 mil habitantes) para aproximadamente 660 mil em 2000 (240,4 por 100 mil habitantes) (19).

Segundo Angus *et al.*, a estimativa da incidência de sepse grave nos EUA é de 751 mil casos por ano (20). Eles também relataram que mais da metade dos pacientes com sepse grave estiveram internados em UTIs, e que estes representavam cerca de 11% das admissões nessas unidades (20). Um estudo mais recente, conduzido por Dombrovskiy *et al.*, analisou todos os pacientes com sepse hospitalizados nos EUA entre 1993 e 2003 e demonstrou um aumento na incidência ajustada de sepse de $66,8 \pm 0,16$ para $132 \pm 0,21$ por 100 mil habitantes ($p < 0,001$) (21).

Adhikari *et al.* estimaram uma incidência de aproximadamente 19 milhões de casos de sepse no mundo por ano (22). Um estudo holandês de prevalência de sepse, realizado em um dia, estimou a incidência de sepse na população holandesa em $0,6 \pm 0,06$ casos por 1000 habitantes; de sepse grave em $0,54 \pm 0,06$; e de choque séptico, $0,24 \pm 0,04$ casos por 1000 habitantes, que correspondeu a 0,61% das admissões hospitalares e 11% das admissões em UTIs, para sepse grave (23).

A sepse grave é a principal causa de morte dentro de hospitais nos EUA (24). Em um estudo que utilizou dados de hospitais inscritos na *Surviving Sepsis Campaign*, foi demonstrado que a mortalidade hospitalar de pacientes com sepse variou de 28,3 a 41,1% nos EUA e Europa, respectivamente (25). De acordo com o estudo SOAP, realizado em 24 países da Europa, 37,4% dos pacientes em UTIs apresentaram sepse durante sua estadia, com uma taxa de mortalidade, dentre esses, de 27%, sendo 32,2% para os pacientes com sepse grave, e 54,1% para choque séptico (26). Friedman *et al.* analisaram 131 publicações relacionadas a choque séptico no período de 1958 a 1997, e observaram que a mortalidade geral dos pacientes foi de 49,7%, e que houve uma tendência global significativa de redução da mortalidade ao longo do período estudado (27).

Assim, podemos perceber que apesar da taxa de mortalidade de pacientes com sepse estar reduzindo com o tempo, ela ainda continua alta. Além disso, considerando o aumento na incidência de sepse, o número absoluto de pacientes que morrem por causa dessa doença continua aumentando. Isso pôde ser visto no estudo conduzido por Dombrovskiy *et al.* entre 1993 e 2003, em que a mortalidade hospitalar caiu de 45% para 37,7%, porém, a taxa de mortalidade absoluta na população, ajustada para idade, subiu de 30,3 para 49,7 por 100 mil habitantes (21).

Em relação aos agentes etiológicos, no século passado havia um predomínio de bactérias Gram-negativas envolvidas na etiologia da sepse (28). No entanto, recentemente houve um aumento crescente de microrganismos Gram-positivos (27), chegando, em alguns locais, até mesmo a superar os microrganismos Gram-negativos em agentes isolados de cultura (19, 26).

No que tange ao sítio primário da infecção, foi notada uma inversão, do foco abdominal como principal sítio primário até 1990, para pulmonar, após esse período (27). Atualmente, em torno de 50% dos casos de sepse têm origem pulmonar, seguida de infecções abdominais e urinárias (20, 24).

1.4 Epidemiologia da sepse no Brasil

Em nosso conhecimento, o primeiro estudo multicêntrico que avaliou a epidemiologia da sepse no Brasil foi o BASES (Estudo epidemiológico brasileiro de sepse), publicado em 2004. O estudo foi conduzido em cinco hospitais nos estados de São Paulo e Santa Catarina. A incidência de sepse foi de 30,5 (IC 95%: 28,9 – 32,1) casos por 100 admissões nas UTIs. Dos pacientes que tiveram tempo de estadia maior do que 24h, 46,9% se encaixavam nos critérios de sepse e, entre eles, a mortalidade foi 33,9%. Esse número foi ainda maior para pacientes com sepse grave (46,9%) e choque séptico (52,2%) (29).

Linde-Zwirble e Angus compararam o estudo BASES com outros 13 estudos, e observaram que a incidência de sepse grave nas UTIs registradas no estudo brasileiro foi uma das maiores (17,4% das admissões). Eles atribuíram essa alta incidência a uma possível escassez de leitos em UTIs brasileiras, dando preferência de hospitalização a pacientes com enfermidades mais sérias, como a sepse grave (30).

Em comparação com outros centros, como feito no estudo PROGRESS, publicado em 2009, o Brasil está entre os países com maior mortalidade em sepse grave entre 37 países estudados como Alemanha, Argentina, Canadá, Índia, EUA, Malásia, Austrália, entre outros. A mortalidade no Brasil foi 67,4%, mais que o dobro da taxa na Austrália (32,6%), e bem maior que outros países em desenvolvimento, como os 39% na Índia, por exemplo (31).

Em 2008, foi publicado um estudo multicêntrico que avaliou o custo de pacientes sépticos no Brasil. Denominado COSTS, o estudo avaliou 21 UTIs brasileiras e um total de 524 pacientes com sepse. A mediana do custo diário por paciente séptico no Brasil foi 934 dólares, e o custo total por paciente, 9.632 dólares. Também foi observado que a mortalidade nos hospitais públicos foi significativamente maior do que em hospitais privados (49,1% vs 36,7%, respectivamente, $p = 0,006$) (32).

Atualmente, grandes estudos multicêntricos estão em andamento, avaliando a prevalência e mortalidade da sepse no mundo (IMPRESS) e no Brasil (SPREAD), assim como a eficiência de intervenções terapêuticas (CHECKLIST) em UTIs. Todos eles ainda estão em desenvolvimento e são acompanhados pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) (<http://ilas.org.br/>).

1.5 Diagnóstico etiológico na sepse

Um grande desafio na prática clínica para o diagnóstico de sepse é a confirmação da infecção, ou seja, atribuir a SIRS a uma infecção, descartando outras causas de inflamação. Para isso, é necessário identificar um ou mais agentes infecciosos, o que nem sempre ocorre. Adicionalmente, considerando a gravidade dos quadros de sepse, é fundamental que antimicrobianos de largo espectro sejam administrados o mais rápido possível (33, 34). Por isso, quanto mais precoce a identificação do agente etiológico responsável pelo desencadeamento da sepse, maior a probabilidade de tratamento direcionado, melhor o prognóstico do paciente e menor a chance de seleção de microrganismos resistentes a antibióticos de largo espectro (11).

Primariamente, a identificação de microrganismos se deu pela comparação fenotípica das espécies encontradas com a morfologia e características bioquímicas de espécies descritas na literatura (35). Embora muitas características estejam compiladas em tabelas usadas como referências, a identificação final se dá na maioria das vezes pela espécie mais

provável, pois os resultados não são exatos. Dessa forma, a identificação de microrganismos causadores da infecção pode ser variável entre diferentes laboratórios (36).

A identificação direta por microscopia (coloração de Gram) pode evidenciar rapidamente a presença de um agente em amostras biológicas, e tem a vantagem da obtenção das características morfotintoriais bacterianas, ou seja, o formato da bactéria (bacilo, coco, cocobacilo, etc) e a caracterização por Gram (Gram-negativo ou Gram-positivo). Todavia, é necessário uma carga bacteriana muito grande ($>10^4$ UFC/mL) para que os microrganismos sejam vistos ao microscópio óptico (37).

Métodos diagnósticos baseados em cultura microbiológica possuem a vantagem de isolar o agente infeccioso e também a possibilidade de realizar testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Por outro lado, para que seja realizada a identificação, é essencial que a amostra esteja pura, isto é, constituída de apenas uma espécie bacteriana, e em quantidade suficiente para realização dos testes bioquímicos. Assim, antes de tudo, os microrganismos que estão causando a infecção devem ser recuperados de amostras clínicas e cultivados em meios de cultura artificiais. Esse processo é relativamente demorado (variando entre 24h até sete dias), considerando a urgência do tratamento e gravidade da doença, onde cada hora de atraso tem um grande impacto na sobrevivência do paciente (33).

Ainda assim, atualmente o padrão ouro de detecção de microrganismos responsáveis pela sepse ainda é a hemocultura. Uma das desvantagens da hemocultura é que para a recuperação eficiente de bactérias na corrente sanguínea, deve ser coletado um volume de aproximadamente 10 mL de sangue em cada frasco de cultura (38), volume nem sempre viável entre pacientes hospitalizados, principalmente em UTIs. Além disso, culturas falso negativas são comuns em pacientes com uso prévio de antibióticos e na presença de microrganismos fastidiosos ou nutricionalmente mais exigentes (39, 40). Sabe-se atualmente que uma ampla proporção de microrganismos existentes não são cultiváveis (41), o que nos leva a indagar sobre nosso real conhecimento sobre as bactérias que têm a capacidade de causar doenças nos seres humanos.

Nesse sentido, existem também limitações da hemocultura quanto ao espectro de positividade. Por exemplo, bactérias anaeróbias estritas têm de ser cultivadas em sistemas diferenciados, que não permitem a entrada de O_2 do ar, tóxico para suas células. Bactérias fastidiosas, como o causador da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, também necessitam de um meio de cultura especial e sua incubação é prolongada, em até 40 dias.

Maior atenção também deve ser dada a pacientes que receberam tratamento prévio com antimicrobianos. É comum a adição de resinas adsorventes de antibióticos que visam diminuir sua concentração no sangue coletado para cultura, a fim de minimizar resultados falso negativos.

Outra desvantagem da hemocultura é a quantidade de amostras positivas provenientes da contaminação na hora da coleta ou em outro momento de seu processamento. Zadroga *et al.*, avaliaram os resultados de dois sistemas automatizados para hemocultura em um departamento de emergência nos EUA, e concluíram que 33% dos microrganismos recuperados em qualquer dos sistemas, são na verdade contaminação, enquanto que 63% são patógenos, e o restante, de origem indeterminada (38).

1.6 O uso da biologia molecular na sepse

Embora seja aconselhável uma terapia antimicrobiana empírica de largo espectro em pacientes com sepse, a escolha do antibiótico adequado é a intervenção mais efetiva na sobrevida dos pacientes (42). Assim, quanto mais precoce o diagnóstico, maior a probabilidade de um tratamento direcionado.

Tendo como objetivo acelerar a detecção dos patógenos envolvidos em infecções e aumentar a sensibilidade dos testes diagnósticos, órgãos regulamentadores de técnicas laboratoriais como o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), vêm gradativamente incrementando métodos de biologia molecular em seus protocolos (43). Uma das grandes vantagens da biologia molecular é o não requerimento de crescimento dos microrganismos, sendo possível a avaliação de sua presença ou ausência diretamente nas amostras clínicas dos pacientes (44).

Paralelamente, no ramo da pesquisa científica, métodos como espectrometria de massa, reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento, polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), microarranjos, entre outros, vêm sendo estudados como potenciais alternativas futuras (45-47).

Entre esses métodos, a PCR é uma das mais utilizadas. Seu princípio baseia-se na amplificação de ácidos nucleicos, possibilitando que as moléculas de DNA do patógeno sejam visualizadas, identificadas e até mesmo quantificadas quando presentes em uma

amostra clínica (urina, sangue, fezes, lavado bronco alveolar, etc). Para isso são necessários *primers* específicos para a região do DNA das bactérias a ser amplificada.

Dessa forma, PCRs espécie-específicas são mais úteis na investigação de doenças causadas por apenas um patógeno, como, por exemplo, tuberculose. Porém, o seu uso se torna pouco viável para o diagnóstico da sepse, onde inúmeros microrganismos podem ser o agente causal. Essa limitação pode ser minimizada com a PCR de largo espectro, que utiliza *primers* direcionados às regiões conservadas do DNA procarionte, tornando possível amplificar o DNA de qualquer bactéria em uma só reação. A região a ser amplificada mais comumente utilizada é uma parte do DNA codificador da porção 16S de RNA ribossômico de bactérias (48-50). Estudos com a PCR de largo espectro vêm sendo realizados desde o início da década de 90, com o intuito de introduzir essa técnica na pesquisa microbiológica (48).

Supõe-se que o nível de conservação do gene 16S rRNA deve-se ao fato de ele codificar um componente crítico da função celular (35). Esse gene codificador da subunidade menor do ribossomo bacteriano é encontrado em todas as bactérias, e possui partes altamente conservadas intercaladas com porções variáveis, permitindo a identificação bacteriana (44). Desse modo, uma reação utilizando a porção 16S rDNA pode ser capaz de detectar a presença de qualquer bactéria, e também identificá-la. Além disso, problemas na execução da hemocultura, como a interferência de antibioticoterapia prévia, ou a limitação de organismos não cultiváveis, exigentes ou fastidiosos, não são aplicáveis à PCR. Assim, a PCR de largo espectro possui um bom potencial para o diagnóstico etiológico em doenças como endocardite infecciosa, sepse, entre outras.

1.7 Hipótese do estudo

Considerando a necessidade de novos métodos para o diagnóstico precoce da sepse, formulamos a hipótese de que a PCR de largo espectro apresenta melhor sensibilidade, especificidade e rapidez no diagnóstico etiológico da sepse, em relação à hemocultura, o que pode possibilitar um tratamento direcionado e, com isso, uma melhoria na morbimortalidade destes pacientes, além do uso racional de antimicrobianos de largo espectro.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto foi determinar o papel da PCR de largo espectro no diagnóstico etiológico de sepse em pacientes atendidos em um hospital de emergência.

Os objetivos específicos foram:

- Padronizar a PCR de largo espectro para o diagnóstico bacteriano em pacientes com sepse, utilizando kits comerciais disponíveis, que tornam o processo mais prático e aplicável em uma rotina laboratorial.
- Comparar os resultados da PCR de largo espectro com as técnicas tradicionais de cultura, e calcular sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, utilizando dois diferentes pares de *primers*, e três frações do sangue (soro, plasma e *buffy-coat*).
- Determinar características clínicas e laboratoriais que possam influenciar os resultados da PCR de largo espectro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo analítico, observacional e transversal.

3.2 Local do estudo

O estudo foi realizado na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (UE-HCFMRP-USP).

A UE-HCFMRP-USP é um hospital exclusivo para o atendimento de urgências e emergências, sendo referência terciária para 26 municípios da Divisão Regional de Saúde XIII do Estado de São Paulo (Ribeirão Preto) que totaliza, aproximadamente, 1.200.000 habitantes. Apresenta uma média de internação anual de aproximadamente 20.000 pacientes (51).

3.3 Elegibilidade dos pacientes

Os pacientes admitidos na UE-HCFMRP-USP com presença de SIRS e suspeita de infecção, associado à coleta de hemocultura na admissão, foram incluídos prospectivamente no estudo.

Além dos pacientes com sepse, 14 voluntários saudáveis foram incluídos como controles negativos. Suas amostras foram processadas da mesma maneira que as amostras de pacientes com sepse, conforme descrito abaixo.

3.4 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram:

- Idade ≥ 12 anos, de ambos os sexos;
- Pacientes admitidos na UE-HCFMRP-USP com SIRS e suspeita de sepse;
- Menos de 24 h da admissão hospitalar;

- Capacidade do paciente ou representante legal de decidir quanto à participação ou não no estudo.

3.5 Critérios de não inclusão e/ou exclusão

Os critérios de não inclusão/exclusão são:

- Pacientes com diagnóstico de SIRS secundário a outras etiologias que não sepse;
- Recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ou decisão de não participação no estudo;
- Ausência de coleta de hemocultura na admissão.

3.6 Diagnóstico confirmatório de sepse

O diagnóstico de sepse foi realizado pela equipe médica da UE-HCFMRP-USP, pela presença da SIRS atribuída a uma infecção. A SIRS foi definida pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios (6):

- Temperatura corpórea maior que 38°C ou menor que 36°C;
- Frequência cardíaca maior que 90 bpm;
- Frequência respiratória maior que 20 ipm ou PaCO₂ menor que 32 mmHg;
- Contagem de leucócitos maior que 12.000 células/mm³, menor que 4.000 células/mm³, ou presença de mais que 10% de bastonetes.

A confirmação de infecção adquirida na comunidade foi feita pela equipe médica por critérios clínicos, exames de imagem (radiografia de tórax, ultrassonografia, tomografia computadorizada), exames laboratoriais (urina I, hemograma, proteína C reativa) e microbiológicos (hemocultura, urocultura, cultura de líquido, cultura de abscesso, etc). Esses exames são rotineiramente solicitados de acordo com a suspeita clínica. Para o diagnóstico de infecção nosocomial, foram utilizados os critérios do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (52).

3.7 Obtenção dos dados laboratoriais dos pacientes

Durante a inclusão e internação dos pacientes, as informações clínicas foram coletadas em formulário específico contendo características demográficas e clínicas, resultados de culturas microbiológicas, resultados de exames laboratoriais, escores de gravidade, medicamentos prescritos, evolução e desfecho do quadro clínico do paciente, entre outras (Apêndice A). O escore SOFA mensura a disfunção de órgãos, enquanto que o escore APACHE II mensura a gravidade do paciente e a probabilidade de mortalidade.

3.8 Realização da hemocultura

A indicação de coleta de hemocultura foi de responsabilidade da equipe médica e seu processamento continuou sendo feito normalmente pelo laboratório de microbiologia da UE-HCFMRP-USP, pelo sistema automatizado BD Bactec 9240®. Não houve qualquer interferência do estudo na indicação de coleta ou no processamento da hemocultura.

Para realização do exame de hemocultura foram coletadas quantidades suficientes para 2 frascos de cultura, que foram incubados em aparelho automatizado (BACTEC - BD®) por no máximo 7 dias. Havendo positividade, as amostras foram subcultivadas nos meios sólidos Ágar Chocolate, Ágar McConkey e Ágar Sal Manitol. Após seu crescimento, colônias isoladas foram identificadas através do sistema Vitek 2 (bioMérieux, Durham, NC).

3.9 Coleta e processamento das amostras para realização da PCR de largo espectro

Foram coletadas amostras de sangue (aproximadamente 3 mL em um tubo sem anticoagulante e 3 mL em um tubo com anticoagulante EDTA) dos pacientes, dentro das primeiras 24 horas de internação. Cada amostra de sangue coletada foi centrifugada a 2.500 rpm por 15 minutos (centrífuga Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) e então fracionada em soro, plasma e *buffy-coat*.

Para o correto isolamento da fração *buffy-coat* e remoção das hemácias remanescentes, foi utilizado um tampão de lise de hemácias (155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA), na proporção de 2 unidades de tampão para 1 de amostra. Após adição do tampão, cada amostra foi homogeneizada cuidadosamente por 30 segundos e logo após, centrifugada a 2.500 rpm por cinco minutos. Esse procedimento foi repetido até a lise total

das hemácias e, finalmente, o *pellet* de leucócitos ressuspendido em 200 µL de solução salina 0,9%.

3.10 Extração do DNA

Todas as frações, soro, plasma e *buffy-coat*, foram imediatamente submetidas à extração de DNA com o DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguindo as instruções do fabricante. Para isso, foram utilizados 200 µL de cada amostra, e o volume final de eluição do DNA extraído foi 100 µL para amostras de soro e plasma e 200 µL para amostras de *buffy-coat*. O DNA extraído foi quantificado utilizando o aparelho Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), e armazenado a -20°C até sua posterior utilização na reação da PCR de largo espectro.

3.11 Reação em cadeia da polimerase de largo espectro

Para realização da PCR, foi utilizado o TopTaq® Master Mix kit (Qiagen), no qual as concentrações da enzima Taq Polimerase, nucleotídeos (dNTP), tampão e co-fator MgCl₂ já são previamente estabelecidas (Tabela 1), sem necessidade de ajuste para as diversas reações. Desta forma, em um mesmo tubo são colocados: o mix (proveniente do kit), *primer forward*, *primer reverse*, a amostra a ser testada, e água ultra pura RNase *free* estéril (proveniente do kit) para complementação do volume final. Além disso, foram utilizados dois pares de *primers* direcionados à região codificante da fração 16S ribossomal de procariontes (39, 53). Suas descrições encontram-se na Tabela 2.

Tabela 1 – Composição dos reagentes presentes no master mix do kit comercial Top Taq Master Mix (QIAGEN®) para PCR

	Concentração na reação de PCR
Co-fator	1,5 mM MgCl ₂
Enzima TopTaq DNA Polimerase	5,0 unidades/µL
dNTP	200 µM cada nucleotídeo

Tabela 2 – Sequências e tamanhos de *amplicons* dos *primers* Bak11W/Bak2 e Taf/Tar.

Primers	Sequência	Produto amplificado (pb) para <i>S. aureus</i>	Produto amplificado (pb) para <i>E. coli</i>
Bak11W (sense)	AGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	804	797
Bak2 (anti-sense)	GGACTAC(C/T/A)AGGGTATCTAAT		
Taf (sense)	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	467	467
Tar (anti-sense)	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		

Adaptado de Zucol *et al.* (54)

A reação da PCR começou com uma etapa inicial de desnaturação (pré-PCR), a uma temperatura de 94°C por três minutos; seguida por ciclos de amplificação em três diferentes temperaturas (desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* e extensão da nova fita de DNA), conforme padronização para cada par de *primers*, descrita adiante. Após, foi feita a extensão final dos *amplicons* a 72°C (temperatura de atividade da Taq Polimerase) por 10 minutos, e então, conservação a 4 °C até a revelação em gel de eletroforese.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (Veriti® 96-well, Applied Biosystems), e, juntamente com as amostras, foram adicionados um ou mais controles negativos (utilizando-se água estéril no lugar do DNA da amostra), além de um controle positivo (DNA extraído de colônias bacterianas).

Após a amplificação, as amostras foram reveladas por eletroforese. Para isso, 8,5 µL de cada amostra, acrescidos a 2 µL de corante (*loading dye* 6x) e 1,5 µL de intercalante de DNA (GelRed®, Uniscience do Brasil, São Paulo, SP), diluído em água estéril na proporção 1:500, foram aplicados em gel de agarose a 2%. Em cada gel foi feita também a aplicação de um marcador de peso molecular de 100 pb. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 110V em um tempo médio de 50 minutos, em cuba para eletroforese (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA), e logo depois foram revelados e fotografados em luz ultravioleta.

3.11.1 Padronização da PCR de largo espectro

Para a padronização da PCR de largo espectro foram utilizadas 10 amostras de bactérias comumente isoladas em amostras clínicas, sendo cinco bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*) e cinco Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*). A obtenção dessas cepas foi feita no laboratório de microbiologia da UE-HCFMRP-USP, o mesmo hospital em que foram colhidas as amostras clínicas dos pacientes.

O DNA das bactérias foi extraído de colônias bacterianas suspensas em salina 0,9%, com concentração final semelhante à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), através do mesmo protocolo utilizado para as amostras dos pacientes. Da mesma maneira, o DNA extraído foi avaliado quanto à quantidade e qualidade em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

Com o DNA dessas bactérias, foi realizada a padronização da concentração de *primers* necessária para a reação de PCR de largo espectro, bem como das diferentes etapas da PCR, tais como configuração do tempo e temperatura de anelamento da reação.

Para a padronização da quantidade de primer, foram feitas diversas reações com diferentes combinações de concentrações do *primer forward* e *reverse* (2, 5, 10 e 20 pmol/ μ L), até se obter a quantidade de *primers* com a melhor amplificação da amostra e melhor qualidade na corrida eletroforética. A descrição da quantidade dos reagentes, para ambos pares de *primers*, encontra-se resumida na Tabela 3.

Tabela 3 – Descrição dos reagentes da PCR de largo espectro

	Quantidade
Master mix (enzima, buffer, dNTP, MgCl)	12,5 μ L
H ₂ O	7,5 μ L
Primer sense (5 pmol/ μ L)	1 μ L
Primer anti-sense (10 pmol/ μ L)	1 μ L
DNA	3 μ L
TOTAL	25 μ L

A configuração da PCR em termociclador foi baseada na descrição feita por Zucol *et al.* (54), com alguns ajustes por se tratar de uma PCR convencional. Para determinação da temperatura ideal de anelamento dos *primers*, foram feitas várias reações com mudanças graduais na temperatura, partindo de 5°C a menos que a menor temperatura de *melting* do par de *primers*, testando uma variação de cerca de 6°C em torno desta (acima e abaixo). A

temperatura de anelamento foi escolhida através da melhor amplificação da amostra dentre as testadas, e a configuração final das reações para os dois pares de *primers* encontra-se na Figura 4.

Figura 4 – Etapas da reação de PCR de largo espectro para os *primers* Bak11W/Bak2 e Taf/Tar

3.12 Sequenciamento

Após a realização da PCR dos pacientes, foram feitos os sequenciamentos das amostras positivas. Para isso, o DNA amplificado foi purificado do gel de agarose após a eletroforese, cortando a banda de interesse do gel e fazendo a purificação com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA). Para cada amostra positiva, o DNA foi purificado, quantificado, e submetido à reação de sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado pelo Núcleo de Análise Genômica, uma iniciativa do Laboratório de genética molecular e bioinformática da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

As amostras purificadas foram submetidas a uma reação de PCR utilizando uma mistura de desoxinucleotídeos normais com didesoxinucleotídeos (nucleotídeos com uma hidroxila a menos que os normais) marcados com fluorescência, disponíveis no BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), para cada primer separadamente (*forward* ou *reverse*), conforme a Tabela 4.

Tabela 4 – Protocolo para reação de sequenciamento

	Quantidade
Big Dye	2 µL
Tampão	2 µL
Água ultra pura RNase-free	4 µL
Primer (2,5 pmol/µL)	1 µL
Amostra de DNA	1 µL
Volume final	10 µL

Após o término da reação de sequenciamento, cujos parâmetros são ilustrados na Figura 5, as sequências de nucleotídeos das amostras foram determinadas pelo aparelho ABI® 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para análise do cromatograma obtido no sequenciamento, foi utilizado o software Chromas (Technelysium Pty Ltd).

As sequências foram então comparadas com três bancos de dados online: GenBank, através do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); ENA - European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena/>); e LeBIBI - Bio Informatic Bacteria Identification (<https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>). Amostras que tiveram similaridade maior que 97% com os resultados obtidos no BLAST foram identificadas como espécie (55). Se a similaridade esteve entre 92 e 97%, as amostras foram identificadas como gênero. Por sua vez, se essa similaridade foi de até 92%, entre várias bactérias da mesma família, e somente uma família, a identificação foi feita pela família encontrada. Os resultados só foram considerados se encontrados em pelo menos dois dos bancos de dados citados acima.

Figura 5 – Etapas da reação em termociclador que antecede o sequenciamento gênico

3.13 Cálculo do tamanho amostral

Considerando que o estudo avalia um novo teste diagnóstico, o cálculo realizado para se chegar ao tamanho amostral ideal é representado pelas seguintes fórmulas (56):

$$(a) \quad TP + FN = \frac{Z^2_{(1-\alpha)/2} SN(1-SN)}{W^2}$$

$$(b) \quad n = \frac{TP + FN}{p}$$

Na fórmula, *TP* e *FN* representam o número de pacientes com a doença (verdadeiro positivos e falso negativos); $Z^2 = 1,96$ (segundo um intervalo de confiança de 95%); *SN* é a menor sensibilidade aceitável (95%); *W* é o erro absoluto tolerável (5%); *n* é o tamanho amostral; e *p* é a porcentagem de pacientes no estudo com a doença.

Ou seja, elegendo um desenho experimental que tenha 85% de pacientes com sepse, o tamanho amostral deve ser de pelo menos 86 pacientes (73 com a doença e 13 controles negativos).

3.14 Análise estatística dos dados clínicos dos pacientes

Para análise dos dados foi utilizado o programa Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

Foram analisadas as características sexo, idade, valor da proteína C reativa (CRP), número de leucócitos, escore SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment), escore APACHE II (Acute physiology and chronic health evaluation II), classificação da sepse e desfecho (alta hospitalar ou óbito).

As variáveis categóricas foram expressas em porcentagem, enquanto as variáveis contínuas em média e desvio padrão, quando apresentaram distribuição normal; e mediana e intervalo interquartil, quando apresentaram distribuição não-normal.

Para comparação das variáveis categóricas, foi utilizado o teste de Fisher e do Qui-Quadrado para análise entre dois grupos e vários grupos, respectivamente. Para as variáveis contínuas, foi utilizado o teste t de Student e análise de variância (ANOVA) para julgamento entre dois grupos e vários grupos, respectivamente. Após, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

3.15 Aspectos éticos

O trabalho foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, segundo processo nº 536/2008 (Anexo A).

Os voluntários desse estudo, ou seus representantes legais (em caso de incapacidade do participante), receberam informações sobre os objetivos do estudo, procedimentos envolvidos e riscos. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento antes de qualquer participação no estudo (Anexo B). O estudo foi conduzido em conformidade com as resoluções nacionais e internacionais como descritas nos seguintes documentos: Resolução CNS 196/96, Declaração de Helsinque e todas as suas revisões e alterações, Documento de Las Américas (57).

4 RESULTADOS

4.1 Inclusão de pacientes

A inclusão de pacientes com sepse foi feita no período de agosto de 2012 a dezembro de 2013. O fluxograma da inclusão dos pacientes com sepse encontra-se na Figura 6. Noventa e um pacientes foram incluídos no estudo, sendo sete excluídos por não terem hemocultura, nove por não apresentarem critérios para sepse e um por perda do material. Adicionalmente, foram incluídos no estudo amostras de 14 voluntários saudáveis, que serviram como controles.

Figura 6 – Fluxograma de inclusão dos pacientes no estudo

4.2 Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população do estudo

Os dados clínicos e laboratoriais dos 74 pacientes com sepse encontram-se na Tabela 5 e, no Apêndice B, as características individuais de cada paciente.

Tabela 5 – Características demográficas e clínicas dos pacientes com sepse.

Características	
Sexo ^a	
Feminino	39 (53)
Masculino	35 (47)
Idade (anos) ^b	55 ± 19
Proteína C reativa (mg/L) ^b	17,07 ± 9,07
Leucócitos (cels/mm ³) ^b	15.553 ± 9.883
APACHE II ^c	21 (15-27,5)
SOFA ^b	8,15 ± 4,11
Classificação ^a	
Sepse grave	37 (50)
Choque séptico	37 (50)
Desfecho ^a	
Alta	36 (49)
Óbito	38 (51)
Infecção primária ^a	
Respiratória	49 (66)
Trato genitourinário	15 (20)
Cutânea	7 (9)
Outras	8 (11)

SOFA = Sepsis-related Organ Failure Assessment; APACHE II = Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II. ^a variáveis expressas em n (%); ^b variáveis expressas em média ± desvio padrão; ^c variáveis expressas em mediana (intervalo interquartilico).

Dos 74 pacientes, 39 (53%) eram homens; a média de idade foi 55 ± 19 anos; 37 (50%) tiveram sepse grave e 37 (50%) choque séptico; e a mortalidade foi 51%. O valor médio da proteína C reativa foi de 17,07 ± 9,07 mg/L, sendo que 74% tiveram níveis maiores ou iguais a 10,0 mg/L (58). A média da contagem de leucócitos em sangue foi 15.553 ± 9.883 células/mm³, e em 66% dos pacientes esse valor foi maior que 12 mil ou menor que 4 mil células/mm³. Em todos pacientes foi diagnosticado o sítio da infecção, sendo as mais frequentes: infecção respiratória em 49 (66%), e infecções gênito-urinárias em 15 (20%) pacientes; seguidos de infecções cutâneas em sete (9%), infecções no trato gastrointestinal em três (4%), meningite em dois (3%) e outros sítios em três (4%) pacientes. Em cinco pacientes houve infecções em dois sítios distintos simultaneamente.

Posteriormente, os pacientes foram subdivididos em sepse grave e choque séptico, relacionando os dois grupos com as demais variáveis. Conforme esperado, houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, para os escores APACHE II ($p < 0,001$) e SOFA ($p < 0,001$) (Figuras 7 e 8), sendo maiores nos pacientes com choque séptico. Não houve

diferença estatisticamente significativa entre os grupos sepse grave e choque séptico, quanto às variáveis idade, sexo, proteína C reativa, leucócitos e infecção primária.

Figura 7 – Pacientes em choque séptico apresentaram um escore SOFA significativamente maior que pacientes com sepse grave. *** $p < 0,001$

Figura 8 – Pacientes em choque séptico apresentaram um escore APACHE II significativamente maior que pacientes com sepse grave. *** $p < 0,001$

A mortalidade hospitalar foi 51%, sendo significativamente maior nos pacientes com choque séptico (73%) do que com sepse grave (30%), ($p < 0,0001$) (Figura 9), demonstrando que há uma forte relação entre a gravidade da sepse e a mortalidade. Os pacientes com choque séptico tiveram um risco relativo de 2,6 vezes de evoluir a óbito, em relação aos pacientes com sepse grave.

Figura 9 – Mortalidade e alta hospitalar para pacientes com sepse grave e choque séptico. Pacientes em choque séptico tiveram uma mortalidade significativamente maior que pacientes com sepse grave. *** $p < 0,001$

Em relação aos pacientes que foram a óbito, eles eram mais velhos e apresentavam valores significativamente maiores nos escores de APACHE II e SOFA (Figuras 10 – 12), em comparação aos sobreviventes. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto às variáveis sexo, proteína C reativa, leucócitos e infecção primária.

Figura 10 – Pacientes que foram a óbito apresentaram um escore APACHE II significativamente maior que pacientes que tiveram alta. *** $p < 0,001$

Figura 11 – Pacientes que foram a óbito apresentaram um escore SOFA significativamente maior que pacientes que tiveram alta. *** $p < 0,001$

Figura 12 – Pacientes que foram a óbito eram mais velhos do que pacientes que tiveram alta. * $p < 0,05$

Em relação aos 14 voluntários que fizeram parte dos controles negativos, sete (50%) eram homens e sete (50%) eram mulheres. A média de idade foi de 29 ± 7 anos.

4.3 Resultados das hemoculturas

Os resultados da hemocultura liberados pelo laboratório de microbiologia foram revisados, a fim de se distinguir as contaminações. Assim, dois resultados foram considerados falso positivos. Ao final, a hemocultura foi positiva em 22 (30%) pacientes,

sendo que em dois houve isolamento de duas bactérias concomitantes. Os microrganismos isolados estão representados na Tabela 6. As principais bactérias encontradas foram *Staphylococcus coagulase negativa* (8), *Staphylococcus aureus* (2), *Escherichia coli* (2) e *Streptococcus pneumoniae* (2).

Tabela 6. Microrganismos identificados na hemocultura de acordo com a quantidade de pacientes de onde foram isolados.

Quantidade	Microrganismo isolado
12	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
2	<i>Escherichia coli</i>
2	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1	<i>E. faecalis</i>
1	<i>Streptococcus pyogenes</i>
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>
1	<i>Enterobacter cloacae</i>
1	<i>Salmonella sp.</i>

Comparando-se o resultado da hemocultura com as características demográficas, clínicas e laboratoriais, percebemos que há associação com a idade dos pacientes, apresentando taxa de positividade significativamente maior em pacientes mais velhos ($p < 0,05$) (Figura 13). Houve também associação com os valores de CRP, tendo os pacientes com hemocultura positiva valores mais altos de CRP ($p < 0,05$), conforme observamos na Figura 14. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto as demais variáveis, tais como, sexo, leucócitos, SOFA, APACHE II, classificação da sepse, desfecho e infecção primária. Adicionalmente, sua sensibilidade na detecção da sepse foi calculada como 29,73%.

Figura 13 – Pacientes com hemocultura positiva eram mais velhos que pacientes com hemocultura negativa. * $p < 0,05$

Figura 14 - Pacientes com hemocultura positiva tiveram valores mais altos de proteína C reativa que pacientes com hemocultura negativa. * $p < 0,05$

4.4 Padronização da PCR de largo espectro

A padronização da PCR de largo espectro foi feita com cinco bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*) e cinco Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*). Na figura 15, podemos observar a amplificação do DNA dessas 10 bactérias com a utilização de dois pares de *primers*, Taf/Tar e Bak11W/Bak2.

Figura 15 – Padronização da PCR de largo espectro. M = marcador de 100 pb; B = branco; 1 = *Streptococcus pyogenes*; 2 = *S. pneumoniae*; 3 = *N. meningitidis*; 4 = *E. faecalis*; 5 = *P. aeruginosa*; 6 = *A. baumannii*; 7 = *E. coli*; 8 = *K. pneumoniae*; 9 = *Staphylococcus epidermidis*; 10 = *S. aureus*.

4.5 Realização da PCR de largo espectro nas amostras clínicas

Para realização da PCR de largo espectro, foi utilizado o protocolo descrito na Tabela 3, com as amostras dos pacientes, bem como um controle negativo de reação (água estéril), e um controle positivo (DNA extraído de cultura bacteriana). A Figura 16 mostra a foto de um gel de eletroforese para algumas dessas amostras.

Figura 16 – Gel de agarose a 2% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador a cada 100 pb (M); amostras de três pacientes (23, 24 e 25) e controle positivo (C+) (*E. coli*) para o par de *primers* Taf/Tar. Para cada paciente há, amostra de soro, amostra de plasma, amostra de buffy-coat e um controle negativo (água). Amostras positivas são encontradas para soro e plasma do paciente 25.

A PCR de largo espectro foi negativa em todas as frações de sangue dos 14 voluntários sadios incluídos no estudo. Para os 74 pacientes com sepse, ela foi positiva em 44 (59%) amostras, sendo que 29 (39%) amostras foram positivas para o par de *primers*

Taf/Tar, e 25 (34%) para o par Bak11W/Bak2. Apenas 10 (13%) pacientes tiveram amostras positivas para ambos os pares de *primers*.

Analisando as frações do sangue, amostras de 24 pacientes foram positivas na fração soro; 22 na fração plasma; e 18 na fração *buffy-coat*. A Tabela 7 mostra a quantidade de amostras positivas para os dois pares de *primers*, em cada fração do sangue.

Adicionalmente, os resultados da PCR foram comparados com as características clínicas e laboratoriais de cada paciente (idade, sexo, valor da proteína C reativa, número de leucócitos, valor do APACHE II, valor do SOFA, classificação da sepse e desfecho). Não foi observada nenhuma condição que favorecesse ou não a sua positividade.

Tabela 7 – Amostras positivas para os dois pares de *primers* utilizados na PCR de largo espectro para cada fração do sangue dos pacientes.

	Taf/Tar	Bak11W/Bak2	Taf/Tar e Bak11W/Bak2
Soro, plasma ou <i>buffy-coat</i>	29	25	10
Soro	16	8	1
Plasma	14	8	3
<i>Buffy-coat</i>	6	12	2

4.6 Comparação da hemocultura com a PCR de largo espectro

A relação entre a quantidade de amostras positivas da hemocultura com a quantidade de amostras positivas para a PCR de largo espectro (em geral e para cada par de *primers* separadamente) é mostrada nas Figuras 17 a 19. Os resultados detalhados para cada paciente encontram-se no Apêndice C.

Figura 17 – Resumo dos resultados de hemocultura e PCR para os 74 pacientes com sepse.

Figura 18 – Resumo dos resultados de hemocultura e PCR de largo espectro (*primers* Bak11W/Bak2) para os 74 pacientes com sepse.

Figura 19 - Resumo dos resultados de hemocultura e PCR de largo espectro (*primers* Taf/Tar) para os 74 pacientes com sepse.

Como podemos observar, a hemocultura foi positiva em 22 (30%) dos pacientes e a PCR de largo espectro em 44 (59%) pacientes ($p < 0,001$). Em 16 (22%) amostras, os resultados foram concordantemente positivos para hemocultura e PCR, e em 24 (32%) foram negativas para ambos os testes. Isso torna os resultados dos dois testes concordantes em 40 pacientes (54%). O coeficiente kappa obtido foi 0,147 ($p = 0,131$).

Sendo assim, a sensibilidade da PCR, quando considerado os resultados com os dois pares de *primers*, foi de 59%, em comparação com os 30% da hemocultura ($p = 0,0005$). Separadamente, a sensibilidade para o par de *primers* Taf/Tar foi 39%, e para o par de *primers* Bak11W/Bak2, 34%. Todas as amostras de pacientes saudáveis foram negativas para PCR, tornando sua especificidade 100%, o valor preditivo positivo 100% e o valor preditivo negativo 32%. Esses parâmetros não puderam ser calculados para a hemocultura, já que na inclusão dos controles negativos esse teste não foi realizado.

4.7 Resultados do sequenciamento das amostras positivas

Foi realizado o sequenciamento das amostras positivas de todas as frações, ou seja, 24 amostras de soro, 22 amostras de plasma, e 18 amostras de *buffy-coat*. Em 21 amostras, de 16 pacientes, foi possível identificar a bactéria com o sequenciamento. Dessas, 11 (52%) foram identificadas como espécie, seis (29%) como gênero, e quatro (19%) como família. Os principais agentes detectados foram *E. coli* (3 pacientes), *Enterococcus* sp. (2 pacientes), *Staphylococcus* sp. (2 pacientes) e *Ralstonia* sp. (2 pacientes). Os resultados dos sequenciamentos em comparação com a hemocultura encontram-se na Tabela 8.

Das 21 amostras que geraram sequenciamento de microrganismos, nove (43%) foram de soro, sete (33%) de plasma, e cinco (24%) de *buffy-coat*. Em relação aos *primers*, 16 (76%) amostras foram amplificadas pelo par Taf/Tar, enquanto que apenas cinco (24%) pelo par Bak11W/Bak2.

Tabela 8 – Relação das amostras positivas no sequenciamento e o resultado da hemocultura.

Amostra	Resultado hemocultura	Resultado sequenciamento	Material	Primers
1	Negativo	<i>Enterococcus</i> sp.	BC	Taf/Tar
2	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	BC	Taf/Tar
8	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	BC	Taf/Tar
16	Negativo	<i>Corynebacterium</i> sp.	Soro	Taf/Tar
17	Negativo	<i>Propionibacterium acnes</i>	BC	Taf/Tar
20	Negativo	Moraxellaceae	Plasma	Bak11W/Bak
25	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Soro	Taf/Tar
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Plasma	Taf/Tar
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Soro	Bak11W/Bak
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Plasma	Bak11W/Bak
28	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Ralstonia</i> sp.	Soro	Bak11W/Bak
38	Negativo	<i>Escherichia coli</i>	BC	Taf/Tar
42	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>	Soro	Taf/Tar
		<i>Ralstonia pickettii</i>	Plasma	Taf/Tar
50	Negativo	Enterobacteriaceae	Plasma	Taf/Tar
51	Negativo	<i>Enterococcus</i> sp.	Soro	Taf/Tar
		Oxalobacteriaceae	Plasma	Bak11W/Bak
60	Negativo	Enterobacteriaceae	Plasma	Taf/Tar
61	Negativo	<i>Escherichia coli</i>	Soro	Taf/Tar
64	Negativo	<i>Pseudomonas</i> sp.	Soro	Taf/Tar
69	Negativo	<i>Staphylococcus</i> sp.	Soro	Taf/Tar

BC: *buffy-coat*

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo avaliamos o uso da PCR de largo espectro no diagnóstico etiológico de pacientes com sepse, admitidos em uma unidade de emergência de um hospital público terciário do interior do estado de São Paulo. A PCR apresentou melhor sensibilidade do que a hemocultura, especialmente quando dois pares de *primers* foram utilizados, e foi capaz de identificar patógenos não usualmente isolados na hemocultura. Além disso, nenhuma característica clínica influenciou sua positividade.

Estudos clínicos na população de pacientes sépticos são abundantes, a maioria com intuito epidemiológico ou na investigação de novas condutas, abordagens terapêuticas e medicamentos para o seu tratamento (16). O diagnóstico etiológico da sepse historicamente é feito pela cultura do sangue, e mesmo com o crescente uso da biologia molecular em laboratórios clínicos, poucos estudos brasileiros avaliaram métodos moleculares no diagnóstico de infecções bacterianas.

5.1 Características dos pacientes

Aproximadamente 50% dos pacientes tiveram sepse grave e os demais, choque séptico. A média da mortalidade foi 51%, o que reforça que, em comparação com países desenvolvidos como EUA e Austrália, ainda são necessárias muitas medidas e estudos para reduzir a mortalidade para patamares aceitáveis (31). No entanto, a taxa de mortalidade foi menor do que a avaliada para o Brasil no estudo mundial publicado em 2009, PROGRESS (67,4%) (31), e muito semelhante a do estudo multicêntrico brasileiro COSTS para hospitais públicos (49,1%) (32). Uma possível razão para a alta taxa de mortalidade brasileira, comparada com outros países, seria uma maior gravidade de nossos pacientes, assim que são admitidos no hospital, menor número de leitos disponíveis em UTIs, menor acesso ao serviço de saúde e/ou demora para chegar em um hospital de referência.

Pacientes com choque séptico tiveram maiores valores de APACHE II e SOFA, e maior mortalidade em relação aos pacientes com sepse grave (risco relativo 2,6). Embora isso seja esperado, também comprova a acurácia na classificação da sepse pelos clínicos. Os valores dos escores APACHE II e SOFA foram semelhantes aos dos estudos brasileiros BASES e COSTS (21,0 vs 19,0 vs 22,3, para APACHE II e 8,1 vs 6,0 vs 7,5 para SOFA, respectivamente) (29, 32).

Em nosso estudo, a média de idade dos pacientes com sepse foi 55 anos, um pouco menor que a média de aproximadamente 64 anos, relatada em estudos prévios (23, 29, 32). Apesar disso, houve uma associação entre a idade do paciente e a mortalidade, concordante com estudos anteriores (20, 59), e que pode ser explicado pela maior fragilidade, presença de comorbidades e/ou alterações imunes dos pacientes idosos (59, 60).

Adicionalmente, pacientes mais velhos tiveram maior positividade na hemocultura. Isso pode ser explicado por alterações do sistema imune de pacientes idosos, tornando a carga bacteriana maior nesses pacientes, portanto, mais detectável na hemocultura; ou ainda, diferenças nos tipos de microrganismos ou locais de infecção primária nesses pacientes, em relação a pacientes mais jovens (61). Além disso, pacientes com hemocultura positiva apresentaram valores mais altos de CRP, demonstrando que pode haver uma associação entre o grau de inflamação e a presença de microrganismos cultiváveis.

Quanto aos sítios primários de infecção, a grande maioria dos pacientes foi diagnosticada com infecção no trato respiratório (66%), condizendo com as estimativas de que infecções pulmonares são a principal causa de sepse (16, 27). Esse número é semelhante aos estudos brasileiros prévios de 65,6% (29) e 53,5% (32), porém maior que estudos estrangeiros (20, 21, 33, 62), nos quais infecções respiratórias corresponderam a no mínimo 28,4% e no máximo 47% como sítio primário. Isso sugere que infecções pulmonares no Brasil são, em geral, mais frequentes ou evoluem à sepse com mais frequência do que em outros países.

5.2 PCR de largo espectro em amostras clínicas

O uso da PCR de largo espectro para amplificação de bactérias vem sendo testado por muitos anos. Em 1995, McCabe *et al.* conseguiram amplificar 12 espécies diferentes de bactérias provenientes de cultura microbiológica, sem amplificação de ácidos nucleicos humanos (63).

A PCR de largo espectro realizada diretamente em espécimes clínicos também já foi realizada por pesquisadores. Bispo *et al.* usaram a PCR de largo espectro em tempo real em amostras de humor aquoso de pacientes com comprovada infecção intraocular, obtendo uma positividade de 95,2% (64).

Goldenberger *et al.*, em 1996, usaram os *primers* Bak11W/Bak2, acrescido de uma reamplificação em *nested* PCR, para detectar infecções por *Bartonella spp.*, bactérias nem sempre isoladas em meios de cultura, por serem facultativamente intracelulares (65). O mesmo grupo, no ano seguinte, realizou a identificação de agentes causadores de endocardite diretamente de válvulas cardíacas, através da PCR de largo espectro seguida do sequenciamento (53).

Mohammadi *et al.* utilizaram os *primers* Taf/Tar para avaliar a presença de contaminantes em concentrado de plaquetas para transfusão. O resultado foi 100% concordante com o método de cultura, tanto em sensibilidade quanto em especificidade, porém, eles não realizaram o sequenciamento das amostras positivas por PCR, para identificação bacteriana (66). Nadkarni *et al.* utilizaram os *primers* Taf/Tar na amplificação de DNA de bactérias anaeróbicas encontradas em dentinas cariadas para quantificar a carga microbiana por PCR de largo espectro em tempo real. Eles verificaram que a PCR tem a mesma eficiência em todas as espécies bacterianas testadas, e na comparação com os métodos de cultura, chegaram a uma valor de carga bacteriana em média 40 vezes mais alto pelo método molecular do que na contagem de colônias (39).

Dessa maneira, podemos perceber que ambos os pares de *primers* escolhidos para nosso estudo têm sua eficiência comprovada em amplificar bactérias de diversos espécimes clínicos. Através do presente estudo, pudemos testar sua eficiência também em soro, plasma e *buffy-coat* de pacientes com sepse.

5.3 PCR de largo espectro na sepse e a identificação dos microrganismos

A PCR de largo espectro já foi avaliada na sepse neonatal. Jordan *et al.* utilizaram a PCR convencional de largo espectro para avaliar a presença de bactérias em sangue de 1.233 recém nascidos. O método demonstrou uma excelente especificidade (97,5%) e valor preditivo negativo (99,2%), mas valores baixos de sensibilidade (41,2%) e valor preditivo positivo (18,9%), quando estabelecida a hemocultura como padrão ouro (67). O mesmo foi feito por Draz *et al.* em 50 neonatos, que obtiveram sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 71,4%, 31,8%, 57,1% e 46,7%, respectivamente (68). Apesar de nosso estudo utilizar a confirmação clínica como padrão ouro, nossa sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo

(59%, 100%, 100%, 32%, respectivamente), são comparáveis ou até superiores aos obtidos por esses estudos. Essa discrepância, entretanto, pode ser explicada pela diferente população estudada, já que avaliamos o diagnóstico de sepse na população adulta.

Quando se trata da sepse em adultos, foram encontrados alguns estudos que utilizam a PCR de largo espectro como teste diagnóstico. Porém, as estratégias utilizadas para identificação dos microrganismos amplificados, na maioria das vezes, foram diferentes do sequenciamento direto dos *amplicons*. Além disso, muitos estudos utilizam a PCR em tempo real ao invés da PCR convencional, assim como apenas uma fração do sangue, como o soro ou sangue total. Em nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro a avaliar o diagnóstico de sepse em adultos, pelo uso da PCR de largo espectro convencional seguida do sequenciamento de *amplicons* para identificação bacteriana.

Jordana-Lluch *et al.* utilizaram a PCR de largo espectro em tempo real, seguida de espectroscopia de massa, para identificação dos patógenos no sangue de 175 pacientes com suspeita de sepse. A concordância do método molecular com a hemocultura foi de 72,1% ($\kappa=0,316$), maior que a concordância obtida em nosso estudo ($\kappa=0,147$). Os valores de sensibilidade, especificidade, valor predito positivo e valor preditivo negativo do método foram 50%, 93,8%, 78,7% e 80,4%, respectivamente (45). Kaleta *et al.* já haviam proposto a utilização desse método para identificar patógenos sanguíneos, com uma concordância de 96,6% com a espécie (46). Porém, apenas amostras retiradas de frascos de hemocultura positivos foram avaliadas nesse estudo.

5.4 Sensibilidade da PCR de largo espectro

Em nosso estudo, a sensibilidade da hemocultura foi 30% vs 59% da PCR de largo espectro. Mesmo considerando separadamente os dois pares de *primers*, obtivemos sensibilidades mais altas que a da hemocultura (39% para Taf/Tar e 34% para Bak11W/Bak2), porém sem diferença estatisticamente significativa.

É importante ressaltar que oito pacientes tiveram a hemocultura positiva e PCR negativa. A negatividade da PCR nessas amostras pode ter sido devido a falhas na extração do DNA bacteriano, presença de inibidores da PCR, ou pela quantidade menor de sangue utilizado, em comparação com a hemocultura, fator que caracteriza uma das limitações da PCR de largo espectro.

Em relação às falhas na extração do DNA bacteriano, pode ter sido purificada uma quantidade muito pequena que não pôde ser amplificada suficientemente. Para solucionar essa limitação, seria possível realizar tratamentos enzimáticos mais prolongados, adição de substâncias químicas adjuvantes da lise celular bacteriana, congelamento, fervura, entre outros, que aumentam significativamente o rendimento na extração do DNA de bactérias, especialmente Gram-positivas (54). Porém, esses acréscimos tornam o processo mais demorado e não prático. Dessa maneira, nossa opção de utilizar um kit comercial disponível para extração do DNA pode ter influenciado em alguns resultados falso negativos.

Em contrapartida, 29 amostras foram positivas para a PCR de largo espectro, mesmo com a hemocultura negativa, o que reforça nossa hipótese de que a PCR possui uma maior sensibilidade no diagnóstico de infecções bacterianas. Isso pode ser devido ao uso prévio de antibiótico, já que muitos pacientes internados com suspeita de sepse já tinham recebido tratamento antimicrobiano (resultados não mostrados). Outros autores também destacaram a importância da PCR de largo espectro particularmente em pacientes recebendo tratamento antibiótico (69).

No entanto, não há como descartar a possibilidade de resultados falso positivos da PCR de largo espectro, devido a contaminação da amostra ou reagentes, ou translocação bacteriana.

Nikkari *et al.* analisaram amostras de quatro indivíduos saudáveis frente a controles positivos (DNA de *E. coli*) e controles negativos (água em tubos para coleta de sangue), utilizando a PCR de largo espectro em tempo real, e concluíram que o sangue humano pode conter bactérias, provenientes do sangue ou da pele, no momento da coleta, ou ambos (70). Também há evidências de que sequências correspondentes a organismos semelhantes ao gênero *Pseudomonas* sejam na verdade contaminantes de Taq polimerases utilizadas nas reações (70).

Uma maneira de definir os resultados obtidos como patógenos ou contaminantes seria a obtenção de amostras sucessivas do mesmo paciente, e a consideração de todas elas na interpretação dos resultados (49). Devido ao delineamento do nosso estudo, isso não foi possível, por esse motivo, comparamos nossos resultados somente com a hemocultura, e com os dados clínicos dos pacientes.

A maior limitação encontrada nesse estudo foi a obtenção de reações inteiramente livres de contaminações. Por diversas vezes foram testados os reagentes utilizados, sem

adição de DNA de amostra, obtendo-se resultados positivos, o que demonstra a baixa pureza dos reagentes utilizados. Sabe-se que a PCR de largo espectro é mais passível de contaminação do que a PCR espécie-específica. Vários autores colocam a contaminação como um fundamental problema na execução dessa técnica (39, 64, 65, 71). Embora muitas abordagens estudadas recentemente terem se mostrado capazes de superar esse problema (tratamento com DNase e /ou endonuclease de restrição, radiação UV, etc), elas também diminuem a sensibilidade da técnica (44, 70, 72). Mais uma vez, a opção por uma técnica mais prática, capaz de ser realizada numa rotina laboratorial, pode ter restringido a capacidade da PCR de largo espectro de determinar amostras positivas de pacientes sem contaminação externa.

5.5 Sensibilidade dos *primers* Bak11W/Bak2 e Taf/Tar

Em nosso estudo, o par de *primers* Taf/Tar teve uma maior sensibilidade do que o par Bak11W/Bak2 (38% vs 34%). Zucol *et al.* também compararam os resultados da amplificação do DNA de bactérias para os *primers* Bak11W/Bak2 e Taf/Tar em 2006 (54). Porém, ao contrário da nossa avaliação, realizada em PCR convencional, eles utilizaram a PCR em tempo real, além de amplificar somente DNA de bactérias, de quantidade conhecida, inoculadas ao sangue de um indivíduo saudável. Diferente de nossos resultados, foi observado que o par de *primers* Bak11W/Bak2 foi mais sensível do que o par Taf/Tar.

Essa discrepância entre os nossos resultados e os de Zucol *et al.* pode ser explicada pelos ajustes que foram feitos na configuração da PCR para os *primers* Bak11W/Bak2, aumentando a sua especificidade e reduzindo, consequentemente, a sensibilidade na detecção de amostras positivas. Isso aconteceu pelo fato desse par de *primers* apresentar maior probabilidade de contaminação em controles negativos (resultados não mostrados). Essa estratégia também foi utilizada por Nadkarni *et al.*, que determinaram uma diminuição na faixa de sensibilidade da PCR de largo espectro em tempo real, a fim de se eliminar resultados falso-positivos em C_T altos, comprovadamente provenientes de DNA bacteriano presente nos reagentes utilizados (39).

A concordância entre a positividade da PCR para cada um dos pares de *primers* estudados foi baixa, somente 10 pacientes (13%) tiveram PCR positiva para ambos. Apesar da pesquisa por possíveis explicações para esse fato, não foi encontrado nenhum estudo que

sugerisse uma diferença de positividade entre os dois pares de *primers* no sangue de pacientes. Nossa suspeita é de que existe uma diferença na afinidade dos *primers* por bactérias Gram-positivas/Gram-negativas, ou pelo local em que há maior probabilidade de encontrá-las, ou seja, livres no soro/plasma, ou imersa nos leucócitos da fração *buffy-coat*. Afinal, podemos perceber uma maior positividade para os *primers* Bak11W/Bak2 nas amostras de *buffy-coat* do que nas frações soro e plasma (14 vs 8 vs 8, respectivamente). O inverso ocorre com os *primers* Taf/Tar (6 vs 18 vs 14). Mais estudos são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesse processo.

5.6 Identificação das bactérias por sequenciamento

Em 16 pacientes, foi possível realizar o sequenciamento, sendo que as bactérias mais encontradas foram: *E. coli* (3); *Staphylococcus sp.* (2); *Enterococcus sp.* (2); e *Ralstonia sp.* (2). Apenas quatro deste pacientes tiveram hemocultura positiva e desses, dois resultados foram concordantes (*E. coli* e *S. pneumoniae*).

Por outro lado, várias amostras de pacientes tiveram amplificação de mais de uma sequência de DNA, por isso a correta identificação da bactéria através do sequenciamento não foi possível em todas as amostras positivas para PCR. Casos semelhantes ocorreram com estudos anteriores (64, 73). Isso pode ter ocorrido em decorrência de uma infecção polimicrobiana, sem predomínio de nenhum microrganismo, ou porque houve contaminação da amostra em algum momento (coleta, extração do DNA ou processamento da PCR) (49). Uma alternativa para identificação dos microrganismos em infecções polimicrobianas seria a clonagem das amostras e o sequenciamento dos *amplicons* separadamente (55). Porém, esse procedimento demanda tempo e custos mais elevados, tornando-se inviável, nesse momento, para nosso estudo.

Em relação a interpretação do sequenciamento, alguns estudos utilizam uma similaridade genética com o banco de dados $\geq 99\%$ para identificação da bactéria encontrada, como espécie (74, 75). Porém, esses estudos utilizam como amostra o DNA extraído diretamente da colônia bacteriana, mais pura e em maior quantidade do que o DNA extraído do sangue dos pacientes. Por esse motivo, optamos por uma similaridade $\geq 97\%$ na identificação da espécie, como a empregada por Wang *et al.* para identificação dos patógenos presentes em sangue e cordão umbilical de neonatos, causadores de sepse

neonatal. Além disso, o estabelecimento de valores de similaridade para identificação de espécies é uma decisão arbitrária e, mais que um número absoluto, deve ser levado em consideração o bom senso na interpretação dos resultados obtidos. Mesmo porque, as similaridades interespecies variam de acordo com o gênero e família da bactéria em questão, sendo quase impossível estabelecer um único valor para definição das identidades bacterianas de uma maneira geral (35).

A maioria das bactérias sequenciadas da PCR, que tiveram hemocultura negativa, são microrganismos associados a infecções, como *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *E. coli*, e *Pseudomonas sp.*.

Cocos Gram-positivos como *Enterococcus sp.* e *Staphylococcus sp.* são espécies associadas a infecções hospitalares e pós cirúrgicas (76). São preocupantes principalmente quando associadas à resistência dos antimicrobianos comumente usados no seu tratamento, como os *Enterococcus* Vancomicina Resistente (VRE) (77, 78) e *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA). Espécies de *Staphylococcus* podem ser da microbiota normal da pele, especialmente quando são do grupo coagulase negativa. Porém, mesmo essas espécies têm papel infeccioso na sepse, por se tratar de um estado de maior fragilidade do sistema imune.

Corynebacterium sp. são bacilos Gram-positivos, que podem tanto pertencer à microbiota normal da pele, como ser responsáveis por graves infecções respiratórias (espécies toxigênicas de *C. diphtheriae*). Além disso, são comumente encontrados em infecções relacionadas ao uso de cateter (79, 80), e endocardite (81). Uma vez na corrente sanguínea, podem ser capazes de provocar a sepse (82). *E. coli* é a espécie mais encontrada em infecções sanguíneas com hemocultura positiva (83). Sem dúvida, é também a bactéria mais estudada, desde o início do século passado até os dias de hoje. Sua invasão até a corrente sanguínea geralmente tem origem no trato urinário ou digestivo, embora possa ocorrer a bacteremia primária, sem nenhuma outra fonte aparente de infecção.

Pseudomonas spp. são um grupo de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose, muito associado a infecções sistêmicas. *P. aeruginosa*, *P. putida* e *P. fulva* são as espécies mais comumente isoladas de amostras clínicas (84), e geralmente são colonizadoras de dispositivos como cateteres, entrando facilmente na corrente sanguínea e podendo provocar a sepse em pacientes hospitalizados. São clinicamente preocupantes pois possuem uma alta capacidade de resistência a antibióticos. Além de possuírem uma expressão

constitutiva de genes codificadores de β -lactamases e bombas de efluxo, têm uma membrana externa com baixa permeabilidade a antimicrobianos como carbapenêmicos (85).

Em quatro amostras as bactérias foram identificadas apenas como Família (Enterobacteriaceae – 2; Moraxellaceae – 1; e Oxalobacteriaceae – 1). É sabido que a diferenciação genotípica entre bactérias da Família Enterobacteriaceae é em geral difícil, em virtude da ampla homologia em suas sequências de bases (35). O mesmo acontece com as espécies do gênero *Staphylococcus*, no qual a média da discrepância no gene 16S rRNA entre as 35 espécies publicadas é de apenas 2,4% (35, 67).

Bactérias *Ralstonia* spp. também foram encontradas em cultura negativa/PCR positiva de espécimes clínicos considerados estéreis, por Rampini *et al.*, que classificaram-nas como contaminantes, juntamente com *Burkholderia* spp. e *Acinetobacter* spp. (69).

Ralstonia pickettii é uma bactéria oportunista, presente em ambientes úmidos, e raramente relacionada a infecções de pacientes imunocomprometidos. Pertenceu ao gênero *Pseudomonas*, sendo depois realocada para o gênero *Burkholderia* e, posteriormente, transferida para um novo gênero, *Ralstonia*. Embora tenham sido relatados casos de infecções sanguíneas e sepses, comprovadamente devido a essa espécie, em várias regiões do mundo (Rio de Janeiro, Itália, Bulgária, Califórnia) (86-91), há uma alta probabilidade de que o achado dessa bactéria em PCR seja contaminação. Afinal, em todos os casos citados acima, os autores definiram a fonte de infecção nos pacientes como sendo fluidos de aplicação intravenosa, água de injeção, sistema de hemodiálise, ou outros materiais associados à água. Consequentemente, se essas bactérias não foram detectadas na hemocultura dos pacientes em nosso estudo, a maior chance é que elas sejam provenientes dos reagentes utilizados em nosso laboratório, seja na extração, realização da PCR, purificação ou sequenciamento.

Outra explicação para o achado de *Ralstonia* em amostras de pacientes que tiveram a hemocultura positiva por outras bactérias (*S. hominis* e *S. pyogenes*) seria a maior quantidade desta, em relação às outras. Assim, mesmo que houvesse DNA de mais de um microrganismo, o sequenciamento detectou o DNA predominante na amostra amplificada.

Outros estudos utilizando a PCR de largo espectro em amostras clínicas detectaram a presença de bactérias não usuais (50, 69), ou não comumente relacionadas a doenças nos seres humanos, como as bactérias da família Moraxellaceae e Oxalobacteriaceae. Isso reflete o paradigma da PCR de largo espectro como instrumento diagnóstico, já que essa

técnica permite a identificação de organismos de patogenicidade desconhecida ou questionável, levando o clínico a decidir sobre o tratamento em uma ação conjunta com observações clínicas e semiológicas dos pacientes em questão.

Finalmente, deve-se também ser levado em consideração que a formação de bancos de dados de depósito livre, como o GenBank, nem sempre é favorável ao pesquisador na identificação de bactérias pelo gene 16S rRNA. Isso porque muitas sequências idênticas foram depositadas mais de uma vez, por diferentes pessoas, de diversos países, muitas vezes, com taxonomia também desigual (35). Por esse motivo, optamos por uma pesquisa em três bancos de dados online, considerando a identificação mais apropriada de acordo com todos os resultados encontrados.

5.7 Considerações finais

Podemos inferir dos resultados da hemocultura e PCR de largo espectro em nosso estudo, que o uso da biologia molecular como adjuvante no diagnóstico etiológico de sepse é extremamente favorável. Mesmo que a PCR de largo espectro por si só não tenha detectado todas as infecções, ela ainda conseguiu detectar a presença de bactérias em amostras em que a hemocultura foi negativa. Isso porque algumas limitações da hemocultura, como impossibilidade de detectar organismos não cultiváveis, a necessidade de um grande volume de amostra, e resultados falso negativos devido ao uso prévio de antibióticos ou à presença de microrganismos fastidiosos, podem ser superadas com a PCR de largo espectro.

A escolha de dois pares de *primers* diferentes na PCR de largo espectro, bem como o uso de três frações do sangue dos pacientes (soro, plasma e *buffy-coat*), contribuíram para uma maior sensibilidade da técnica. Analisando os resultados, não há como determinar se um só par de *primers* e/ou uma só fração do sangue possam ser usados para um resultado confiável. Fatores do hospedeiro, da bactéria envolvida e da reação utilizada podem ter tido influência na heterogeneidade dos resultados.

Algumas das limitações encontradas nesse trabalho seriam a grande probabilidade de contaminação do material; a impossibilidade de se realizar um antibiograma na mesma reação; o custo relativamente elevado; e a necessidade de pessoal especializado. Porém, o ininterrupto avanço na ciência e a constante busca por aprimoramento profissional devem

levar a uma melhor eficiência e automação dos processos laboratoriais, diminuindo a possibilidade de reações contaminadas e reduzindo custos.

Além disso, embora a PCR de largo espectro tenha a limitação de não fornecer resultado de antibiograma no mesmo ensaio, ela certamente fornece informações importantes aos clínicos na escolha do antibiótico a ser utilizado, acelerando o grau de substituição de drogas de amplo espectro por drogas mais específicas e com menos efeitos adversos. O tratamento com o antibiótico correto é imprescindível na recuperação do paciente, ao mesmo tempo em que a necessidade de se evitar o aparecimento de resistências aos antimicrobianos se torna cada vez mais essencial.

Embora exista a possibilidade de contaminação de algumas amostras, e principalmente de reagentes, o fato de a sepse ser uma doença grave, que compromete todo o organismo e altera as funções imunológicas e inflamatórias, faz com que até mesmo bactérias comensais possam se tornar patógenos importantes. Considerando que, em nosso estudo, a coleta foi realizada por profissionais especializados da Unidade de Pesquisa Clínica da UE-HCFMRP, ou seja, teoricamente asséptica, é possível que todos os agentes identificados possam ter sido os agentes causais da sepse.

Levando em consideração o fato de que a hemocultura pode demorar até 7 dias para detectar crescimento microbiano, e pelo menos 48h adicionais para a identificação do patógeno; e a PCR de largo espectro seguida de sequenciamento pode ser realizada dentro de até 48 horas, ponderamos que a técnica em questão oferece um substancial avanço no diagnóstico etiológico dos pacientes com sepse.

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que a PCR de largo espectro, com a utilização de kits comerciais disponíveis, foi mais sensível e, potencialmente, mais rápida do que a hemocultura na identificação bacteriana em pacientes com sepse atendidos em um Hospital de Emergência.

A realização da PCR de largo espectro com dois diferentes pares de *primers* e três diferentes frações do sangue dos pacientes auxiliou na detecção de patógenos e não sofreu influência de características clínicas e demográficas. Adicionalmente, foi possível identificar bactérias não usualmente isoladas na hemocultura.

Portanto, a PCR de largo espectro apresenta um papel adjuvante à hemocultura no diagnóstico etiológico da sepse.

REFERÊNCIAS

1. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med.* 2006;32(12):2077.
2. Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P. Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2013;43(10):260-3.
3. Bone RC. Why new definitions of sepsis and organ failure are needed. *Am J Med.* 1993;95(4):348-50.
4. Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* 1989;17(5):389-93.
5. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20(6):864-74.
6. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992;101(6):1644-55.
7. Poeze M, Ramsay G, Gerlach H, Rubulotta F, Levy M. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Crit Care.* 2004;8(6):R409-13.
8. Vincent JL. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you.. *Crit Care Med.* 1997;25(2):372-4.
9. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk HC. Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. *Arch Surg.* 1980;115(2):136-40.
10. Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg.* 1973;178(2):117-22.
11. Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, Moran GJ, Abraham E, Trzeciak S, et al. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med.* 2006;48(1):28-54.
12. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6.
13. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA.* 2001;286(14):1754-8.
14. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med.* 1995;23(10):1638-52.
15. Vincent J-L, Abraham E. The Last 100 Years of Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2006;173(3):256-63.

16. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-51.
17. Celes MR, Prado CM, Rossi MA. Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology*. 2013;80(2):70-86.
18. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-50.
19. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546-54.
20. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1303-10.
21. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007;35(5):1244-50.
22. Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*. 2010;376(9749):1339-46.
23. van Gestel A, Bakker J, Veraart CP, van Hout BA. Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. *Crit Care*. 2004;8(4):R153-62.
24. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012;40(3):754-61.
25. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(12):919-24.
26. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006;34(2):344-53.
27. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med*. 1998;26(12):2078-86.
28. Bone RC, Balk RA, Fein AM, Perl TM, Wenzel RP, Reines HD, et al. A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to endotoxin: results of a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. The E5 Sepsis Study Group. *Crit Care Med*. 1995;23(6):994-1006.
29. Silva E, Pedro MeA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004;8(4):R251-60.
30. Linde-Zwirble WT, Angus DC. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit Care*. 2004;8(4):222-6.
31. Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, Dobb G, Levy M, Martin G, et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection*. 2009;37(3):222-32.

32. Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(5):425-34.
33. MacArthur RD, Miller M, Albertson T, Panacek E, Johnson D, Teoh L, et al. Adequacy of early empiric antibiotic treatment and survival in severe sepsis: experience from the MONARCS trial. *Clin Infect Dis*. 2004;38(2):284-8.
34. Ferrer R, Artigas A, Suarez D, Palencia E, Levy MM, Arenzana A, et al. Effectiveness of treatments for severe sepsis: a prospective, multicenter, observational study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(9):861-6.
35. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4):840-62, table of contents.
36. Sussman JJ, Baron EJ, Tenenbaum MJ, Kaplan MH, Greenspan J, Facklam RR, et al. Viridans streptococcal endocarditis: clinical, microbiological, and echocardiographic correlations. *J Infect Dis*. 1986;154(4):597-603.
37. Brun-Buisson C, Fartoukh M, Lechapt E, Honoré S, Zahar JR, Cerf C, et al. Contribution of blinded, protected quantitative specimens to the diagnostic and therapeutic management of ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2005;128(2):533-44.
38. Zadroga R, Williams DN, Gottschall R, Hanson K, Nordberg V, Deike M, et al. Comparison of 2 blood culture media shows significant differences in bacterial recovery for patients on antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. 2013;56(6):790-7.
39. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002;148(Pt 1):257-66.
40. Yang S, Lin S, Kelen GD, Quinn TC, Dick JD, Gaydos CA, et al. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3449-54.
41. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
42. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Ortiz-Leyba C. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Crit Care Med*. 2003;31(12):2742-51.
43. NCCLS. Molecular diagnostic methods for infectious diseases. Approved guideline. Wayne, Pa. EUA: NCCLS; 1999.
44. Millar BC, Xu J, Moore JE. Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology. *J Clin Microbiol*. 2002;40(5):1575-80.
45. Jordana-Lluch E, Carolan HE, Giménez M, Sampath R, Ecker DJ, Quesada MD, et al. Rapid diagnosis of bloodstream infections with PCR followed by mass spectrometry. *PLoS One*. 2013;8(4):e62108.

46. Kaleta EJ, Clark AE, Johnson DR, Gamage DC, Wysocki VH, Cherkaoui A, et al. Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):345-53.
47. Palka-Santini M, Cleven BE, Eichinger L, Krönke M, Krut O. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiol*. 2009;9:1.
48. Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1990;28(9):1942-6.
49. Sontakke S, Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*. 2009;76(3):217-25.
50. Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):1018-28.
51. Santos JS, Scarpelini S, Brasileiro SLL, Ferraz CA, Dallora MELV, Sá MFS. Avaliação do modelo de organização da Unidade de Emergência do HCFMRP-USP, adotando, como referência, as políticas nacionais de atenção. 2003. 2003;36(2/4).
52. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1988;16(3):128-40.
53. Goldenberger D, Künzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol*. 1997;35(11):2733-9.
54. Zucol F, Ammann RA, Berger C, Aebi C, Altwegg M, Niggli FK, et al. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2750-9.
55. Wang X, Buhimschi CS, Temoïn S, Bhandari V, Han YW, Buhimschi IA. Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56131.
56. Jones SR, Carley S, Harrison M. An introduction to power and sample size estimation. *Emerg Med J*. 2003;20(5):453-8.
57. BRASIL MDSD. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos: Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Ministério da Saúde Fundação Osvaldo Cruz Rio de Janeiro; 1998.
58. Doellner H, Arntzen KJ, Haereid PE, Aag S, Austgulen R. Interleukin-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis. *J Pediatr*. 1998;132(2):295-9.
59. Green JE, Ariathianto Y, Wong SM, Aboltins C, Lim K. Clinical and inflammatory response to bloodstream infections in octogenarians. *BMC Geriatr*. 2014;14(1):55.
60. Starr ME, Saito H. Sepsis in Old Age: Review of Human and Animal Studies. *Aging Dis*. 2014;5(2):126-36.

61. Girard TD, Ely EW. Bacteremia and Sepsis in Older Adults. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2007;23(3).
62. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1997;336(13):912-8.
63. McCabe KM, Khan G, Zhang YH, Mason EO, McCabe ER. Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences: automated analysis and potential for molecular triage of sepsis. *Pediatrics*. 1995;95(2):165-9.
64. Bispo PJ, de Melo GB, Hofling-Lima AL, Pignatari AC. Detection and gram discrimination of bacterial pathogens from aqueous and vitreous humor using real-time PCR assays. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(2):873-81.
65. Goldenberger D, Schmidheini T, Altwegg M. Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* by a simple and rapid procedure using broad-range PCR amplification and direct single-strand sequencing of part of the 16S rRNA gene. *Clin Microbiol Infect*. 1997;3(2):240-5.
66. Mohammadi T, Pietersz RN, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH, Reesink HW. Detection of bacteria in platelet concentrates: comparison of broad-range real-time 16S rDNA polymerase chain reaction and automated culturing. *Transfusion*. 2005;45(5):731-6.
67. Jordan JA, Durso MB, Butchko AR, Jones JG, Brozanski BS. Evaluating the near-term infant for early onset sepsis: progress and challenges to consider with 16S rDNA polymerase chain reaction testing. *J Mol Diagn*. 2006;8(3):357-63.
68. Draz NI, Taha SE, Abou Shady NM, Abdel Ghany YS. Comparison of broad range 16S rDNA PCR to conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2013;14(4):403-11.
69. Rampini SK, Bloemberg GV, Keller PM, Büchler AC, Dollenmaier G, Speck RF, et al. Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2011;53(12):1245-51.
70. Nikkari S, McLaughlin IJ, Bi W, Dodge DE, Relman DA. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1956-9.
71. Ecker DJ, Sampath R, Li H, Massire C, Matthews HE, Toleno D, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(4):399-415.
72. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(10):3741-51.
73. Valle Jr DL, Andrade JI, Cabrera EC, Rivera WL. Evaluation of buffy coat 16S rRNA PCR, buffy coat culture and whole blood PCR for detection of bacteraemia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(2):117-22.
74. Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, Böttger EC, Altwegg M. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4134-40.

75. Simmon KE, Croft AC, Petti CA. Application of SmartGene IDNS software to partial 16S rRNA gene sequences for a diverse group of bacteria in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4400-6.
76. Giacometti A, Cirioni O, Schimizzi AM, Del Prete MS, Barchiesi F, D'Errico MM, et al. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):918-22.
77. Dahms RA, Johnson EM, Statz CL, Lee JT, Dunn DL, Beilman GJ. Third-generation cephalosporins and vancomycin as risk factors for postoperative vancomycin-resistant enterococcus infection. *Arch Surg.* 1998;133(12):1343-6.
78. de Bruin MA, Riley LW. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant enterococcus infection and colonization in hospitals? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2007;7:24.
79. Wojewoda CM, Koval CE, Wilson DA, Chakos MH, Harrington SM. Bloodstream infection caused by nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in an immunocompromised host in the United States. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2170-2.
80. Chen FL, Hsueh PR, Teng SO, Ou TY, Lee WS. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection. *J Microbiol Immunol Infect.* 2012;45(3):255-8.
81. Savini V, Gherardi G, Favaro M, Fontana C, Marrollo R, Argentieri AV, et al. About a bloodstream *Corynebacterium striatum* isolate. *Folia Microbiol (Praha).* 2013;58(6):451-3.
82. Sbaai M, Ben Lahlou Y, Ghazouani M, Houba A, Frikh M, Elouennass M. [Human septicemia caused by *Corynebacterium bovis*: a case report and review of the literature]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2011;69(6):732-4.
83. Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JD. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(11):1041-7.
84. Liu Y, Liu K, Yu X, Li B, Cao B. Identification and control of a *Pseudomonas* spp (*P. fulva* and *P. putida*) bloodstream infection outbreak in a teaching hospital in Beijing, China. *Int J Infect Dis.* 2014;23:105-8.
85. Dortet L, Boulanger A, Poirel L, Nordmann P. Bloodstream infections caused by *Pseudomonas* spp.: how to detect carbapenemase producers directly from blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2014;52(4):1269-73.
86. Mikulska M, Durando P, Pia Molinari M, Alberti M, Del Bono V, Dominietto A, et al. Outbreak of *Ralstonia pickettii* bacteraemia in patients with haematological malignancies and haematopoietic stem cell transplant recipients. *J Hosp Infect.* 2009;72(2):187-8.
87. Moreira BM, Leobons MB, Pellegrino FL, Santos M, Teixeira LM, de Andrade Marques E, et al. *Ralstonia pickettii* and *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infections related to infusion of contaminated water for injection. *J Hosp Infect.* 2005;60(1):51-5.
88. Pellegrino FL, Schirmer M, Velasco E, de Faria LM, Santos KR, Moreira BM. *Ralstonia pickettii* bloodstream infections at a Brazilian cancer institution. *Curr Microbiol.* 2008;56(3):219-23.

89. Kimura AC, Calvet H, Higa JI, Pitt H, Frank C, Padilla G, et al. Outbreak of *Ralstonia pickettii* bacteremia in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(12):1099-103.
90. Vitaliti SM, Maggio MC, Cipolla D, Corsello G, Mammina C. Neonatal sepsis caused by *Ralstonia pickettii*. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(3):283.
91. Strateva T, Kostyanev T, Setchanova L. *Ralstonia pickettii* sepsis in a hemodialysis patient from Bulgaria. *Braz J Infect Dis*. 16. Brazil2012. p. 400-1.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Formulário de acompanhamento dos pacientes incluídos no estudo (continua)

Unidade de Emergência – HCRP-FMRP-USP

Projeto de Pesquisa: O papel da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico etiológico de sepse

Questionário nº ____

1. DADOS GERAIS

Nome do paciente: _____

Contato do paciente: _____

2. INTERNAÇÃO

Admissão: ____/____/____

Diagnóstico de Internação: _____

Uso prévio de antibiótico

Não: ☐ Sim: ☐ Quais/doses/duração: _____

APACHE: _____

SAPS: _____

3. ANTECEDENTES

DM	☐	Sim	☐	Não	IRC	☐	Sim	☐	Não
Dislipidemia	☐	Sim	☐	Não	DPOC	☐	Sim	☐	Não
Tabagismo	☐	Sim	☐	Não	ICC	☐	Sim	☐	Não
Etilismo	☐	Sim	☐	Não	AVC	☐	Sim	☐	Não
Cirrose	☐	Sim	☐	Não	Trauma	☐	Sim	☐	Não
Câncer	☐	Sim	☐	Não	Queimado	☐	Sim	☐	Não
Asma	☐	Sim	☐	Não	OUTROS	_____			

APÊNDICE A – Formulário de acompanhamento dos pacientes incluídos no estudo
(continuação)

4. DISPOSITIVOS

Cateter Venoso Central	☐ Sim	☐ Não
Sonda Vesical de Demora	☐ Sim	☐ Não
Tubo Endotraqueal	☐ Sim	☐ Não
PAI	☐ Sim	☐ Não
Outros _____		

5. EXAMES SOLICITADOS

	Admissão		Admissão
Urina rotina		TGO	
Cor		TGP	
Aspecto		TP	
GLI		TTPA	
BIL		Glicemia	
Corpos Cetônicos		Albumina	
Densidade		Hemograma	
pH		GV	
Proteínas		HB	
URO		HT	
NIT		PLQ	
Heme- Pigmento		GB	
Leucócitos		Bastões (%)	
Sedimento	Cél. Epiteliais	Segmentados (%)	
	Leucócitos	Eosinófilos (%)	
	Hemácias	Basófilos (%)	
	Cilindros	Linfócitos (%)	
	Cristais	Monócitos (%)	
Parâmetros Bioquímicos		Gasometria	
PCR		pH	
Lactato		PO ₂	
Ureia		PCO ₂	
Creatinina		HCO ₃	
Sódio		BE	
Potássio		SAT O ₂	
Cálcio		FiO ₂	
BT/BD		Outros	
CK-MB			
Troponina			

6. MEDICAMENTOS

Antibióticos	Início	Fim

Outros

Dopamina	☐ Sim	☐ Não
Noradrenalina	☐ Sim	☐ Não
Dobutamina	☐ Sim	☐ Não

APÊNDICE A – Formulário de acompanhamento dos pacientes incluídos no estudo (conclusão)

11. CLASSIFICAÇÃO SEPSE:

☐ Sepsé

☐ Sepsé grave

☐ Choque séptico

12. RESULTADO DA PCR

	Amostra Soro	Amostra Buffy-Coat
Bak11 m/ Bak2		
Taf/Tar		

13. RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO

Microrganismo(s): _____

14. EVOLUÇÃO:

☐ Resolução da Sepsé

☐ Morte < 96h

☐ Morte intra-hospitalar

☐ Morte ≥ 28 dias

☐ Alta/Óbito _____

15. OBSERVAÇÕES (COMPLICAÇÕES, INTERVENÇÕES, TRANSFERÊNCIAS, ETC)

APÊNDICE B – Tabela com dados clínicos dos pacientes (continua)

Dados clínicos dos 74 pacientes com sepse. CRP: proteína C reativa; ITU: infecção no trato urinário; PNM: pneumonia.

Amostra	Diagnóstico	Classificação	Idade	Sexo	Leucócitos (cél/mm ³)	CRP (ng/L)	Desfecho
1	Influenza H3N2	Choque séptico	29	M	16500	4,98	Óbito
2	ITU	Sepse grave	72	M	9000	24,30	Alta
3	Celulite	Sepse grave	74	M	18600	32,44	Alta
4	Orquiepididimite	Choque séptico	40	M	21400	6,31	Alta
5	Pneumonia	Sepse grave	58	M	9100	30,4	Alta
6	ITU	Choque séptico	78	F	26100	24,43	Óbito
7	Pneumonia	Choque séptico	67	M	14400	31,60	Óbito
8	Pneumonia	Choque séptico	76	F	14200	1,01	Óbito
9	Pneumonia	Sepse grave	20	F	15500	28,00	Alta
10	ITU	Choque séptico	64	M	29600	17,87	Óbito
11	Pneumonia	Choque séptico	35	M	4100	21,90	Óbito
12	ITU	Choque séptico	74	M	51200	10,65	Óbito
13	Celulite	Choque séptico	32	F	11900	8,29	Alta
14	Pneumonia	Sepse grave	72	F	10300	9,82	Alta
15	Úlcera infectada	Sepse grave	61	M	13800	26,20	Alta
16	Inf. Ferida operatória	Choque séptico	69	M	14600	15,50	Óbito
17	Abscesso cutâneo	Sepse grave	34	F	15500	20,17	Alta
18	Pneumonia	Sepse grave	77	M	30600	13,29	Óbito
19	Pneumonia	Sepse grave	64	F	8400	3,14	Alta
20	Pneumonia	Choque séptico	64	F	6600	4,47	Óbito
21	Pneumonia	Choque séptico	56	M	300	6,8	Óbito
22	Pneumonia/Erisipela	Choque séptico	84	F	33100	16,16	Óbito
23	Pneumonia	Choque séptico	77	M	19900	10,27	Óbito
24	ITU	Choque séptico	82	F	15000	15,15	Alta
25	Pneumonia	Sepse grave	57	M	1400	26,53	Alta
26	Pneumonia	Sepse grave	24	F	11300	10,0	Alta
27	Pneumonia	Choque séptico	59	F	23000	9,05	Alta
28	Pneumonia	Sepse grave	40	F	6400	1,47	Alta
29	Pneumonia	Choque séptico	61	F	16500	5,48	Óbito
30	Artrite séptica	Choque séptico	67	F	27400	18,05	Óbito
31	Pneumonia	Choque séptico	52	F	7000	22,07	Óbito
32	ITU	Sepse grave	78	F	10300	4,25	Óbito
33	Pneumonia	Sepse grave	26	F	29000	10,65	Óbito
34	Pneumonia	Choque séptico	49	F	15800	8,40	Alta
35	ITU	Choque séptico	80	F	4800	9,28	Alta
36	Pneumonia	Sepse grave	26	F	10000	12,90	Alta
37	Pneumonia	Choque séptico	43	M	9800	0,3	Óbito
38	ITU	Sepse grave	77	F	16300	26,9	Alta
39	Pneumonia	Choque séptico	69	M	2000	21,3	Óbito

Amostra	Diagnóstico	Classificação	Idade	Sexo	Leucócitos (cél/mm ³)	CRP (ng/L)	Desfecho
40	Pneumonia	Choque séptico	24	M	9400	22,86	Alta
41	Pneumonia	Sepse grave	72	M	17400	16,75	Óbito
42	Celulite	Choque séptico	69	M	6100	28,5	Óbito
43	PNM/Pneumocistose	Sepse grave	27	M	18700	27,32	Óbito
44	Pneumonia	Sepse grave	66	M	2400	3,39	Alta
45	Celulite	Choque séptico	75	F	37800	19,08	Óbito
46	Pneumonia	Choque séptico	76	M	11300	18,13	Óbito
47	Pneumonia	Choque séptico	81	M	12600	17,02	Óbito
48	Pneumonia/Influenza	Sepse grave	42	M	15500	12,21	Óbito
49	Pneumonia	Choque séptico	66	F	11700	11,51	Alta
50	Pneumonia	Sepse grave	34	M	2400	21,36	Alta
51	PNM/Gastroenterite	Sepse grave	74	F	20600	25,39	Óbito
52	Pneumonia	Sepse grave	24	M	9900	24,66	Alta
53	Pneumonia	Sepse grave	48	M	7500	12,45	Alta
54	Pneumonia	Sepse grave	73	F	21500	16,37	Alta
55	Celulite	Sepse grave	54	F	22400	25,03	Alta
56	ITU	Sepse grave	69	F	21400	25,31	Alta
57	Gastroenterite	Sepse grave	38	F	15700	2,38	Alta
58	Pneumonia	Choque séptico	64	M	6900	26,82	Óbito
59	PNM/Meningite	Choque séptico	63	F	24000	22,8	Óbito
60	Pneumonia	Sepse grave	48	M	14800	24,1	Alta
61	Pneumonia	Sepse grave	33	M	10700	29,32	Alta
62	Meningite	Sepse grave	15	M	9900	10,73	Alta
63	Colangite	Choque séptico	59	M	14700	19,05	Óbito
64	Pneumonia/ITU	Sepse grave	47	F	10600	3,27	Óbito
65	Pneumonia	Choque séptico	82	F	27300	19,11	Óbito
66	ITU	Sepse grave	51	F	17100	9,62	Óbito
67	ITU	Sepse grave	78	F	13800	26,76	Óbito
68	ITU	Choque séptico	60	M	13600	29,36	Óbito
69	Pneumonia	Choque séptico	74	M	28800	29,89	Alta
70	Pneumonia	Choque séptico	63	M	48200	15,12	Alta
71	Pneumonia	Sepse grave	13	F	5800	28,5	Alta
72	Pneumonia	Sepse grave	42	M	17200	12,96	Alta
73	Pneumonia	Choque séptico	65	M	2100	26,13	Óbito
74	Pneumonia/ITU	Sepse grave	66	M	20400	29,83	Óbito

APÊNDICE C – Tabela com resultados de hemocultura e PCR de largo espectro (continua)

Resultados da hemocultura e PCR de largo espectro para cada paciente com sepse. SCN: *Staphylococcus coagulase negativa*; BGP: bacilo Gram-positivo.

Amostra	Resultado Hemocultura	Resultado PCR	
		Bak11W/Bak2	Taf/Tar
1	Negativo	+	-
2	<i>E. coli</i>	+	+
3	Negativo	-	+
4	Negativo	+	-
5	Negativo	+	-
6	Negativo	-	-
7	<i>S. pneumoniae</i>	+	-
8	<i>S. hominis</i>	-	+
9	Negativo	+	-
10	<i>P. aeruginosa</i>	+	-
11	<i>S. aureus/S. haemolyticus</i>	+	-
12	<i>S. capitis</i>	-	-
13	Negativo	-	-
14	<i>S. caprae</i>	+	-
15	<i>S. hominis</i>	-	+
16	Negativo	+	+
17	Negativo	-	+
18	Negativo	+	+
19	<i>S. haemolyticus</i>	-	+
20	Negativo	+	+
21	Negativo	+	-
22	Negativo	-	+
23	Negativo	-	+
24	Negativo	-	+
25	<i>S. pneumoniae</i>	+	+
26	Negativo	-	-
27	Negativo	-	-
28	<i>S. hominis</i>	+	-
29	BGP	-	-
30	Negativo	-	-
31	<i>E. faecalis/S. haemolyticus</i>	-	-
32	Negativo	-	-
33	Negativo	-	-
34	Negativo	-	-
35	Negativo	+	-
36	Negativo	+	-
37	Negativo	+	-
38	Negativo	+	+
39	<i>S. haemolyticus/BGP</i>	-	+
40	Negativo	-	-
41	Negativo	-	-
42	<i>S. pyogenes</i>	-	+
43	Negativo	-	-
44	Negativo	+	-

Amostra	Resultado Hemocultura	Resultado PCR	
		Bak11W/Bak2	Taf/Tar
45	<i>S. epidermidis</i>	+	-
46	<i>S. haemolyticus</i>	+	-
47	<i>S. aureus</i>	-	+
48	Negativo	-	-
49	Negativo	-	-
50	Negativo	+	+
51	Negativo	+	+
52	SCN	+	+
53	SCN	-	+
54	Negativo	-	+
55	Negativo	-	+
56	<i>E. coli</i>	-	-
57	Negativo	-	-
58	<i>A. baumannii</i>	-	+
59	Negativo	-	-
60	Negativo	-	+
61	Negativo	-	+
62	Negativo	-	-
63	Negativo	-	-
64	Negativo	-	+
65	Negativo	-	+
66	Negativo	-	-
67	Negativo	-	-
68	<i>E. cloacae</i>	-	-
69	Negativo	-	+
70	Negativo	-	-
71	Negativo	-	-
72	Negativo	-	-
73	Negativo	-	-
74	<i>Salmonella sp.</i>	-	-

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do projeto no comitê de ética

40

www.hcrp.fmrp.usp.br

COPIA

Ribeirão Preto, 27 de maio de 2008

Ofício nº 1841/2008
CEP/MGV

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **"O PAPEL DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE LARGO ESPECTRO CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE PNEUMONIA E SEPSIS"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 267ª Reunião Ordinária realizada em 26/05/2008, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 536/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
 em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
DR. MARCOS DE CARVALHO BORGES
 Depto. de Clínica Médica

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
 FWA-00002733, IRB-00002186 e Registro SISNEPICONEP nº 4
 Fone (16) 3602-2228 - E-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br
 Monte Alegre 14048-900 - Ribeirão Preto - SP

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (continua)

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do estudo:

“O PAPEL DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE LARGO ESPECTRO NO DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE SEPSE”

Pesquisador responsável: Marcos de Carvalho Borges

Telefone para contato: 16-3602-1225

ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA

A identificação da bactéria responsável por uma infecção auxilia na escolha do antibiótico mais adequado, o que pode trazer um benefício para o paciente. Na nossa rotina, o resultado dos métodos que utilizamos para identificar a bactéria demora alguns dias. Existem novos métodos capazes de identificar a bactéria em um tempo mais curto.

Gostaríamos de avaliar se um destes novos métodos é capaz de identificar a bactéria responsável pela infecção e quanto tempo isto leva. Para isto, é necessário que sejam coletados 10 mL de sangue para o estudo. Este sangue será coletado ao mesmo tempo em que outros exames forem coletados, portanto não será feito nenhum procedimento (punção) a mais. Estes 10 mL também não prejudicam a sua saúde (não fazem falta). Portanto, o único desconforto será o tempo que será gasto para realizar as perguntas sobre a sua doença.

Com estes dados, conheceremos melhor as bactérias responsáveis pelas infecções nos pacientes atendidos neste hospital e poderemos também identificar a bactéria responsável pela infecção em seu caso. Isso nos auxiliará a planejar melhor o tratamento.

A sua participação nesta pesquisa é **voluntária** e seu nome vai ficar em segredo, não aparecendo nos resultados da pesquisa. O(A) senhor(a) não é obrigado(a) a participar desta pesquisa e o seu tratamento será feito da mesma maneira, mesmo se não concordar em participar. Caso concorde em participar, poderá também desistir a qualquer momento, sem prejuízo para o seu tratamento e sem qualquer tipo de constrangimento.

EU _____,

abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”, de que trata o Projeto de Pesquisa “O PAPEL DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE LARGO ESPECTRO CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE PNEUMONIA E SEPSE”, que tem como pesquisador responsável o (a) Sr. (a) Marcos de Carvalho Borges, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, à forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (continuação)

2

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa.
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.
6. Como já mencionado, o único desconforto será o tempo gasto para realizar as perguntas sobre a sua doença.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.