GILDA MARIA BARBARO DEL NEGRO

Identificação de cinco espécies de *Candida* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com risco para candidemia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Pós-Graduação em Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

**SÃO PAULO
2008**

*Aos meus queridos pais, Nydia (in memorian) e
Gildo (in memorian), de quem me recordo sempre com
imensa saudade e profunda gratidão.*

Agradecimentos especiais

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay, mais que orientadora e chefe, uma grande amiga. Fonte de conhecimentos, por quem sinto imenso respeito e admiração. A ela agradeço a oportunidade de trabalhar com Biologia Molecular e aplicar as técnicas à Micologia Médica. Seu estímulo e apoio sempre presentes têm sido fundamentais em minha carreira profissional.

Ao Prof. Carlos da Silva Lacaz (*in memorian*), grande mestre e exemplo de amor e dedicação à carreira científica. Entre tantos outros ensinamentos importantes para minha vida profissional, me ensinou a ter humildade científica.

Ao querido amigo Roberto Raiz Junior (*in memorian*), que com paciência e boa vontade infinitas, me ensinou os primeiros passos na prática da Biologia Molecular. Profissional exemplar e possuidor de grande senso de humor, compartilhamos muito trabalho, mas também muitos momentos divertidos.

Agradecimentos

Ao Dr. Artur Figueiredo Delgado, por sua inestimável colaboração no acompanhamento clínico e na coleta de dados dos pacientes do estudo. Seu entusiasmo e dedicação muito contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Às estagiárias Daisy Rocha e Natalia Umetsu Sobrinho, e à pós-graduanda Mariana Vitule de Souza, pelas muitas horas dedicadas aos procedimentos experimentais. Agradeço pela amizade, disposição e incentivo constantes durante o andamento do trabalho.

À equipe do LIM-36, Lea Oliveira, Patrícia Pieri, Lucia Braz e Sofia Sugayama, pelo convívio que muito tem contribuído para meu aperfeiçoamento

profissional; agradeço pelo incentivo e colaboração demonstrados, especialmente na fase final do estudo, quando me afastei das atividades do laboratório. À Érika Manuli pela constante disposição em colaborar na parte prática do trabalho e pelo apoio sincero. Em especial, agradeço à Lídia Yamamoto, colaboradora e amiga de vários anos, pelo companheirismo e estímulo sempre presentes; e à Maria Luisa Nunes, pela amizade sincera, paciência e disposição em colaborar, não somente neste trabalho, mas em todas as atividades do LIM-36.

Aos profissionais do Laboratório Clínico do Instituto da Criança, especialmente à Maria Cristina Guimarães, Regina Yamagata e Dra. Claudia Luiza de Oliveira pelo auxílio na separação das amostras de sangue cedidas para a realização do estudo. Em especial, à Karina Kawasato pelo apoio e incentivo demonstrados.

Aos estagiários e alunos de pós-graduação Roberta, Fernanda, Kely e Jerônimo pelo apoio e incentivo recebidos. Em especial, ao Vagner Carvalho pela amizade, apoio e auxílio no preparo dos géis, das fotografias e na correção do texto.

À Adriana Fumie Tateno, do Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM-52) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela colaboração e competência na realização dos seqüenciamentos deste estudo.

Ao Laboratório de Micologia Médica (LIM-53) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelo fornecimento dos protótipos de *Candida* spp.

Ao Prof. Dr. Eduardo J. Troster, por permitir as consultas aos dados clínicos dos pacientes da Unidade de Terapia Intensiva do Instituto da Criança do HC-FMUSP.

Ao Dr. Ulysses Dória Filho pela realização das análises estatísticas.

Ao Dr. Marcelo Genofre Vallada, pelo apoio, sugestões e revisão do texto.

Aos Prof. Dr. Evandro R. Baldacci, Prof. Dr. Carlos P. Taborda e Dr. Gil Benard, pelos comentários e sugestões no Exame de Qualificação.

Às secretárias do Departamento de Pediatria da FMUSP, Denize Terezinha Costa, Solange Ribollo Bastieri Serodio e Adriana Trindade Bezerra pela disposição em colaborar e pelo atendimento sempre gentil.

À bibliotecária Mariza U. Yoshikawa, pela simpatia e disposição em auxiliar nos levantamentos bibliográficos.

À Milene e Nivaldo Rocha, pelo atendimento gentil e rapidez nas solicitações das cópias xerográficas.

Um agradecimento especial aos meus queridos irmãos, cunhadas, sobrinhos, tias, amigas e amigos, pelo apoio incondicional e carinho sempre presentes.

“Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar, a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo.”

Hermann Hesse

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas vigentes no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de símbolos e abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Candida</i> spp. e candidemias: epidemiologia e distribuição das espécies associadas às infecções hospitalares.....	2
1.2 Fatores de risco para candidemias.....	12
1.3 Diagnóstico laboratorial das candidemias.....	14
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	19
3. HIPÓTESE.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	22
5.1 Pacientes.....	22
5.2 Determinação do escore prognóstico PRISM.....	23
5.3 Amostras de sangue para realização das culturas.....	24
5.4 Amostras de sangue para amplificações por PCR.....	24
5.5 Extrações de DNA das amostras de sangue.....	24
5.6 Extrações de DNA dos protótipos de <i>Candida</i> spp.....	25
5.7 Condições de amplificação.....	26
5.8 Determinação do limiar de detecção do DNA de <i>Candida</i> spp. e avaliação da reatividade cruzada (inter-espécies) dos sistemas de amplificação.....	29
5.9 Determinação do limiar de detecção do DNA de <i>Candida</i> spp. em diferentes volumes de sangue.....	29
5.10 Detecção do material amplificado.....	30
5.11 Digestão enzimática dos produtos de PCR.....	30
5.12 Seqüenciamento automatizado dos produtos de PCR.....	31
5.13 Controle dos processos de amplificação e dos riscos biológicos.....	32
5.14 Análise estatística.....	33
6. RESULTADOS.....	34
6.1 A técnica de nested-PCR: avaliação da reatividade cruzada e limiares de detecção de <i>Candida</i> spp.....	34
6.2 Avaliação do limiar de detecção do DNA de <i>C.albicans</i> em diferentes volumes de sangue.....	34
6.3 Pacientes dos grupos 1 e 2: dados demográficos, clínicos e fatores de risco associados.....	36
6.4 Resultados das hemoculturas e das PCR.....	37
6.5 Resultados das digestões enzimáticas e reações de seqüenciamento.....	40
6.6 Análise estatística.....	42
7. DISCUSSÃO.....	43
7.1 O emprego da técnica de PCR e nested-PCR na identificação das espécies de <i>Candida</i>	43
7.2 A nested-PCR do presente estudo: reatividade cruzada, limiares de detecção e tempo de execução.....	48
7.3 PCR e hemoculturas nos pacientes do grupo 2.....	54
7.4 PCR e hemoculturas nos pacientes do grupo 1.....	56
7.5 PCR e identificação de duas espécies de <i>Candida</i> na mesma amostra.....	59

7.6 Pacientes com PCR positivas e hemoculturas negativas.....	63
7.7 PCR e hemoculturas: positividade durante o período de internação.....	66
7.8 Limitações do estudo.....	67
7.9 Perspectivas.....	68
8. CONCLUSÕES.....	70
9. ANEXOS.....	71
10. REFERÊNCIAS.....	82

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

β = beta

DNA = ácido desoxirribonucleico

dNTP = deoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

g = unidade de aceleração

HCl = ácido clorídrico

KHCO_3 = bicarbonato de sódio

MgCl_2 = cloreto de magnésio

M = molar

mM = milimolar

μM = micromolar

μg = micrograma

ml = mililitro

μl = microlitro

NaCl = cloreto de sódio

NH_4Cl = cloreto de amônia

ng = nanograma

nm = nanômetros

pH = potencial hidrogeniônico

pmol = picomol

SDS = dodecil sulfato de sódio

Tris = tris(hidroxiaminometano)

U = unidades

UFC = unidades formadoras de colônias

v/v = volume a volume

RESUMO

Del Negro GMB. **Identificação de cinco espécies de *Candida* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com risco para candidemia** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 95p.

As infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp. representam importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes pediátricos internados em unidades de cuidados intensivos. A utilização de fármacos imunodepressores em pacientes submetidos a transplantes, antibioticoterapia prolongada, nutrição parenteral, presença de cateter venoso central, entre outros fatores, contribuem para o aumento na frequência destas infecções oportunistas. Embora *Candida albicans* permaneça como a espécie mais frequentemente isolada de episódios de candidemia, tem ocorrido aumento do número de infecções causadas por espécies não albicans. Os métodos convencionais de cultivo apresentam sensibilidade limitada, além de demandar tempo prolongado para a identificação das espécies infectantes. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) requer pequenos volumes de sangue para análise, situação ideal para crianças gravemente enfermas, propiciando diagnóstico rápido e identificação precisa das espécies de *Candida*. Este estudo teve como objetivos padronizar técnicas de PCR de dupla amplificação, para identificar cinco espécies de *Candida* em amostras de sangue de pacientes pediátricos com risco de desenvolver candidemias, e comparar os resultados com as hemoculturas. Foram analisadas amostras de sangue de 80 pacientes pediátricos internados na Unidade de Terapia Intensiva do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, alocados em dois grupos: 58 pacientes que apresentavam duas ou mais condições predisponentes que elevam o risco de infecção fúngica (Grupo 1); e 22 pacientes em condições clínicas de menor gravidade e risco mais baixo, que foram estudados para avaliação da frequência de resultados falso-positivos por PCR (Grupo 2). A primeira amplificação identificou fragmento da região ITS do DNA ribossômico, e a segunda etapa amplificou fragmentos espécie-específicos para *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* e *C.krusei*. Para as amostras com

detecção de *Candida* spp. somente por PCR, foram realizadas restrições enzimáticas e seqüenciamentos, para a confirmação da especificidade dos amplificados. A concordância entre os resultados das hemoculturas e das PCR foi avaliada pelo teste de McNemar, com nível de significância de 5%. As hemoculturas foram positivas em 15,5% dos pacientes do grupo 1, enquanto as amplificações por PCR detectaram DNA de *Candida* spp. em 25,9% dos casos, incluindo todos os pacientes com culturas positivas. Houve concordância na identificação das espécies em 88,9% dos casos. Em dois pacientes, a PCR identificou mais de uma espécie infectante, o que não ocorreu pelas hemoculturas. Nos seis casos em que somente a PCR detectou *Candida* spp. nas amostras de sangue, as restrições enzimáticas e os seqüenciamentos confirmaram a especificidade das amplificações. No grupo 2, as hemoculturas foram negativas em todos os 22 casos, e a PCR detectou *C.glabrata* em um paciente, cujos amplificados, após seqüenciamento, apresentaram 98% de homologia com o protótipo. O teste de McNemar mostrou que a discordância encontrada entre os métodos é estatisticamente significativa e favorece a PCR ($p = 0,031$). Os resultados do presente estudo demonstraram que a técnica de PCR apresentou maior poder de detecção de *Candida* spp. em amostras de pacientes com risco de desenvolver candidemia, quando comparada às hemoculturas. A PCR foi ainda capaz de detectar mais de uma espécie infectante na mesma amostra de sangue.

Descritores: *Candida*, criança, fungemia, reação em cadeia da polimerase.

SUMMARY

Del Negro GMB. **Identification of five *Candida* species by PCR and blood cultures in pediatric patients at-risk of candidemia** [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 95p.

Disseminated candidiasis is an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised and critically ill pediatric patients. Increased use of immunosuppressive drugs, indwelling catheters, broad-spectrum antibiotics, parenteral nutrition and other predisposing conditions have contributed to the increment of *Candida* bloodstream infections. Although *Candida albicans* remains the leading species, a growing number of non-*albicans* isolates has been reported. Laboratory diagnosis of candidemia is troublesome due to the lack of blood cultures sensitivity. Detection of *Candida* DNA by polymerase chain reaction (PCR) in tiny blood volumes may provide a more rapid and reliable candidemia detection in critically ill children. The present study aimed at standardizing nested-PCR amplifications for identification of five *Candida* species, comparing results with those obtained by blood cultures. Eighty patients admitted to the pediatric intensive care unit of the “Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo” were divided into two groups: 58 patients presenting with two or more predisposing conditions to develop candidemia (Group 1), and 22 patients with lower risk, enrolled to establish the frequency of PCR false-positive results (Group 2). Nested amplifications were targeted to *Candida* ITS sequence, the first round yielding a gender specific fragment, and the second round identified five *Candida* species corresponding to *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*. When PCR positive results were not confirmed by blood cultures, enzymatic restriction and DNA sequencing were performed. Agreement between both methods was assessed by the McNemar test, adopting a level of significance of 5%. Blood cultures were positive in 15.5% of group 1 patients, whereas nested-PCR identified *Candida* species in 25.9%, including all culture positive patients. PCR was 88.9% concordant with blood cultures species identification, but only the molecular technique identified dual candidemia in two patients. Amplification

products of six patients with negative blood cultures submitted to enzymatic restriction and sequencing analysis showed high degree of homology with *Candida* reference strains, confirming the specificity of PCR. Blood cultures were negative in all patients of group 2, but PCR detected *C.glabrata* in one case whose amplification products resulted in 98% of homology with the reference strain. The McNemar test showed disagreement between both methods, favoring PCR ($p=0.031$). In the present study, PCR was more sensitive to detect *Candida* species in comparison to blood cultures, being also able to identify dual candidemia.

Descriptors: *Candida*, child, fungemia, polymerase chain reaction.

1. INTRODUÇÃO

Avanços tecnológicos nos cuidados médicos hospitalares têm permitido aumento na sobrevivência de pacientes com quadros clínicos e cirúrgicos críticos que, no entanto, tornam-se susceptíveis às infecções por fungos oportunistas. A elevada morbi-mortalidade e os custos decorrentes associados a tais infecções demonstram que estas enfermidades podem ser consideradas importante problema de saúde pública, sendo desejável que se possa intervir profilática e preventivamente com base na identificação precoce dos fatores de risco, bem como no diagnóstico laboratorial realizado em estágios iniciais da infecção (Ostrosky-Zeichner, 2003; Zaragoza e Pemán, 2006).

O espectro de fungos oportunistas, agentes de infecções hospitalares, tem expandido constantemente, e incluem diversas espécies do gênero *Candida* e outras leveduras como *Cryptococcus*, *Thricosporon* e *Rhodotorula*; algumas espécies de *Aspergillus*, zigomicetos, hifomicetos hialinos e demácios. No entanto, *Candida* spp. permanece como principal causa de infecção oportunística hospitalar, particularmente em unidades de terapia intensiva e de cuidados hematológicos, persistindo, no entanto, deficiências na prevenção e tratamento das infecções causadas por estas leveduras (Alexander e Pfaller, 2006; Perlroth et al., 2007; Pfaller e Diekema, 2007).

1.1 *Candida* spp. e candidemias: epidemiologia e distribuição das espécies associadas às infecções hospitalares

Leveduras do gênero *Candida* são microrganismos unicelulares, pleomórficos, de ciclo sexual incompleto, e incluem aproximadamente 150 espécies, das quais cerca de 20 foram descritas como agentes etiológicos das candidíases (Paula, 1998; Lacaz et al., 2002). Têm distribuição ubíqua na natureza, podendo ser isoladas de folhas, água, solo etc. Considerando-se a flora normal do homem, são encontradas como saprófitas em dobras da pele, orofaringe, mucosa vaginal e colonizam o trato gastrointestinal em até 80% de indivíduos saudáveis (Lacaz et al., 2002; Colombo e Guimarães, 2003).

Ocorrendo comprometimento nos mecanismos de defesa ou nas barreiras anatômicas, estas leveduras podem tornar-se patogênicas, originando diversos tipos de infecções. Estas envolvem amplo espectro de manifestações clínicas, indo desde formas superficiais benignas até formas invasivas, que comprometem diversos órgãos, após disseminação hematogênica do agente. Dentre as formas invasivas, a candidemia é a mais comum em ambientes hospitalares. Muitos episódios são transitórios e auto-limitados, particularmente em indivíduos não neutropênicos, mas podem progredir para infecção sistêmica, resultando na formação de lesões cutâneas embólicas, abscessos renais e hepatoesplênicos, endoftalmites etc. Envolvimento do sistema nervoso central pode ocorrer nas complicações dos quadros sistêmicos, estando associado ao aumento de morbidade (Lacaz et al., 2002; Colombo e Guimarães, 2003; Chapman e Faix, 2003).

As candidemias podem ser adquiridas por via endógena, pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal, local ricamente

colonizado por *Candida*. Um desequilíbrio na microbiota residente, ou lesões da mucosa intestinal causadas por procedimentos cirúrgicos ou desnutrição grave, favorecem a translocação da levedura aos capilares mesentéricos, permitindo o acesso à corrente sangüínea. Por via exógena, as infecções podem ocorrer por intermédio das mãos contaminadas dos profissionais de saúde, e pela utilização de cateteres e soluções parenterais contaminadas (Colombo e Guimarães, 2003; Tortorano et al., 2006; Perlroth et al., 2007).

Mais de 90% dos casos de infecções invasivas são ocasionados por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. No entanto, a variedade de espécies isoladas de amostras clínicas continua a crescer, especialmente pela melhora nos métodos de identificação laboratorial (Warnock, 2007; Pfaller e Diekema, 2007).

Candida albicans permanece sendo a espécie mais freqüentemente isolada de candidemias, variando de 40% dos casos em países da América Latina, até 70% em alguns países nórdicos (Sandven, 2000; Pfaller e Diekema, 2007). Sua capacidade de aderência a mucosas e epitélios pela produção de proteinases e fosfolipases, bem como a produção de estruturas filamentosas que auxiliam na invasão dos tecidos, facilitam o processo patogênico desta levedura. Esta espécie está associada a índices de mortalidade mais elevados (Colombo e Guimarães, 2003; Tortorano et al., 2006; Perlroth et al., 2007).

Candida glabrata ocupa o segundo lugar entre as espécies isoladas de candidemias nos EUA, com freqüência em torno de 20 a 25% dos casos, enquanto em países da América Latina somente de 4 a 7% dos casos são atribuídos a esta espécie (Sandven, 2000; Pfaller e Diekema, 2007; Perlroth et

al., 2007). Esta diferença pode ser decorrente de fatores ligados ao hospedeiro, variações geográficas dos diversos países e diferenças nos métodos de isolamento utilizados nos laboratórios de microbiologia. Enquanto em países da Europa a frequência de isolamento da espécie permanece praticamente inalterada ao longo dos últimos anos, houve aumento nos EUA, com elevada porcentagem de isolados resistentes ao fluconazol, e com resistência cruzada a outros medicamentos da classe dos azóis, além de menor suscetibilidade a anfotericina B (Warnock, 2007; Pfaller e Diekema, 2007). A frequência de isolamento de *C.glabrata* parece estar associada à idade dos pacientes, sendo raro em recém-nascidos e crianças, e ao uso do antifúngico fluconazol em terapia profilática, especialmente em pacientes portadores de neoplasias (Colombo e Guimarães, 2003; Chapman, 2003; Meán et al., 2008).

Candida parapsilosis é uma levedura exógena que coloniza a pele humana, sendo frequentemente isolada das mãos dos profissionais de saúde e de soluções de nutrição parenteral contaminadas. Tem grande capacidade de formar biofilmes em superfícies de cateter. É responsável por 7 a 15% dos episódios de candidemia nos EUA, e em países da América Latina ocupa o segundo lugar entre as espécies com maior frequência de isolamento (Antunes et al., 2004; Colombo et al., 2006; Pfaller e Diekema, 2007). Em recém-nascidos pré-termo, internados em unidades de cuidados intensivos neonatais, a prevalência desta levedura é elevada, atingindo até 50% dos casos de candidemias (Levy et al., 1998; Yamamura et al., 2001; Chapman, 2003). A espécie está associada a índices mais baixos de mortalidade, e medidas de controle em relação à lavagem de mãos dos profissionais de saúde, bem como

a troca ou remoção de cateteres, possibilitam a redução no número de infecções por *C.parapsilosis* (Colombo e Guimarães, 2003; Maródi e Johnston Jr, 2007).

Em pacientes neutropênicos e portadores de enfermidades malignas hematológicas, *C.tropicalis* surge como importante causa de candidemias. De 60 a 80% desses pacientes, quando colonizados com a levedura, podem desenvolver infecção sistêmica. Nos EUA, a frequência de isolamento vem decrescendo com o uso de fluconazol profilático, sendo a quarta espécie mais isolada. No entanto, em países da América Latina e no Brasil, ocupa o segundo lugar, juntamente com *C.parapsilosis* (Nucci e Colombo, 2007; Pfaller e Diekema, 2007). Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos passaram a revelar número relativamente grande de isolados de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol; entretanto, o que ocorre na prática é que a espécie apresenta com maior frequência, em relação às demais espécies, o fenômeno do *trailing* (inibição incompleta de crescimento), resultando em MICs (concentração inibitória mínima) artificialmente elevadas. Alguns autores relataram o fenômeno em mais de 50% dos isolados, que na verdade eram suscetíveis ao fluconazol (Arthington-Skaggs et al., 2002; Pfaller et al., 2006).

Candida krusei também é isolada com maior frequência de pacientes portadores de doenças hematológicas malignas, mas a frequência de isolamento é relativamente baixa, em geral em torno de 4% dos casos, índice que permanece estável nos últimos anos. É uma levedura intrinsecamente resistente ao fluconazol, mas responde aos demais medicamentos azólicos (Colombo e Guimarães, 2003; Pfaller e Diekema, 2007).

A ocorrência de candidemias atribuídas a espécies não albicans vem sendo documentada com maior frequência, e já respondem por cerca de 50 a 60% do total de episódios, particularmente em países da Ásia e América Latina. A identificação da espécie isolada é desejável, não apenas no âmbito de estudos de caráter epidemiológico, mas também pelo fato das diversas espécies diferirem com relação ao prognóstico e à suscetibilidade aos agentes antifúngicos (Sandven, 2000; Colombo e Guimarães, 2003).

As taxas de mortalidade entre pacientes criticamente enfermos portadores de candidemia variam de 45 a 75%. Estes índices podem estar relacionados ao diagnóstico tardio, além de falhas no tratamento decorrentes da demora na instituição da terapêutica ou à utilização de antifúngico ineficaz para espécies resistentes. A redução nas taxas de mortalidade parece ser dependente da administração adequada do medicamento, incluindo a dose correta em estágios iniciais da infecção e por período de tempo adequado (Pfaller e Diekema, 2007). Terapias profiláticas, pré-emptivas e empíricas reduzem a incidência e a mortalidade associadas às infecções invasivas (Perlroth et al., 2007; Méan et al., 2008). Devido à complexidade das condições clínicas destes pacientes, é difícil estimar a taxa de mortalidade atribuída à infecção, que segundo alguns autores, é da ordem de 20 a 40% dos casos. Entretanto, é possível afirmar que as taxas de mortalidade dos pacientes que adquirem infecção por *Candida* permanecem elevadas, maiores do que se poderia estimar considerando-se somente a doença de base dos mesmos (Gudlaugsson et al., 2003; Pfaller e Diekema, 2007).

Devido aos mecanismos de escape da levedura ou nos casos de comprometimento do sistema de defesa do hospedeiro, é necessária a intervenção terapêutica no tratamento da infecção. Entre os medicamentos antifúngicos mais utilizados, estão a anfotericina B, que altera a permeabilidade da membrana celular da levedura, e o fluconazol. Este último composto atua inibindo a enzima lanosterol-14- α -dimetilase, sistema enzimático microsomal do complexo citocromo P-450, que promove a conversão do lanosterol a ergosterol. O acúmulo dos precursores (os metilesteróis) leva à perda da integridade da membrana plasmática. Nas doses usuais, estes medicamentos têm ação fungistática, e o uso excessivo pode acarretar o aparecimento de resistência em espécies previamente suscetíveis (Lacaz et al., 2002; Akins, 2005).

Muitos estudos de vigilância epidemiológica sobre infecções fúngicas hospitalares têm sido realizados nos EUA. O *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS), programa implantado para levantamentos de dados em hospitais americanos atua naquele país desde a década de 1970, divulgando as melhores casuísticas sobre a frequência de candidemias nosocomiais. Estas constituem a quarta causa mais comum entre todas as infecções de corrente sanguínea, em hospitais terciários dos EUA, com frequência variando de 0,28 a 0,96 casos/1.000 internações. Na Europa, *Candida* spp. ocupa do 6º ao 10º lugar entre os agentes mais isolados de infecções hematogênicas. A frequência de casos de candidemia adquirida em hospitais terciários em diferentes países da Europa varia de 0,17-0,76 casos por 1.000 internações (Colombo et al., 2006; Tortorano et al., 2006; Pfaller e Diekema, 2007; Warnock, 2007).

Na América Latina há poucos relatos sobre a incidência destas infecções. Em 2003, Godoy et al. publicaram dados sobre a distribuição de espécies de *Candida*, em estudo multicêntrico realizado em cinco hospitais terciários de quatro países da América Latina, incluindo o Brasil. De um total de 103 amostras de *Candida* isoladas de hemoculturas, 42% eram da espécie *albicans*, seguida de *C.tropicalis* em 24,2% dos casos.

No Chile, foi criado um programa de vigilância sobre infecções fúngicas hospitalares no ano de 2000. O primeiro levantamento de dados obtidos de 13 hospitais do país revelou que 83,5% dos pacientes avaliados desenvolveram infecções hematogênicas, 61% das quais causadas por leveduras oportunistas. *Candida albicans* e *C.parapsilosis* foram as espécies mais isoladas, correspondendo a 54% do total (Silva et al., 2004).

Rodero et al. (2005) realizaram estudo prospectivo em 35 hospitais da Argentina, coletando dados no período de um ano. Foram detectadas 265 infecções hematogênicas por leveduras, 38% das quais em pacientes pediátricos. Em 40,75% dos casos foi isolada *C.albicans*, seguida por *C.parapsilosis* em 28,5%.

Estudo prospectivo multicêntrico realizado no Brasil revelou dados sobre a distribuição de espécies de *Candida*, bem como a taxa de mortalidade geral de pacientes internados em seis hospitais terciários da região sudeste do país. A maior frequência de isolamento foi de *C.albicans* (37%), e as espécies não *albicans* foram responsáveis por 63% dos casos de candidemia. A taxa de mortalidade geral foi de 50%, com os maiores índices observados em pacientes que não receberam terapêutica antifúngica (Colombo et al., 1999).

Alguns outros estudos epidemiológicos foram conduzidos em hospitais do Brasil, com principal foco na distribuição de espécies associadas aos episódios de candidemia, sem divulgação sobre a incidência destas infecções nos hospitais incluídos nesses estudos (Costa et al., 2000; Colombo et al., 2003; Antunes et al., 2004).

Colombo et al. (2006) realizaram o maior estudo prospectivo multicêntrico abrangendo 11 hospitais terciários brasileiros, e encontraram elevada frequência de candidemias (2,49 casos/1.000 internações), 2 a 15 vezes maiores que as referidas em centros hospitalares da Europa e EUA. A elevada frequência de infecções encontrada poderia estar relacionada a dificuldades na implementação de programas de controle de infecção hospitalar em países menos desenvolvidos, ao número limitado de profissionais de saúde para atendimento de pacientes em estado crítico e possivelmente a adoção de práticas menos agressivas de terapia profilática e empírica em pacientes de risco. *Candida* spp. foi o quarto agente mais frequentemente isolado dos episódios de infecção hematogênica e, em 41% dos casos, isolou-se *C.albicans*, seguida de *C.parapsilosis* e *C.tropicalis*, ambas em 21% dos casos. A frequência de isolamento de *C.glabrata* ficou em torno de 5% do total. A taxa de mortalidade geral em 30 dias foi de 54%, com os menores índices em pacientes infectados por *C.parapsilosis*.

Em estudo mais recente, realizado em quatro hospitais terciários da cidade de São Paulo, Colombo et al. (2007) mostraram frequência de 1,66 casos de candidemia/1.000 internações. A maior parte dos pacientes infectados (35%) estava internada em unidades de cuidados intensivos e a taxa

de mortalidade foi de 61%, com índices mais elevados nos pacientes infectados com *C.glabrata*. Neste estudo, a distribuição das espécies associadas aos episódios de candidemia foi semelhante às publicadas anteriormente.

Há poucos relatos sobre a incidência destas infecções em crianças, mas os dados indicam que *Candida spp.* é responsável por cerca de 15% a 20% de todas as infecções hematogênicas adquiridas em hospitais pediátricos, ocupando o segundo lugar entre os agentes isolados de pacientes internados em UTI em alguns hospitais dos EUA (Yamamura et al., 2001; Leibovitz, 2002; Ostrosky-Zeichner, 2003).

Raymond et al. (2000) publicaram estudo multicêntrico que incluiu 17 hospitais pediátricos de oito países da Europa, demonstrando que *Candida spp.* foi responsável por 9% das infecções nosocomiais. As infecções hematogênicas foram mais freqüentes nas unidades de cuidados intensivos neonatais e estavam associadas principalmente ao uso de cateter venoso central.

Estudo conduzido entre 1995 e 2000 em um hospital na Espanha, revelou que a maior freqüência de candidemias ocorreu na UTI pediátrica, em pacientes previamente submetidos a cirurgias cardíacas, com 7,9 episódios/1.000 internações, comparada a 0,6 episódios/1.000 internações nas demais áreas hospitalares (García-San Miguel et al., 2006).

A maior parte das publicações se refere a dados obtidos em unidades de cuidados intensivos neonatais (Yamamura et al., 2001; Ostrosky-Zeichner, 2003; Huskins e Goldmann, 2004). As infecções por *Candida* são causa

freqüente de sepse em recém-nascidos, com freqüência variando de 4 a 15% em crianças com peso de nascimento < 1.500g, e de 12 a 20% nas que pesam menos de 1.000g, e taxas de mortalidade geral da ordem de 30-50%. A maior parte das infecções é causada por *C.albicans* e *C.parapsilosis*, mas nos últimos anos tem ocorrido aumento na freqüência de infecções por *C.tropicalis* (Chapman e Faix, 2003). A colonização por *C.albicans* parece ocorrer por transmissão da mãe para o filho, enquanto *C.parapsilosis* é transmitida pelo ambiente contaminado ou pelas mãos dos profissionais de saúde. A mortalidade associada à infecção por *C.albicans* é significativamente maior em relação às demais espécies (Leibovitz, 2002; Huskins e Goldmann, 2004; Singhi et al., 2004; Celebi et al., 2007).

No Brasil, há poucos dados específicos sobre a freqüência de candidemias em crianças; em geral, os pacientes internados em unidades pediátricas estão incluídos nas casuísticas gerais dos estudos.

França et al. (2008) realizaram estudo transversal sobre candidemias em hospital terciário do Paraná; no período de três anos foram observados 100 episódios de infecção hematogênica, dos quais 40 ocorreram em crianças, 80% delas com idade até quatro anos. Entre a população pediátrica, a maior freqüência de isolamento foi de *C.albicans* (65%), seguida de *C.tropicalis* em 15% dos casos. Os resultados apresentados são semelhantes aos de outros estudos, tanto no que se refere às espécies isoladas, como às taxas de mortalidade, que parecem ser inferiores em crianças entre um e 14 anos, quando comparadas aos adultos e recém-nascidos (Colombo et al., 2006; Colombo et al., 2007).

1.2. Fatores de risco para candidemias

Diversos estudos têm definido os fatores predisponentes às infecções invasivas por *Candida spp*, muitos deles retrospectivos, com populações heterogêneas, incluindo pacientes imunocompetentes e neutropênicos, e em diversas áreas hospitalares, com ênfase em unidades de cuidados intensivos (Jordá-Marcos et al., 2007).

Análises multivariadas têm permitido estabelecer que os fatores de risco independentes para o desenvolvimento de candidemias incluem: antibioticoterapia de amplo espectro, quimioterapia, colonização prévia por *Candida spp.*, presença de cateter venoso central, nutrição parenteral, neutropenia, cirurgias do trato gastrointestinal e hemodiálise (Tufano, 2002; Colombo e Guimarães, 2003; Pfaller e Diekema, 2007; Perlroth et al., 2007).

Nos diversos estudos sobre fatores de risco, o tempo de internação anterior ao desenvolvimento da infecção tem sido considerado mais como um marcador de gravidade da doença do que como causa diretamente relacionada à infecção. Em geral, observa-se que o tempo prolongado de internação associado a outras condições clínicas predisponentes, aumenta o risco para o desenvolvimento da infecção. Alguns autores têm demonstrado que a presença de dois ou mais fatores de risco, aumenta exponencialmente a probabilidade de desenvolvimento de infecções por *Candida spp*. (Ostrosky-Zeichner, 2003; Pfaller e Diekema, 2007; Méan et al., 2008).

Alguns relatos da literatura relacionam ainda escores de gravidade utilizados em UTI, como APACHE (“Acute Physiology and Chronic Health Evaluation”) e PRISM (“Pediatric Risk of Mortality”), entre os fatores preditivos

para o desenvolvimento destas infecções (Pfaller e Diekema, 2007; Pasqualotto et al., 2007).

Na população pediátrica, os recém-nascidos pré-termo, crianças submetidas a cirurgias de grande porte, e pacientes internados em unidades de cuidados intensivos constituem os grupos de maior risco. Alguns estudos demonstram que muitos destes pacientes que desenvolvem infecção invasiva apresentam episódios prévios de candidúria; no entanto, a maioria não consegue estabelecer relação causal com a infecção hematogênica (McDonald et al., 1998; Maródi e Johnston Jr, 2007).

Outros estudos documentam a associação entre a ocorrência de candidemia em crianças e presença de cateter venoso central (MacDonald et al., 1998; Zaoutis et al., 2005; Celebi et al., 2007).

Em estudo de coorte retrospectivo, realizado durante um período de nove anos e conduzido em pacientes pediátricos de um hospital brasileiro do Rio Grande do Sul, foram observados episódios de candidemia em 61 pacientes, incluindo 14 recém-nascidos. Análise multivariada foi aplicada para identificar os fatores de risco associados à mortalidade em portadores da infecção e presença de cateter venoso central. Os resultados demonstraram que nestes pacientes a demora na retirada do cateter foi considerada fator de risco independente para o óbito precoce, porém sem relação com a taxa de mortalidade tardia, que foi significativamente maior nos pacientes com escores PRISM mais elevados (Pasqualotto et al., 2007).

1.3. Diagnóstico laboratorial das candidemias

Sinais e sintomas de infecção hematogênica por *Candida* são inespecíficos. Em geral, os pacientes apresentam febre que persiste mesmo com o uso de antibióticos. O desafio no diagnóstico da infecção reside em identificar pacientes de risco e desenvolver métodos laboratoriais que identifiquem a infecção precocemente, com resultados confiáveis (Alexander e Pfaller, 2006).

O isolamento da levedura a partir de uma única hemocultura pode ser evidência suficiente para iniciar o tratamento da infecção. No entanto, a positividade das hemoculturas é estimada entre 40% e 60% dos casos da doença invasiva. Em pacientes pediátricos, os níveis de sensibilidade podem ser ainda mais reduzidos, devido à coleta de pequenos volumes de sangue (Yera et al., 2001; Ellepola e Morrison, 2005; See, 2005). Pela natureza transitória da fungemia e possibilidade de haver poucos organismos circulantes, coletas múltiplas, em dias sucessivos, aumentam a chance de isolamento (Jones, 1990; Reiss e Morrison, 1993). Esta prática, porém, não é comum em pacientes pediátricos, sobretudo naqueles internados em unidades de terapia intensiva.

Em geral, os resultados das culturas são obtidos somente após 72 horas, muitas vezes requerendo uma semana para a identificação da espécie. Esta demora pode ser crucial no caso de pacientes em estado crítico, em especial nos portadores de *Candida* resistentes aos azóis (Pfaller e Diekema, 2007).

Em relação às uroculturas positivas, a simples presença das leveduras não indica necessariamente ocorrência de infecção sistêmica, sendo difícil diferenciar casos de colonização dos casos de infecção urinária propriamente dita, que podem evoluir com comprometimento da função renal. Pacientes com sonda vesical podem ter apenas colonização do sistema de drenagem, sem presença de infecção (Yamamura et al., 2001; Alexander e Pfaller, 2006).

O diagnóstico sorológico para pesquisa de anticorpos específicos anti-manana, principal antígeno presente na parede celular de *Candida*, é limitado pela ocorrência de resultados falso-negativos, especialmente em pacientes imunocomprometidos, que constituem a maioria daqueles com maior suscetibilidade à infecção fúngica (Yera et al., 2001; Hopfer e Amjadi, 2002).

Ensaio que empregam anticorpos monoclonais ou policlonais têm sido utilizados para a detecção de manana circulante, em soros de pacientes portadores da doença invasiva. Os kits comercialmente disponíveis apresentam bons níveis de especificidade, mas a sensibilidade fica em torno de 50% dos casos comprovados. Pacientes com infecção disseminada podem apresentar baixas concentrações séricas do antígeno circulante, dificultando sua detecção (Alexander e Pfaller, 2006; Hopfer e Amjadi, 2002). Ensaio que detectam metabólitos secretados por *Candida*, como o D-arabinitol e outros componentes da parede celular da levedura, como a β -1,3-glucana, têm sido relatados por alguns autores, mas sua aplicação clínica ainda é restrita (Erjavec e Verweij, 2002; Pontón e del Palacio, 2007).

Devido aos fatores limitantes dos métodos de diagnóstico convencionais, o tratamento com antifúngicos é freqüentemente empírico em pacientes com

risco elevado para a infecção, causando problemas de toxicidade e aparecimento de resistência aos antifúngicos, além de dificultarem ainda mais os isolamentos (Ellepola e Morrison, 2005; Pfaller e Diekema, 2007; Perlroth et al., 2007).

A detecção do agente etiológico por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” ou PCR) possibilita diagnóstico rápido e confiável, em pacientes pertencentes aos grupos de risco para o desenvolvimento de candidemias.

A maior parte de genoma haplóide de *Candida* consiste de DNA mitocondrial e DNA ribossômico (DNAr), este último, presente em número de cópias variando entre 50 e 100, com arranjo “in tandem” (Beckerman e Magee, 2002; Odds et al., 2004). No DNAr existem três regiões codificadoras relativamente conservadas: uma região 18S, com cerca de 1.800 pares de base; uma sequência altamente conservada de 5.8S, com 160 pares de base; e a região 28S com cerca de 3.400 pares de base. Flanqueando a região 5.8S, existem regiões de sequências variáveis denominadas “interspace regions” (ITS), cuja função não é completamente conhecida. Estas sequências (ITS1 e ITS2) são removidas durante a transcrição e, portanto são consideradas regiões não codificadoras. No entanto, experimentos demonstram que sua remoção antes da etapa de transcrição, causa efeito deletério na formação do RNA ribossômico maduro (Iwen et al., 2002). Como estas regiões mostram grande variabilidade entre microrganismos do mesmo grupo, podem ser utilizadas para a identificação das espécies de *Candida* em testes moleculares,

além de aumentar o poder de detecção dos métodos de amplificação, por estarem presentes em múltiplas cópias (Chen et al., 2000; Chen et al., 2002).

O primeiro relato do emprego da PCR para detecção e identificação de DNA em amostras clínicas, foi publicado em 1990. Os autores utilizaram como alvo para as amplificações uma seqüência do gene *ERG11*, que codifica a enzima lanosterol-14- α -dimetilase do citocromo P-450, para detecção de *C.albicans*. Em diversas amostras clínicas os resultados da PCR confirmaram as culturas, e houve detecção do DNA de *Candida* em duas amostras com culturas negativas. O teste também foi avaliado em amostras semeadas artificialmente com a levedura, atingindo limiar de detecção de 10 UFC em 100 μ l de material biológico (Buchman et al., 1990).

A partir deste estudo, os métodos moleculares de amplificação de DNA têm sido aplicados diretamente em amostras clínicas, tais como sangue, soro, urina, fragmentos de tecidos, com resultados promissores quanto aos níveis de sensibilidade e especificidade em relação às culturas, além de fornecerem identificação precisa das espécies infectantes (Hopfer e Amjadi, 2002; Chen et al., 2002).

Mais recentemente, protocolos que empregam a técnica de PCR em Tempo Real ("Real Time PCR") têm sido utilizados para quantificar o número de cópias de DNA presentes nas amostras clínicas, apresentando potencial para o monitoramento de pacientes sob tratamento. O procedimento automatizado requer menor manipulação das amostras clínicas e dos produtos de amplificação, reduzindo o aparecimento de reações falso-positivas. A sensibilidade elevada dos testes favorece a detecção precoce do patógeno em

pacientes com risco para o desenvolvimento da infecção (Erjavec e Verweij, 2002; Pryce et al., 2003; Maaroufi et al., 2004).

Padronizar e disponibilizar métodos diagnósticos rápidos, confiáveis e não invasivos aos pacientes com risco de desenvolver infecções fúngicas, continua a ser o principal foco para profissionais da área de saúde, notadamente no atendimento a pacientes pediátricos. A detecção do agente patogênico em estágios iniciais da infecção, e a identificação precisa da espécie causadora são fundamentais para a introdução precoce e adequação da terapêutica, contribuindo para a redução da mortalidade atribuída à infecção.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os métodos convencionais de cultivo empregados no diagnóstico das infecções causadas por *Candida* spp. apresentam limitações de sensibilidade e demandam tempo prolongado para fornecer resultados. Em pacientes pediátricos internados em unidades de terapia intensiva (UTI), a situação é agravada, devido à dificuldade na obtenção de amostras sangüíneas em volumes adequados para a realização das culturas. A técnica de PCR requer pequenos volumes de sangue para análise, propiciando diagnóstico rápido e identificação precisa das espécies de *Candida*.

3. HIPÓTESE

A técnica de PCR constitui alternativa diagnóstica, possibilitando o aumento do poder de detecção de *Candida* em relação aos métodos convencionais de cultivo, quando aplicada à análise de amostras sanguíneas de crianças e adolescentes, que apresentam fatores de risco para a infecção por *Candida* spp.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o desempenho da técnica de PCR na detecção molecular de *Candida* spp., em amostras de sangue total de crianças e adolescentes internados na UTI do Instituto da Criança/HC-FMUSP.

4.2 Específicos

- 4.2.1 Padronizar a técnica de PCR de dupla amplificação (nested-PCR), para a identificação do gênero *Candida* e das espécies *albicans*, *glabrata*, *parapsilosis*, *tropicalis* e *krusei*, determinando limiares de detecção e especificidade de cada sistema de amplificação;
- 4.2.2 Comparar os resultados das PCR e das hemoculturas para a detecção das cinco espécies de *Candida*, nas amostras de sangue total dos pacientes do estudo.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP e pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas-FMUSP, incluindo a declaração de confidencialidade para o uso de amostras de sangue remanescentes dos pacientes do estudo (protocolo nº 028/06 – 23/02/2006, Anexo A).

5.1 Pacientes

Foram analisadas amostras de sangue periférico de 80 pacientes de ambos os sexos, com idade variando de dois meses a 20 anos incompletos, internados na UTI do Instituto da Criança (ICr) no período de março de 2006 a setembro de 2007. Esta UTI se caracteriza pela internação de pacientes com idade acima de 30 dias de vida até 20 anos, portadores de doenças de base e atendidos nas várias unidades especializadas do ICr.

Considerando-se as condições predisponentes para o desenvolvimento de infecção por *Candida* spp., os pacientes foram alocados em dois grupos:

Grupo 1: 58 pacientes que apresentavam duas ou mais condições clínicas que elevam o risco de infecção fúngica, a saber: doenças de base que causam imunodepressão, hepatopatias graves, pacientes submetidos à terapia imunossupressora, antibioticoterapia de amplo espectro (associação de dois ou mais antibióticos, por mais de 72 horas), presença de cateter venoso central ou arterial, administração de nutrição parenteral, evidências laboratoriais de

colonização por *Candida* spp. (uroculturas, pontas de cateter e/ou culturas positivas em outros fluidos biológicos), e tempo prolongado de permanência na UTI. Foram incluídos no estudo somente os pacientes que tiveram no mínimo três culturas de sangue realizadas durante o período de internação.

Grupo 2: 22 pacientes internados na UTI, porém com risco mais baixo de desenvolver infecção por *Candida* spp., e em condições clínicas de menor gravidade. Estes pacientes foram incluídos no estudo com o objetivo de se avaliar a possibilidade do aparecimento de resultados falso-positivos pela técnica de PCR. Somente pacientes que tiveram no mínimo uma cultura de sangue realizada durante o período de internação foram incluídos neste grupo.

5.2 Determinação do escore prognóstico PRISM

Todos os pacientes foram avaliados de acordo com o escore PRISM (“Pediatric Risk of Mortality”), adaptado de Pollack et al. (1988). Para o cálculo do índice, algumas variáveis fisiológicas são mensuradas nas primeiras 24 horas de internação, tais como frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão arterial sistólica e diastólica, dados gasométricos, glicemia, cálcio, bilirrubina etc, que recebem pontuações de acordo com os valores mensurados de cada elemento (Anexo B). Escores mais elevados indicam maior instabilidade fisiológica, e valores de PRISM a partir de 10 correspondem a risco elevado de óbito.

5.3 Amostras de sangue para realização das culturas

As hemoculturas dos pacientes internados na UTI do ICr são realizadas rotineiramente no Setor de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central (DLC) do HC-FMUSP. De um a três mililitros de sangue são coletados em balão de cultura Bactec Péds Plus/F (Becton Dickinson, USA) e o material é encaminhado para análise. Os balões são mantidos no equipamento automatizado Bactec™ série 9000 (Becton Dickinson, USA) e a identificação das espécies isoladas é realizada pelo sistema API-20C AUX (BioMérieux, France). Os resultados das culturas foram obtidos por meio de consulta ao sistema eletrônico de informação (intranet) da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP e aos prontuários médicos.

5.4 Amostras de sangue para amplificações por PCR

Estas amostras foram obtidas no Setor de Hematologia do Laboratório Clínico do ICr, e consistiram de volumes residuais dos tubos com EDTA, utilizados para a realização de hemogramas. Portanto, para as amplificações por PCR, foram utilizadas amostras diferentes das encaminhadas ao Setor de Microbiologia. O número de amostras de cada paciente, obtidas em dias diferentes, variou de cinco a 20 no Grupo 1, e de três a seis no Grupo 2, na dependência do tempo de internação na UTI.

5.5 Extrações de DNA das amostras de sangue

Como foram utilizados volumes residuais dos tubos com EDTA, dispunha-se na maior parte das vezes de pequenas quantidades de sangue,

em alguns casos no máximo 250 µL. Sendo assim, as extrações de todas as amostras do estudo foram realizadas neste volume, de acordo com técnica descrita por Löffler et al. (1997). Resumidamente, a 250 µL de sangue foram adicionados 800µL de solução de lise contendo 155mM NH₄Cl; 10mM KHCO₃; 1mM EDTA pH 7,4 e mantidos em gelo por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 15.300xg (centrífuga modelo 5417-R, Eppendorf, Germany). Após obtenção do “pellet” de células livre de hemácias, foram adicionados 200 µL de solução de lise nuclear contendo 10mM Tris-HCl pH 8,0; 400mM NaCl; 2mM EDTA pH 8,2 e os tubos submetidos à agitação em vórtex (Fisher Scientific, USA). A esta solução foram adicionados 250U/mL de liticase (L4276, Sigma, USA) e 10% de β-mercaptoetanol (Merck, Germany). Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 horas e, em seguida, foram novamente submetidos à agitação vigorosa. As demais etapas para obtenção do DNA foram realizadas utilizando-se o QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, USA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

5.6 Extrações de DNA dos protótipos de *Candida* spp.

Os protótipos de *C.albicans*, *C.glabrata*, *C. parapsilosis*, *C.tropicalis* e *C.krusei* foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório de Investigação Médica em Micologia (LIM-53) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, devidamente identificados por métodos microbiológicos e bioquímicos convencionais (Lacaz et al., 2002). Estes isolados foram adquiridos do

Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda, em 1973, e mantidos na coleção de culturas do laboratório.

As extrações de DNA foram realizadas a partir da suspensão das leveduras, contendo 10^6 células/mL, de acordo com a metodologia descrita por Van Burik et al. (1998), com algumas modificações. Um mililitro da suspensão foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 15.300xg e, ao *pellet* de células foram adicionados 600 µl de uma solução contendo 50mM Tris, 10mM EDTA, 250U/mL de liticase (L4276, Sigma, USA) e 10% de β-mercaptoetanol (Merck, Germany). Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 horas e, em seguida, adicionou-se à suspensão de esferoplastos, 0,2% de SDS e 200 µg/mL de proteinase K (Gibco BRL, USA). Os tubos permaneceram a 65°C por 45 minutos, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 15.300xg, e os sobrenadantes transferidos para tubos limpos. Para a precipitação do DNA, adicionou-se isopropanol (Merck, Germany) v/v, e as amostras foram mantidas a -20°C por uma noite. Após centrifugação por 20 minutos a 19.400xg, foram adicionados ao “pellet” contendo o DNA, 500 µL de etanol a 70% e os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 19.400xg. O “pellet” final de DNA foi solubilizado em solução de Tris-EDTA 1M e a concentração determinada por espectrofotômetro (modelo DU-70, Beckman, USA), em comprimentos de onda 260, 280 e 320 nm.

5.7 Condições de amplificação

Todas as amostras de DNA obtidas dos pacientes foram previamente analisadas com oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) que amplificam

fragmento do gene que codifica a proteína constitutiva β -actina humana (Nakajima-Iijima et al., 1985). O objetivo foi assegurar que as amostras de DNA extraídas não estivessem fragmentadas ou que contivessem inibidores de amplificação. Amostras que não amplificaram nestes testes foram excluídas do estudo.

A técnica de PCR para a detecção de *Candida* foi realizada com duas etapas de amplificação. Para o primeiro “round”, foram utilizados “primers” que amplificam fragmento da região ITS do DNA e identificam o gênero *Candida*; e no segundo “round”, “primers” espécie-específicos, de acordo com a Tabela 1. Optou-se pela utilização da dupla amplificação (“nested”-PCR), pois esta aumenta o poder de detecção do DNA em amostras biológicas, e ao mesmo tempo melhora a especificidade, uma vez que um resultado positivo por “nested”-PCR corresponde ao reconhecimento da sequência alvo da amplificação pelo primeiro e pelo segundo par de “primers”. Além disso, as amplificações com os “primers” ITS1 e ITS4 resultam em fragmentos de pesos moleculares variáveis, porém muito próximos, dificultando a diferenciação de cada espécie de *Candida* por eletroforese em gel de agarose a 2%.

Para o primeiro PCR, foram preparados 50 μ L de solução contendo tampão da enzima (LGC, Brasil), 200 μ M de dNTP (GE Healthcare, USA), 0,4 μ M de cada um dos “primers” ITS (IDT, USA), 2mM de $MgCl_2$ (LGC, Brasil), 2,5U da enzima Taq DNA polimerase (LGC, Brasil) e DNA das amostras dos pacientes e/ou dos protótipos de *Candida*, contidos em 20 μ L de solução. As condições de amplificação foram: denaturação inicial de 5 minutos à 95°C, seguida de 40 ciclos de 1 minuto à 95°C, 1 minuto à 47°C e 1 minuto à 72°C,

com extensão final de 5 minutos à 72°C, em termociclador (Biometra, Germany). A segunda amplificação foi realizada com os “primers” espécie-específicos (IDT, USA), nas mesmas condições utilizadas no primeiro ciclo, empregando-se a temperatura de “annealing” determinada para cada par de “primers”, conforme descrito na Tabela 1. Esta segunda etapa foi realizada com cada par de “primers” separadamente, aplicando-se 5µL do produto do primeiro PCR a tubos contendo nova solução de amplificação. Para cada conjunto de reações foram incluídos controles positivos contendo DNA dos cinco protótipos de *Candida*, e dois controles negativos, um da fase de preparo do “mix” de reagentes, e outro da fase de adição das amostras de DNA, com água apirogênica substituindo o DNA molde.

Tabela 1 - Primers utilizados nas amplificações, com as respectivas composições, temperaturas de hibridização e peso molecular dos amplificados

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Annealing</i>	<i>Amplicon</i>	<i>Referência</i>
β-actina	F: 5'-GTGGGCGCCCCAGGCACCA-3' R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTC-3'	45°C	515pb	Nakajima-Iijima et al., 1985
ITS1/4	F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	47°C	variável	Luo e Mitchell, 2002
CALB1/2	F: 5'-TTTATCAACTTGTCACACCAGA-3' R: 5'-ATCCCGCCTTACCACTACCG-3'	55°C	272pb	Luo e Mitchell, 2002
CGL1/2	F: 5'-TTATCACACGACTCGACACT-3' R: 5'-CCCACATACTGATATGGCCTACAA-3'	52°C	423pb	Luo e Mitchell, 2002
CPAR3/2	F: 5'-GCCAGAGATTAACTCAACCAA-3' R: 5'-CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC-3'	52°C	297pb	Luo e Mitchell, 2002
CTR1/2	F: 5'-CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT-3' R: 5'-TGGCCACTAGCAAAATAAGCGT-3'	52°C	357pb	Luo e Mitchell, 2002
CKR2/3	F: 5'-ACTACACTGCGTGAGCGGAA-3' R: 5'-AAAAAGTCTAGTTCGCTCGG-3'	52°C	362pb	Bougnoux et al., 1999

F= forward; R=reverse; CALB= *C.albicans*; CGL= *C.glabrata*; CPAR= *C.parapsilosis*; CTR= *C.tropicalis*; CKR= *C.krusei*; pb= pares de base

5.8 Determinação do limiar de detecção do DNA de *Candida* spp. e avaliação da reatividade cruzada (inter-espécies) dos sistemas de amplificação

Para avaliar o limiar de detecção da PCR, os ensaios foram realizados com DNA total, extraído de uma amostra de sangue obtida de um indivíduo saudável, (sem infecção), misturado a diferentes concentrações do DNA extraído das cinco espécies, até atingir o equivalente a um genoma de *Candida* (aproximadamente 37 fentogramas de DNA) (Riggsby et al., 1982).

Os testes de reatividade cruzada foram realizados com as amostras de DNA obtidas das cinco espécies, submetidas a amplificações pelos cinco pares de *primers* utilizados no estudo.

5.9 Determinação do limiar de detecção do DNA de *C.albicans* em diferentes volumes de sangue

Com o intuito de verificar se a detecção de DNA de *Candida* pode variar na dependência do volume de sangue obtido dos pacientes, ou seja, se 250 µL utilizados no estudo resultaria em menor número de amostras positivas em relação ao teste com volumes maiores de sangue, amplificações foram realizadas a partir de três diferentes volumes: 250 µL, 500 µL e 1 mL.

A extração de DNA foi realizada a partir de três alíquotas de 1 mL de sangue de um indivíduo saudável. Após a extração, as amostras foram re-suspensas em 1 mL de tampão Tris-EDTA 1M. A este volume de solução, foram adicionados 35 fentogramas do DNA de *C.albicans*, ou seja, o equivalente a um genoma do fungo. Após homogeneização, de uma das alíquotas de 1 mL foram retirados, com auxílio de micropipeta, 250 µL da solução, da segunda alíquota 500 µL, e os volumes transferidos a dois

microtubos diferentes. A terceira alíquota de 1 mL permaneceu inalterada. A partir dessas três alíquotas (250 µL, 500 µL e 1 mL), 20µL foram adicionados aos tubos de reação e submetidos às amplificações. Este procedimento foi repetido dez vezes para cada uma das alíquotas (10 X 250 µL; 10 X 500 µL e 10 X 1 mL).

5.10 Detecção do material amplificado

A detecção dos amplificados foi realizada por eletroforese em géis de agarose a 2% (Invitrogen, USA), em cubas horizontais modelo HE-58 (Life Technologies, USA), com tampão Tris-ácido acético-EDTA (TAE) pH 8,0. Os géis foram revelados com brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/mL em tampão TAE e os resultados registrados em sistema de fotodocumentação (Vilber Lourmat, France).

5.11 Digestão enzimática dos produtos de PCR

Para os casos em que as amostras de DNA de pacientes amplificaram em algum dos cinco sistemas espécie-específicos, mas os resultados das hemoculturas foram negativos, foram realizadas digestões enzimáticas, com o intuito de confirmar se as bandas observadas nos géis eram específicas.

Utilizando-se o programa CLC Free Workbench 4.6.1 (www.clcbio.com), foram selecionadas enzimas com um único sítio de restrição nas seqüências dos cinco amplificados de *Candida*, gerando dois fragmentos de DNA com

pesos moleculares distintos e facilmente identificados em géis de agarose (Tabela 2).

O protocolo de digestão enzimática foi realizado adicionando-se 100 ng dos produtos de amplificação a 20 µL de solução contendo 5U de cada enzima de restrição. A mistura foi incubada à 37°C por 3 horas e os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em TAE, pH 8,0. Os géis foram revelados com brometo de etídeo e registrados em sistema de fotodocumentação (Nho et al., 1997).

Tabela 2 - Enzimas empregadas nas digestões enzimáticas dos produtos de amplificação

Espécie	Amplicon (pb)	Enzima de restrição (New England Biolabs, USA)	Produtos de digestão (pb)
<i>C.albicans</i>	272	Nla III	178, 94
<i>C.glabrata</i>	423	Nla III	322, 101
<i>C.parapsilosis</i>	297	Ava I	228, 69
<i>C.tropicalis</i>	357	Ava I	251, 106
<i>C.krusei</i>	362	Nla III	230, 132

pb= pares de base

5.12 Seqüenciamento automatizado dos produtos de PCR

Alíquotas dos mesmos amplificados submetidos à digestão enzimática, foram seqüenciadas no equipamento ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, USA), localizado no Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM-52) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Após eletroforese dos produtos amplificados, fragmentos de gel contendo as bandas foram recortados e colocados em microtubos. Após procedimento de purificação pelo QIAquick® Extraction Gel kit (Qiagen,

Germany), as amostras de DNA foram inicialmente submetidas à precipitação com isopropanol e, em seguida, à amplificação, adicionando-se a 100 ng do produto amplificado, 3,2 pmol dos “primers” “forward” e “reverse”, em tubos separados, 2 µL de “mix” Big Dye Terminator Ready Reaction (Applied Biosystems, USA), 4,4 µL do tampão Tris-HCl, 200 mM pH 9,0 e 5 mM de MgCl₂. A etapa de extensão enzimática foi realizada em termociclador (PT100, MJ Research, USA) e os produtos obtidos foram aplicados ao gel de poliacrilamida.

As seqüências nucleotídicas obtidas nos seqüenciamentos foram comparadas às seqüências de *Candida* disponíveis no GenBank, com o auxílio do programa BLAST - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

5.13 Controle dos processos de amplificação e dos riscos biológicos

No Laboratório de Investigação Médica em Pediatria Clínica (LIM-36) do Instituto da Criança - HC-FMUSP, onde este estudo foi realizado, são aplicados processos que objetivam a minimização dos riscos de contaminação das amplificações, a saber: compartimentalização do espaço físico em três áreas (preparo dos reagentes, extração das amostras clínicas e reações de amplificação), utilização de reagentes de lote controlado e em alíquotas para evitar diversos ciclos de congelação e descongelação dos mesmos, uso de material descartável “DNase” e “RNase-free”, jogos de micropipetas e instrumental específico de cada área, aventais, luvas descartáveis, etc.

Utiliza-se ainda protocolo específico para a inativação do brometo de etídeo antes de seu descarte. Os géis corados com brometo são desprezados

em recipientes para resíduos químicos, e posteriormente enviados para incineração. A visualização dos géis em transiluminador pela luz ultravioleta é realizada em sistema de foto-documentação, que dispensa o uso de óculos de proteção.

5.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”) – versão 13.0.

Para as análises estatísticas foram considerados emparelhados somente os resultados das amplificações por PCR das amostras colhidas no máximo 12 horas antes ou depois da coleta para as hemoculturas dos pacientes do grupo 1.

A concordância entre os resultados obtidos pelas duas técnicas (PCR e hemocultura) foi avaliada pelo teste de McNemar (Kirkwood, 1988). O teste foi também aplicado na comparação das duas técnicas, em períodos diferentes durante a internação, ou seja, resultados das hemoculturas e PCR realizadas em três tempos: início da internação (tempo 1), período intermediário (tempo 2) e período imediatamente anterior à alta ou óbito dos pacientes (tempo 3).

As variáveis tempo de permanência dos pacientes na UTI e PRISM foram ainda comparadas entre os pacientes do grupo 1, com os resultados positivos e negativos de hemoculturas e de PCR, por intermédio de suas medianas, utilizando-se o teste de Mann-Whitney (Kirkwood, 1988).

Em todas as análises foi adotado nível de significância de 5%.

6. RESULTADOS

6.1 A técnica de nested-PCR: avaliação da reatividade cruzada e limiares de detecção de *Candida* spp.

Tanto as amplificações realizadas com os “primers” ITS1/ITS4, quanto com os “primers” espécie-específicos (no segundo “round”) resultaram em padrões de bandas característicos e específicos para cada uma das cinco espécies de *Candida*, não ocorrendo reações cruzadas (Figuras 1 e 2).

Em relação ao limiar de detecção, a técnica utilizada foi capaz de amplificar até 10 fentogramas de DNA no segundo “round” de amplificação (que corresponde a menos de 1 genoma/mL de sangue) para *C.albicans*, *C.parapsilosis* e *C.tropicalis*; e até 100 fentogramas de DNA para *C.glabrata* e *C.krusei*, equivalente a 5 genomas/mL de sangue (Figura 3).

6.2 Avaliação do limiar de detecção do DNA de *C.albicans* em diferentes volumes de sangue

A técnica de PCR foi aplicada a cada um dos três volumes (250µL, 500µL e 1 mL) derivados do sangue de indivíduo saudável semeado artificialmente com o correspondente a 1 genoma de *C. albicans*. Foram realizadas 10 amplificações para cada um dos volumes, observando-se resultados positivos em cinco dos testes para o volume de 250µL, em quatro para o volume de 500µL, e em cinco para o volume de 1mL.

Figura 1. Eletroforese em gel a 2% mostrando produtos das amplificações dos protótipos de *Candida* spp. com primers ITS1 e ITS4

M=Marcador de peso molecular de 100pb (GE)
 1=controle negativo 4=DNA de *C.parapsilosis*
 2=DNA de *C.albicans* 5=DNA de *C.tropicalis*
 3=DNA de *C.glabrata* 6=DNA de *C.krusei*

Figura 2. Eletroforese em gel a 2% mostrando produtos das amplificações dos protótipos de *Candida* spp. com primers específicos

A – Primers CALB1 e CALB2 (*C.albicans*)
B – Primers CTR1 e CTR2 (*C.tropicalis*)
 M=Marcador de peso molecular de 100pb (GE)
 1=controle negativo 4=DNA de *C.parapsilosis*
 2=DNA de *C.albicans* 5=DNA de *C.tropicalis*
 3=DNA de *C.glabrata* 6=DNA de *C.krusei*

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 2% e os limiares de detecção da nested-PCR com DNA total humano misturado a diferentes concentrações de DNA de *C.albicans*.

A – Primers ITS1 e ITS4
B – Primers CALB1 e CALB2
 M = marcador de peso molecular (GE)
 1=controle negativo 5=100 fentogramas
 2=100 picogramas 6=10 fentogramas
 3=10 picogramas 7=1 fentograma
 4=1 picograma

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando as amplificações do paciente W.I.S. em algumas amostras de sangue coletadas durante o período de internação.

A – Primers CALB1 e CALB2 (*C.albicans*)
B – Primers CGL1 e CGL2 (*C.glabrata*)
 M = marcador de peso molecular (GE)
 1=controle negativo 5=7ª coleta
 2=1ª coleta 6=9ª coleta
 3=3ª coleta 7=DNA controle positivo
 4=4ª coleta

6.3 Pacientes dos grupos 1 e 2: dados demográficos, clínicos e fatores de risco associados

Na tabela 3 (Anexo C) encontram-se descritos os dados demográficos, doenças de base e condições clínicas associadas, dos 58 pacientes do grupo 1. Os resultados das hemoculturas, uroculturas, culturas de outros materiais biológicos, e das PCR, estão relacionados na tabela 4 (Anexo D). Para o grupo 2, os dados encontram-se nas tabelas 5 e 6 (Anexos E e F).

Em relação aos dados demográficos do grupo 1, 32 (55,2%) eram do sexo masculino e 26 (44,8%) do sexo feminino, e a idade variou de dois meses a 20 anos incompletos, com mediana de 32 meses (dois anos e oito meses).

O escore PRISM dos pacientes nas primeiras 24 horas após admissão na UTI variou de 9 a 24, com mediana de 13; o tempo de permanência na unidade de internação variou de seis a 79 dias, com mediana de 19,5 dias.

Todos os pacientes do grupo 1 (100%) receberam antibioticoterapia de amplo espectro, com associação de dois ou mais medicamentos, por mais de 72 horas, bem como cateter venoso central por períodos prolongados, e somente sete pacientes (12,1%) receberam nutrição parenteral.

Ainda neste grupo, 13 pacientes (22,4%) receberam terapia antifúngica profilática seguindo protocolo clínico adotado na instituição; 17 (29,3%) receberam terapia empírica por apresentarem, em algum momento da internação, suspeita clínica de infecção fúngica; 18 (31%) receberam antifúngico terapêutico após terem resultados positivos de cultura em materiais provenientes de diversos órgãos ou sistemas, incluindo sangue, e 10 pacientes (17,3%) não receberam terapia antifúngica em nenhum momento durante a internação. O índice de mortalidade neste grupo foi de 41,4%.

No grupo 2, 11 pacientes (50%) eram do sexo masculino e 11 (50%) do sexo feminino. A idade variou de dois meses a 10 anos incompletos, com mediana de 15,5 meses (um ano, três meses e 15 dias). O escore PRISM variou de 3 a 8 com mediana de 6 e, em relação ao tempo de internação na UTI, a mediana foi de 7,5 dias, variando de 3 até 28 dias.

Neste grupo, os pacientes foram internados na UTI para recuperação de cirurgias de pequeno porte, e alguns apresentavam neuropatias agudas ou crônicas, mas nenhum era portador de doença de base causadora de imunodepressão ou se encontrava em estado crítico. Dos 22 pacientes, 11 (50%) utilizaram cateter venoso central, 14 (63,6%) receberam antibioticoterapia (não mais que dois antibióticos), porém, nenhum dos pacientes deste grupo preenchia critérios para inclusão no grupo 1. Não houve óbitos neste grupo.

6.4 Resultados das hemoculturas e PCR

As hemoculturas foram positivas em nove (15,5%) dos 58 pacientes do grupo 1 (Tabela 7). Foram isoladas e identificadas *C.albicans* em quatro pacientes, *C.tropicalis* em três, *C.parapsilosis* em um e *C.krusei* em um paciente (Tabela 8). As culturas identificaram, nos nove casos, uma única espécie infectante. Não houve isolamento de *C.glabrata* em nenhuma amostra de sangue dos pacientes deste grupo.

As amplificações por PCR detectaram DNA de *Candida* em 15 (25,9%) dos 58 pacientes, incluindo os nove com hemoculturas positivas (Tabela 7). Por estas reações foram identificadas *C.tropicalis* em seis pacientes, *C.albicans* em

cinco, *C.glabrata* em quatro, *C.parapsilosis* em dois e *C.krusei* em um paciente (Tabela 8).

Tabela 7 - Resultados das hemoculturas e amplificações por PCR dos 58 pacientes do grupo 1

Hemocultura	PCR		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	43	6	49
Positivo	0	9	9
Total	43	15	58

Tabela 8 - Espécies de *Candida* identificadas pelas hemoculturas e por PCR nas amostras de sangue dos 58 pacientes do grupo 1

Hemoculturas	PCR
<i>C.albicans</i> (4)	<i>C.albicans</i> (5)
<i>C.tropicalis</i> (3)	<i>C.tropicalis</i> (6)
<i>C.parapsilosis</i> (1)	<i>C.parapsilosis</i> (2)
<i>C.glabrata</i> (0)	<i>C.glabrata</i> (3)
<i>C.krusei</i> (1)	<i>C.krusei</i> (1)

Nos pacientes com hemoculturas e PCR positivos, houve concordância na identificação das espécies em oito dos nove casos (88,9%), pois em um dos pacientes (nº 32 - W.I.S.), as amplificações identificaram mais de uma espécie infectante: *C.albicans* e *C.glabrata* (co-infecção), enquanto pela cultura foi isolada somente *C.albicans* (Figura 4).

Em outro paciente deste grupo (nº 34 - F.F.S.), a PCR também identificou mais de uma espécie: nas amostras coletadas no período inicial de internação, foi detectada *C.albicans*, e nos dias que antecederam o óbito *C.tropicalis*. Os resultados das hemoculturas foram persistentemente negativos.

Ainda neste grupo, houve detecção de *C.glabrata* por PCR em uma única amostra de sangue, entre seis coletadas de um paciente que utilizava cateter venoso central (nº 55 - E.A.O.). Quando os resultados das culturas foram consultados no prontuário do paciente, observou-se que havia sido realizada uma cultura de cateter no dia seguinte ao da coleta de sangue utilizado na PCR, com resultado positivo para *Candida* não albicans (> 100 UFC).

A tabela 9 apresenta os resultados das hemoculturas e PCR realizadas em três diferentes tempos de internação dos pacientes do grupo 1. Observou-se que nos períodos iniciais, a positividade das hemoculturas foi mais elevada, caindo com o passar do tempo (sete em T1, seis em T2 e três em T3), enquanto que para a técnica de PCR os resultados permaneceram positivos por mais tempo (10 em T1, 14 em T2 e 11 em T3).

Tabela 9 – Resultados das hemoculturas e PCR, realizadas em três diferentes tempos durante o período de internação dos pacientes do Grupo 1

Hemocultura T1	PCR T1		Hemocultura T2	PCR T2		Hemocultura T3	PCR T3	
	Neg	Pos		Neg	Pos		Neg	Pos
Neg	48	3	Neg	44	8	Neg	47	8
Pos	0	7	Pos	0	6	Pos	0	3
Total	48	10	Total	44	14	Total	47	11

No grupo 2 não houve isolamento de *Candida* spp. em nenhum dos 22 pacientes, tanto nas culturas de sangue como em outros materiais biológicos, e em apenas um paciente do grupo (nº 3 - G.H.P.), a PCR identificou *C.glabrata* em duas de três amostras coletadas durante o período de internação.

6.5 Resultados das digestões enzimáticas e reações de seqüenciamento

Amostras de seis pacientes do grupo 1 e um paciente do grupo 2 foram positivas somente nas amplificações por PCR, e digestões enzimáticas destes amplificados foram realizadas para confirmar a especificidade das bandas observadas nos géis de agarose. Nas sete amostras, as digestões resultaram em duas bandas de peso molecular idênticos aos obtidos com os DNA extraídos dos protótipos de *Candida* spp. (Figura 5A).

Posteriormente, os sete amplificados (seis pacientes do grupo 1 e um paciente do grupo 2) foram submetidos às reações de seqüenciamento automatizado (Figura 5B). As homologias destas seqüências com aquelas de isolados de *Candida* spp. disponíveis no GenBank, variaram de 94 a 99% (Tabela 10).

Tabela 10 - Homologias entre as seqüências dos amplificados obtidos dos seis pacientes do grupo 1 e um paciente do grupo 2, e dos isolados de *Candida* spp. (GenBank). Estes pacientes apresentaram resultados positivos apenas por PCR

DNA <i>Candida</i> - Pacientes	DNA <i>Candida</i> - GenBank	Homologia
<i>C.tropicalis</i> - H.M.A. (Grupo 1)	<i>C.tropicalis</i> - AB437071.1 (IFM41420)	98%
<i>C.glabrata</i> - W.I.S. (Grupo 1)	<i>C.glabrata</i> - AB365314.1 (11v02)	97%
<i>C.albicans</i> - F.F.S. (Grupo 1)	<i>C.albicans</i> - AB437012.1 (IFM55385)	98%
<i>C.tropicalis</i> - F.F.S. (Grupo 1)	<i>C.tropicalis</i> - AB437076.1 (IFM52013)	98%
<i>C.tropicalis</i> - C.M.S.P. (Grupo 1)	<i>C.tropicalis</i> - AB437085.1 (IFM55049)	99%
<i>C.parapsilosis</i> - G.F.S. (Grupo 1)	<i>C.parapsilosis</i> - EU552500.1(L6051)	99%
<i>C.glabrata</i> - W.F.O. (Grupo 1)	<i>C.glabrata</i> - AB032177.1 (IFO0622)	94%
<i>C.glabrata</i> - G.H.P. (Grupo 2)	<i>C.glabrata</i> - AY939794.1 (VA104009-04)	98%

Figura 4. A – Eletroforese em gel a 2,5% mostrando os produtos de amplificação e respectivos fragmentos após digestão enzimática com Nla III e Ava I, dos pacientes F.F.S. e W.I.S. do Grupo 1, e dos protótipos de *Candida* spp.

B – Seqüenciamento dos produtos amplificados dos pacientes F.F.S. e W.I.S. do Grupo 1. Eletroferograma e homologias com as sequências do *GenBank*

6.6 Análise estatística

O teste de McNemar aplicado aos resultados obtidos por ambas as técnicas (hemoculturas e PCR) mostrou que a discordância encontrada é estatisticamente significativa, favorecendo a PCR ($p = 0,031$).

O mesmo teste foi utilizado para verificar se as duas técnicas concordavam ao longo do tempo. As análises dos dados obtidos (Tabela 9) indicam ausência de discordância no tempo 1 ($p = 0,250$), e presença de discordância nos tempos 2 e 3 ($p = 0,008$ para ambos), também favorecendo a PCR.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as medianas de PRISM do grupo 1, quando analisadas de acordo com a positividade das hemoculturas e das PCR (Mann-Whitney, $p = 0,054$ e $p = 0,143$, respectivamente). O mesmo foi observado em relação às medianas de tempo de permanência na UTI (Mann-Whitney, $p = 0,923$ e $p = 0,873$, respectivamente).

7. DISCUSSÃO

A elevada morbi-mortalidade atribuída às candidemias em pacientes criticamente enfermos exige a definição do diagnóstico laboratorial de forma rápida e precisa, possibilitando a prescrição de terapia antifúngica precoce e melhorando o prognóstico dos pacientes. Crianças internadas em unidades de cuidados intensivos estão entre os grupos pediátricos com maior risco de desenvolver infecção fúngica oportunística durante a internação hospitalar (McDonald et al., 1998; Maródi e Johnston Jr, 2007). Assim, o desenvolvimento de métodos diagnósticos com maior poder de detecção do patógeno em relação aos métodos convencionais de cultivos, histológicos ou sorológicos, é desejável e necessário (Colombo et al., 2006).

7.1 O emprego da técnica de PCR e nested-PCR na identificação das espécies de *Candida*

Desde a década de 1990, diversos autores têm desenvolvido métodos moleculares de diagnóstico para a detecção de seqüências genômicas específicas de *Candida*. Dentre estes, a técnica de PCR é prática e rápida, apresentando potencial para a detecção precoce da levedura (Chen et al., 2002; Iwen et al., 2002; Colom et al., 2006).

Diferentes genes de *Candida* têm sido utilizados como alvos das reações de amplificação, tanto os presentes em cópia única, tais como seqüências do gene da proteína de choque térmico HSP90, seqüências do gene ERG11, o gene da quitina sintetase etc; como os presentes em múltiplas cópias, entre eles o grupo de genes do DNA ribossômico. A vantagem destes

está em aumentar o poder de detecção dos métodos de amplificação, além de possibilitar a diferenciação das espécies dentro um mesmo gênero de fungos (Miyakawa et al., 1993; Jordan, 1994; Einsele et al., 1997; Morace et al., 1997; Flahaut et al., 1998; Chen et al., 2000; Ahmad et al., 2002).

Diversos estudos foram realizados sobre o emprego da técnica de PCR para a detecção do DNA genômico de *Candida*. Em alguns, as amplificações foram realizadas a partir dos isolados, outros a partir de material dos balões de hemoculturas, outros ainda amplificaram amostras sanguíneas semeadas artificialmente com leveduras (Holmes et al., 1994; Shin et al., 1997; Mannarelli et al., 1998; Elie et al., 1998; Turenne et al., 1999; Chang et al., 2001; Luo e Mitchell, 2002).

Após a amplificação, algumas metodologias já foram empregadas para a confirmação das espécies detectadas por PCR, entre elas a restrição enzimática (RFLP), hibridizações com sondas específicas biotiniladas ou marcadas com radioisótopos, e finalmente os seqüenciamentos dos materiais amplificados, que constituem o método confirmatório de escolha (Einsele et al., 1997; Elie et al., 1998; Flahaut et al., 1998; Morace et al., 1999; Wahyuningsih et al., 2000; Selvarangan et al., 2003; Moreira-Oliveira et al., 2005; White et al., 2005).

Os resultados desses estudos demonstraram o potencial da técnica de PCR para detectar *Candida* com sensibilidade e especificidade elevadas, quando comparada aos métodos convencionais de diagnóstico, particularmente às hemoculturas. Demonstraram ainda que a técnica permite a identificação

precisa das espécies infectantes, enquanto os métodos fenotípicos podem falhar na diferenciação (Ellepola e Morrison, 2005).

Coignard et al. (2004) utilizaram PCR com hibridização e seqüenciamento automatizado, para confirmar a identificação fenotípica de 935 isolados de diversas espécies de *Candida*. Houve discordância de resultados em 4,6% dos isolados; entre estes, nove amostras identificadas como *C.albicans* pelos métodos fenotípicos, foram re-identificadas pelo método molecular como sendo *C.dubliniensis*. Outros autores também relataram resultados discordantes na identificação de espécies de *Candida*, quando realizada pelos dois métodos (Shin et al., 1997; Elie et al., 1998; Carvalho et al., 2007).

A técnica de PCR tem sido empregada para detecção de *Candida* diretamente nas amostras biológicas de pacientes com candidemia comprovada por isolamento, ou em pacientes com risco de desenvolver a doença, porém sem evidências laboratoriais de infecção, sempre comparada aos métodos convencionais de diagnóstico.

No estudo de Einsele et al. (1997), amplificações por PCR foram realizadas em amostras de sangue de pacientes com infecção fúngica invasiva, comprovada por culturas e/ou métodos histológicos, e em pacientes colonizados, mas sem evidências de infecção hematogênica. A sensibilidade do método nos pacientes com infecção comprovada foi de 100%, quando pelo menos duas amostras de sangue dos pacientes foram avaliadas. A especificidade foi de 98%, pois alguns testes foram positivos em amostras de

pacientes sem evidência laboratorial de infecção (considerados resultados falso-positivos).

Amostras sanguíneas de 72 pacientes portadores de neoplasias hematológicas, coletadas em dias consecutivos, foram analisadas por PCR, seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP), e os resultados das amplificações foram comparados às hemoculturas. O método molecular detectou *Candida* em amostras coletadas de 31 pacientes, enquanto os isolamentos por cultura ocorreram em quatro deles; em 77,4% dos casos a PCR-RFLP identificou *C.albicans*. Dos 72 pacientes, 14 (19,4%) tiveram diagnóstico confirmado de candidíase disseminada. Destes 14 pacientes, a PCR foi positiva em 13 (92,8% de sensibilidade), as culturas foram positivas em apenas três (21,4%) e os 11 casos restantes, foram diagnosticados por exames histológicos ou autópsia. Em alguns pacientes do estudo, as amplificações foram positivas em apenas uma amostra de sangue, refletindo possivelmente a transitoriedade da fungemia (Morace et al., 1999).

Wahyuningsih et al. (2000) aplicaram a técnica de PCR e hibridização com sondas específicas para identificação das espécies de *Candida*, em soros de pacientes portadores de vaginites, de candidíase mucocutânea crônica (CMCC), de infecção hematogênica comprovada, e de pacientes em risco de desenvolver candidemia, porém sem evidências laboratoriais de infecção. Os testes foram negativos em todas as amostras de soro dos pacientes com vaginites e CMCC. Em três de nove pacientes com risco de infecção, houve detecção do DNA de *Candida*, apesar das culturas de sangue resultarem

negativas. Nos casos da doença confirmada por hemoculturas (n=8), os testes foram positivos em 100% dos casos.

Poucos foram os estudos realizados com PCR de dupla amplificação (semi-nested ou nested-PCR), técnica que aumenta o poder de detecção do patógeno e, quando “primers” específicos são empregados na segunda etapa da reação, permite a diferenciação das espécies de *Candida*.

Os primeiros autores a utilizar a nested-PCR foram Chryssanthou et al., em 1994, com o objetivo de aumentar o poder de detecção de *Candida* em amostras clínicas. A técnica de dupla amplificação foi capaz de detectar até 1pg de DNA de *C.albicans*. Foram realizadas amplificações em amostras de soro de 17 pacientes com candidemia comprovada por culturas e os resultados foram positivos em 15 deles; a técnica também detectou *Candida* em soro de cinco pacientes, de um total de sete indivíduos transplantados com hemoculturas negativas. Estes pacientes tiveram diagnóstico de candidíase disseminada por autópsia.

Polanco et al. (1999) desenvolveram modelo experimental de candidíase disseminada para determinar a sensibilidade da técnica de nested-PCR e comparar às hemoculturas. A dupla amplificação permitiu aumento de sensibilidade de dez vezes em relação à PCR simples. A positividade desta última foi inferior à obtida pelas hemoculturas (sistema lise-centrifugação), respectivamente 25 e 37,5% das amostras. Os testes com nested-PCR detectaram *Candida* em 52,5% das amostras de sangue dos animais e, associada às culturas, elevou a sensibilidade para 62,5%.

Estudo semelhante foi realizado por Bougnoux et al. (1999) que compararam a sensibilidade da nested-PCR em sangue e soro de animais experimentalmente infectados. Os testes foram positivos em 86% das amostras de sangue e, surpreendentemente, em 93% das amostras de soro, demonstrando que o DNA de *Candida* pode ser detectado sob forma livre. Uma das hipóteses sugeridas pelos autores para os melhores resultados em amostras de soro foi uma possível falha nos procedimentos de extração do material genômico a partir do sangue total.

A técnica de semi-nested PCR (snPCR) foi utilizada por Ahmad et al. (2002), e foi positiva em 56,2% das amostras de soro de 16 pacientes com suspeita clínica de candidemia, enquanto as hemoculturas foram todas negativas. Estes pacientes, no entanto, apresentavam culturas positivas em outros sítios do organismo (urina, lavado broncoalveolar etc), além de outras condições predisponentes para desenvolver a infecção invasiva. Ainda neste estudo, a técnica foi positiva para 100% dos pacientes (n=12) com candidemia comprovada por isolamento em hemoculturas.

7.2 A nested-PCR do presente estudo: reatividade cruzada, limiares de detecção e tempo de execução do teste.

No presente estudo, a técnica de PCR foi empregada para detecção e identificação das cinco espécies de *Candida* de maior relevância clínica, pois estão associadas a mais de 90% dos casos de candidemia em hospitais terciários dos EUA, Canadá, diversos países da Europa e América Latina,

incluindo o Brasil (Tortorano et al., 2006; Colombo e Guimarães, 2003; Colom et al., 2006; Pfaller e Diekema, 2007).

Apesar dos bons resultados, obtidos por diversos autores, com amplificações em amostras de soro, no presente estudo foram utilizadas amostras de sangue total dos pacientes, pelas razões a seguir: os resultados do estudo não trariam benefícios imediatos aos pacientes, e as condições clínicas dos mesmos eram críticas, submetendo-se a diversas coletas de sangue para a realização de exames necessários à manutenção da vida. Assim, foram utilizadas amostras de conveniência, ou seja, os volumes residuais dos tubos para a realização de hemogramas, para evitar coletas específicas para o estudo. Além disso, a experiência do LIM-36 em relação à amplificação de amostras de soro tem demonstrado que estas devem ser processadas imediatamente após a coleta, uma vez que grande parte delas contém inibidores da amplificação. O tempo decorrido entre a obtenção do material e a extração favorece a ação destas substâncias.

Os ensaios de nested-PCR possibilitaram a identificação das espécies por análise direta dos fragmentos amplificados em géis de agarose; as reações de amplificação resultaram em perfis característicos e específicos, para cada uma das cinco espécies de *Candida*, não ocorrendo reações cruzadas para os cinco sistemas de amplificação (Figura 1B). Ademais, três pacientes do grupo 1 tiveram culturas positivas para outras leveduras: *Pichia anomala* isolada de hemoculturas do paciente B.L.A.F.; *Rhodotorula* spp. isolada a partir de sangue e líquido ascítico do paciente R.P.B.R. e *Cryptococcus neoformans* no líquido ascítico do paciente D.Q.M. Nos três casos, as amplificações de todas

as amostras de sangue coletadas durante a internação na UTI resultaram negativas, demonstrando que a técnica não apresentou reatividade cruzada com outras leveduras oportunistas.

Os “primers” espécie-específicos deste estudo (Tabela 1) já haviam sido utilizados por outros autores. Luo e Mitchell (2002) selecionaram “primers” a partir de seqüências gênicas da região ITS, disponíveis no GenBank, que foram utilizados em PCR do tipo multiplex para amplificação de material genômico de algumas espécies de *Candida* isoladas em culturas, com resultados totalmente específicos. Entretanto, nesse estudo os autores não utilizaram “primers” de *C.krusei*. Assim, foram selecionados os descritos por Bournoux et al. (1999), que empregaram a técnica de nested-PCR em DNA extraído de isolados de *Candida*, de fungos filamentosos e diversas bactérias, também encontrando 100% de especificidade.

Antes da aplicação dos testes nas amostras dos pacientes do presente estudo, foram determinados os limiares de detecção para cada uma das espécies de *Candida* separadamente. Para tanto, foram avaliados diversos parâmetros de reação, tais como concentração de alguns reagentes ($MgCl_2$ e dNTPs), temperaturas de “annealing” dos “primers” e número de ciclos empregados nas duas etapas de amplificação, até que se atingisse o máximo poder de detecção em cada um dos testes. Os resultados mostraram que os cinco sistemas avaliados foram capazes de detectar entre 10 e 100 fentogramas do DNA da levedura, correspondendo a 1-5 genomas/mL de sangue (Figura 3). A capacidade de detecção para os cinco sistemas foi semelhante às encontradas em outros estudos, que também empregaram a

dupla amplificação ou marcação com sondas específicas (Polanco et al., 1999; Bougnoux et al., 1999; Wahyuningsih et al., 2000; Ahmad et al., 2002).

Ainda em relação aos limiares de detecção da PCR, os resultados demonstraram que não houve diferença nos três volumes sanguíneos avaliados: 250 μ L, 500 μ L e 1 mL. A realização do ensaio teve como objetivo verificar se pequenos volumes de sangue coletados de pacientes pediátricos influenciariam na positividade das reações de amplificação, uma vez que podem interferir nos resultados das hemoculturas (See, 2005).

Nestes testes verificou-se que, das dez amplificações realizadas de cada um dos três volumes, cerca de 40 a 50% foram positivas, porcentagens que poderiam ser consideradas insuficientes. Uma possível explicação seria o fato da seqüência alvo da amplificação (DNAr) ser repetitiva, e as repetições ocorrerem *in tandem*, isto é, todas em um mesmo cromossomo e contíguas. Esta característica faz com que exista a possibilidade da ocorrência de fenômeno do tipo “tudo ou nada”, ou seja, da seqüência do DNAr estar presente na amostra, porém não ter sido incluída naquela alíquota pipetada (20 μ L), particularmente quando as amplificações são realizadas a partir de concentrações limites de DNA (equivalente a uma cópia do genoma de *Candida*). O fenômeno foi observado por outros autores que utilizaram seqüências repetitivas *in tandem* como alvo de amplificações (Braz et al., 2007).

Uma maneira já empregada em outros estudos para definir o limiar de detecção de DNA de *Candida*, é a de semear artificialmente diferentes volumes de sangue de indivíduos sãos com suspensões de leveduras viáveis e diluir as

amostras até atingir o equivalente a 1 UFC/mL. As diversas diluições são semeadas em placas contendo meios de cultura, e simultaneamente são amplificadas por PCR. Deste modo é possível determinar com maior precisão o número mínimo de cópias genômicas que a técnica é capaz de detectar nas amostras clínicas (Einsele et al., 1997; Bougnoux et al., 1999; Carvalho et al., 2007). Entretanto, para que o procedimento fosse viável para o presente estudo, seria necessária infra-estrutura compatível com laboratório de microbiologia, não existente no LIM-36.

Uma das principais causas de resultados falso-negativos na técnica de PCR é a presença nas amostras clínicas, de substâncias que inibem a ação da enzima Taq DNA polimerase e que, em geral, são eliminadas durante os procedimentos de extração do material genômico. No presente estudo, as amostras de sangue utilizadas para as amplificações, permaneceram armazenadas em geladeira no Laboratório Clínico do ICr por períodos de até 10 dias, situação que favorece a ação de inibidores da amplificação e degradação do material genômico. Portanto, optou-se pela utilização do QIAmp® DNA mini blood kit, que foi especialmente desenvolvido para extração de DNA a partir de pequenos volumes de sangue (200 µL), e emprega membranas especiais para retenção do material genômico. As etapas de lavagens do material retido nestas membranas favorecem a retirada de inibidores da amplificação. Somado a isso, o kit possibilita a obtenção do material de modo rápido, com elevado teor de pureza e manuseio simultâneo de grande número de amostras (Löffler et al., 1997; Maaroufi et al., 2004; Aygan, 2006). Ainda assim, todas as amostras de DNA do estudo foram

previamente avaliadas quanto à possível presença de inibidores, em amplificações com *primers* do gene da proteína constitutiva β -actina (Nakajima-Iijima et al., 1985).

Com o objetivo de evitar o aparecimento de resultados falso-positivos, pela possibilidade de contaminação entre amostras (“carryover”), durante a realização das amplificações foram utilizados todos os procedimentos que minimizam os riscos de contaminação, bem como controles negativos em todas as reações (Wahyuningsih et al., 2000; Ahmad et al., 2002).

Devido ao elevado poder de detecção de patógenos em amostras clínicas, os riscos de reações falso-positivas por PCR são elevados (Colom et al., 2006). Portanto, foi necessário avaliar a possibilidade de amplificações em amostras de sangue de pacientes sem evidências de infecção hematogênica por *Candida*. Para este fim, foram selecionados os 22 pacientes do grupo 2 que, apesar de estarem internados na mesma unidade dos pacientes do grupo 1, e portanto compartilharem o mesmo ambiente, apresentavam risco significativamente mais baixo de desenvolver infecção fúngica. Estes pacientes não apresentavam doença de base imunossupressora, encontravam-se em condições clínicas mais estáveis em relação ao grupo 1, com risco mais baixo de óbito (mediana do PRISM = 6), tendo a maioria permanecido na UTI por períodos relativamente curtos (mediana de 7,5 dias). Ademais, nenhum deles recebeu terapia antifúngica durante a internação e todos evoluíram favoravelmente. A seleção destes pacientes na mesma unidade de internação facilitou o acesso às informações clínicas.

Finalmente, em relação ao tempo para a execução e obtenção de resultados, as nested-PCR do presente estudo puderam ser realizadas em até 24 horas, considerando o tempo transcorrido entre a extração de DNA a partir das amostras sangüíneas, até a identificação da espécie infectante. No caso das hemoculturas, o período mínimo para a liberação de resultados incluindo a identificação é de aproximadamente 72 a 96 horas (Mannarelli e Kurtzman, 1998; Ahmad et al., 2002).

7.3 PCR e hemoculturas nos pacientes do grupo 2

No grupo 2, os resultados das PCR foram negativos em todas as amostras de sangue avaliadas, com exceção do paciente nº 3 (G.H.P.). As hemoculturas e culturas de outros materiais biológicos (nos casos em que foram solicitadas) também resultaram negativas nestes pacientes, indicando concordância adequada entre os métodos (isolamentos e PCR). Considerando as duas amostras em que se detectou *C. glabrata* por PCR nesse paciente, houve baixo índice de resultados falso-positivos (4,5% do total). O fato comprova ainda, que o procedimento de lavagem da agulha do equipamento automatizado que realiza os hemogramas (“wash out”) é eficaz, evitando que uma amostra de sangue se misture à seguinte.

O paciente nº 3 (G.H.P.) foi internado na UTI por apresentar asma grave e broncopneumonias de repetição, e recebeu antibioticoterapia de amplo espectro (associação de dois antibióticos) durante os cinco dias de internação. No entanto, suas condições clínicas eram relativamente estáveis e não apresentava outros fatores predisponentes, considerando-se como baixo o

risco deste paciente desenvolver candidemia. Entretanto, como as amostras de sangue utilizadas nas reações de amplificação foram coletadas para a realização de hemogramas, muito provavelmente não foram utilizados procedimentos de assepsia do local das coletas, o que pode ter favorecido a amplificação de leveduras presentes na pele do paciente, que poderia estar colonizada com *C.glabrata* (Miyakawa et al., 1993; Morace et al., 1999).

Outra possibilidade seria a ocorrência de fungemia transitória, detectada por PCR, mas não pela hemocultura, devido ao maior poder de detecção da técnica molecular. O paciente poderia apresentar colonização por *Candida* spp. na pele, orofaringe e trato gastrointestinal, e a existência de solução de continuidade (punções arteriais e venosas), favoreceria a penetração do patógeno na corrente sangüínea.

Em pacientes sem comprometimento do sistema imunológico, as fungemias transitórias podem constituir processos auto-limitados, que seriam debelados pelo hospedeiro antes da instalação da infecção, o que explica porque indivíduos imunocompetentes convivem pacificamente com *Candida* spp. presentes em pele, orofaringe, mucosa vaginal e trato gastrointestinal (Lacaz et al., 2002; Colombo e Guimarães, 2003). O fato de a PCR ter identificado seqüências específicas de *C.glabrata* em duas de três amostras de sangue desse paciente, conforme os resultados do seqüenciamento automatizado (98% de homologia), fala a favor desta hipótese.

Outros autores documentaram resultados positivos por PCR em amostras sangüíneas de pacientes com risco de desenvolver candidemias,

porém sem evidências de infecção hematogênica, sugerindo a transitoriedade da fungemia (Morace et al., 1999; Ahmad et al., 2002).

7.4 PCR e hemoculturas no grupo 1

Todos os 58 pacientes do grupo 1 eram portadores de doença de base causadora de imunodepressão, receberam medicação imunossupressora ou ainda haviam sido submetidos a cirurgias de grande porte, com períodos de hospitalização prolongados. Todos receberam associação de dois ou mais antibióticos de amplo espectro e todos portavam cateter venoso central. As medianas do PRISM (13) e do tempo de permanência na UTI (19,5 dias) são indicadores de que os pacientes se encontravam em estado crítico.

A associação dessas condições clínicas aumenta a possibilidade dos pacientes de desenvolver infecção fúngica oportunística e, devido às dificuldades em se estabelecer o diagnóstico clínico e/ou laboratorial, a conduta empregada é a administração profilática ou empírica de medicamentos antifúngicos, em particular o fluconazol.

No grupo 1, 30 pacientes (51,7%) receberam terapia profilática e/ou empírica e 13 pacientes (22,4%) receberam antifúngico terapêutico, por terem culturas positivas para *Candida* em outros materiais biológicos que não o sangue, principalmente presença de leveduras em urina coletada com procedimentos adequados de assepsia (sondagem) e apresentando contagem >100.000 UFC/mL. Portanto, quase 75% dos pacientes deste grupo receberam terapia antifúngica sem infecção invasiva comprovada, o que pode ter reduzido a positividade das hemoculturas, de apenas 15,5% dos casos. O uso prévio de

terapia antifúngica inibiria o crescimento das leveduras em meios de cultura artificiais (Ellepola e Morrison, 2005; Dimopoulos et al., 2007).

Por outro lado, o uso de antifúngicos pode ter sido eficaz na prevenção da disseminação hematogênica e desenvolvimento de infecções invasivas na maioria dos pacientes que receberam os medicamentos. Pelz et al. (2001), em estudo prospectivo avaliando o impacto do fluconazol em pacientes internados em UTI cirúrgica, demonstraram a eficácia do uso profilático do medicamento na redução da incidência de infecções fúngicas.

A técnica de PCR do presente estudo detectou *Candida* spp. em 25,9% dos pacientes do grupo 1, com desempenho superior ao das hemoculturas ($p=0,031$). As amplificações foram positivas nos nove pacientes com isolamento de *Candida*, identificando as mesmas espécies isoladas. A concordância, porém, não foi de 100% nestes nove casos, pois no paciente nº 32 (W.I.S.), as amplificações identificaram duas espécies infectantes (*C.albicans* e *C.glabrata*), enquanto a hemocultura isolou apenas *C.albicans* (Figura 3).

Delineamento semelhante ao do presente estudo (Moreira-Oliveira et al., 2005) foi adotado em 225 pacientes (adultos e crianças) internados no Hospital da UNICAMP (Campinas, São Paulo) com elevado risco de desenvolverem fungemias, demonstrando isolamento de *Candida* spp. em 19,1% dos casos. A técnica de PCR detectou *Candida* spp. em 21,7% dos casos, positividade comparável às culturas. No entanto, as coletas de sangue para as amplificações por PCR foram realizadas a cada 15 dias durante o período de internação dos pacientes, o que pode ter interferido nos resultados, uma vez

que a fungemia é transitória. Os autores também consideraram o fato de terem empregado a PCR com um único *round* de amplificação como possível causa do baixo poder de detecção de *Candida* nas amostras de sangue desses pacientes. *Candida albicans* foi a espécie com maior frequência de isolamento e detecção por PCR, sendo a concordância de ambos os métodos de 83,8%.

Em relação à distribuição das espécies de *Candida* identificadas, no presente estudo houve discordância de resultados quando comparados os isolamentos e as amplificações. *Candida tropicalis* foi isolada em três casos de candidemia, enquanto o teste molecular identificou esta espécie no sangue de seis pacientes. *Candida albicans* aparece em segundo lugar, identificada em cinco pacientes, e pelas culturas foi isolada em quatro casos.

Dados divulgados sobre a distribuição das espécies de *Candida* em pacientes pediátricos, particularmente neonatos, demonstram que a maior parte das infecções é causada por *C.albicans* e *C.parapsilosis*, mas nos últimos anos tem ocorrido aumento na frequência de infecções por *C.tropicalis* (Chapman e Faix, 2003). No estudo de Singhi et al. (2004) sobre a frequência de candidemias em crianças internadas em UTI de um hospital terciário na Índia, a espécie mais frequentemente isolada foi *C.tropicalis* em 48,4% dos casos, seguida de *C.albicans* em 29,7%, o mesmo perfil encontrado no presente estudo, porém considerando-se os resultados das amplificações, e não pelos isolamentos.

No grupo 1, dos seis pacientes com detecção de *C.tropicalis* por PCR e/ou hemoculturas, dois eram portadores de neoplasias, um apresentava doença granulomatosa crônica, e um paciente, lúpus eritematoso sistêmico. Os

diversos estudos demonstram que *C.tropicalis* tem sido isolada mais freqüentemente de amostras clínicas de pacientes portadores de neoplasias e neutropenia (Pfaller e Diekema, 2007; Colombo e Guimarães, 2003).

No Brasil, a freqüência de candidemias por esta espécie é relativamente elevada, sendo a segunda ou terceira principal causa destas infecções em relatos publicados, porém por isolamentos (Colombo e Guimarães, 2003; Colombo et al., 2006; França et al., 2008).

Enquanto a PCR detectou *C.glabrata* em amostras de sangue de três pacientes do estudo, a espécie não foi isolada por hemoculturas. Ao se considerar a negatividade destas últimas para análise de distribuição de espécies em pacientes com risco de desenvolver candidemias, a freqüência encontrada estaria de acordo com alguns estudos publicados, que relatam poucos casos atribuídos a esta espécie em países da América Latina, incluindo o Brasil e, particularmente em pacientes pediátricos (Colombo et al., 2006; Pfaller, 2007; França et al., 2008). No entanto, de acordo com as diferenças encontradas na identificação das espécies pelos dois métodos (PCR e hemoculturas), é possível estimar mudanças na distribuição das espécies de *Candida* envolvidas nos episódios de candidemia, quando as técnicas moleculares forem utilizadas rotineiramente.

7.5 PCR e identificação de duas espécies de *Candida* na mesma amostra

O paciente nº 32 (W.I.S.) do grupo 1, para o qual foram identificadas duas espécies infectantes, foi internado na UTI pediátrica do ICr por apresentar síndrome do intestino curto e ter sido submetido a diversos procedimentos

cirúrgicos neste órgão. No momento da internação apresentava PRISM de 13, era portador de desnutrição grave, e recebeu antibioticoterapia de amplo espectro por ter tido diagnóstico de sepse. Permaneceu internado por 40 dias e evoluiu a óbito. O isolamento de *C.albicans* do sangue ocorreu após uma semana da internação e nas diversas amostras coletadas posteriormente, tendo sido a única espécie isolada. A PCR detectou *C.albicans* em 18 de 20 amostras analisadas deste paciente e, após 20 dias de internação, a detecção de *C.glabrata* foi simultânea à *C.albicans*, em nove de dez amostras.

No paciente nº 34 (F.F.S.), a PCR também identificou mais de uma espécie de *Candida*, somente que neste caso, a infecção não foi concomitante. Nas amostras coletadas no período inicial de internação (n=3) foi detectada *C.albicans*, e nos dias que antecederam o óbito (n=4), *C.tropicalis*. Neste paciente os resultados das hemoculturas (n=8) foram persistentemente negativos. A internação na UTI ocorreu devido à síndrome colestática associada à cirrose hepática, enquanto aguardava transplante. À admissão apresentava sinais e sintomas de choque séptico, PRISM de 21, recebendo antibioticoterapia de amplo espectro, além de hidrocortisona e introdução de cateter venoso central. Nos primeiros dias de internação, as hemoculturas foram positivas para *Staphylococcus aureus* e houve um único isolamento de *C.albicans* em urina (>100.000 UFC/mL) no 11º dia. Recebeu fluconazol a partir do 13º dia e evoluiu a óbito após 20 de internação.

Relatos da literatura demonstram que de 15 a 27% dos pacientes com candidemias podem estar simultaneamente infectados por bactérias, um dos fatores que dificulta o isolamento de fungos em culturas (Morace et al., 1999;

Klotz et al., 2007). No entanto, infecções hematogênicas com isolamento de mais de uma espécie de *Candida* têm sido descritas com menor frequência (Guerra-Romero et al., 1989; Yera et al., 2004). Em revisão de literatura entre os anos 1972 e 1995, Pulimood et al. (2002) encontraram apenas 12 publicações que relatavam infecções hematogênicas com isolamento de mais de uma espécie de *Candida*, com frequência variando de 1,6 a 6%.

Com o advento do meio de cultura que contém substratos cromogênicos Chromagar® *Candida* (BBL, USA), houve aumento do número de relatos de candidemias causadas por mais de uma espécie. Estudo retrospectivo conduzido em um hospital de especialidades clínicas e cirúrgicas de Madri (Espanha), no período de 1985 a 2006, revelou que os episódios de candidemia mista só foram observados a partir de 1995, quando foi introduzido na rotina laboratorial da instituição o meio Chromagar®. A frequência de infecção causada por mais de uma espécie ocorreu em 2,8% dos casos (Jensen et al., 2007).

Estudos sobre candidemias causadas por duas ou mais espécies de *Candida* em pacientes criticamente enfermos, demonstram que a combinação *C. albicans* e *C. glabrata* ocorre com maior frequência (Guerra-Romero et al., 1989; Vazquez et al., 1998; Boktour et al., 2004), como observado no paciente nº 32 (W.I.S.) do grupo 1.

O emprego da técnica de PCR na identificação de espécies de *Candida* tem demonstrado que os episódios causados por mais de uma espécie, na maior parte das vezes, não são detectados pelas hemoculturas. No estudo de Ahmad et al. (2002) foram identificadas candidemias causadas por duas

espécies de *Candida* em cinco de 12 pacientes com a infecção comprovada, enquanto as hemoculturas identificaram infecção concomitante em apenas três destes pacientes, o que não ocorreu em nenhum caso do presente estudo. Ainda neste mesmo estudo, a PCR detectou infecção por duas espécies em dois pacientes com culturas negativas (*C.albicans* e *C.tropicalis* em um caso e *C.tropicalis* e *C.glabrata* no outro caso). O mesmo fato foi observado no paciente nº 34 (F.F.S.) do grupo 1 (*C.albicans* e *C.tropicalis*).

Tirodker et al. (2003) aplicaram a técnica de PCR, que foi comparada com hemoculturas, em pacientes pediátricos com risco elevado de desenvolver candidemia. Em um dos casos estudados, duas espécies de *Candida* (*C.albicans* e *C.krusei*) foram detectadas por PCR, mas também foram isoladas pela hemocultura.

Mais recentemente, Alam et al. (2007) empregando sn-PCR, identificou duas espécies de *Candida* em 15% dos pacientes com culturas positivas e, em um paciente, foram identificadas três espécies causando a infecção (*C.albicans*, *C.parapsilosis* e *C.tropicalis*). As culturas identificaram, em todos os casos, uma única espécie infectante, assim como os isolamentos do presente estudo.

Parece não haver fatores de risco independentes para infecção causada por mais de uma espécie de *Candida*. Alguns autores relatam que pacientes com este tipo de infecção apresentam com frequência distúrbios graves do trato gastrointestinal (Guerra-Romero et al., 1989; Pulimood et al., 2002). Entretanto, outras condições predisponentes foram encontradas com maior frequência em pacientes submetidos a transplantes de órgãos, e portadores de

leucemias e neutropenias prolongadas (Boktour et al., 2004; Jensen et al., 2007).

Ainda de acordo com dados da literatura, fatores predisponentes e taxas de mortalidade parecem ser similares nas candidemias causadas por uma única espécie ou por mais de uma espécie (Guerra-Romero et al., 1989; Pulimood et al., 2002). No entanto, nos dois casos de infecção mista do presente estudo, a evolução clínica foi desfavorável, não se descartando a hipótese de que a segunda espécie infectante, *C.glabrata* para o paciente W.I.S. e *C.tropicalis* para F.F.S., pudessem ser resistentes ao fluconazol. Como estas cepas não foram isoladas pelas culturas, não foi possível determinar a suscetibilidade aos antifúngicos.

7.6 Pacientes com PCR positivas e hemoculturas negativas

O paciente nº 50 (W.F.O.) do grupo 1, com hemoculturas negativas e PCR positivas para *C.glabrata* também era portador da síndrome do intestino curto, além de trombose de veia cava superior, broncopneumonia aguda e insuficiência respiratória, tendo recebido PRISM de 10 à internação. Recebeu antibioticoterapia de amplo espectro, porém neste caso a evolução foi favorável, recebendo alta da UTI após 12 dias de internação, sem medicação antifúngica. Nas cinco amostras analisadas por PCR foi identificada *C.glabrata*, sendo que no primeiro dia de internação o resultado já era positivo, sugerindo que o paciente foi infectado na enfermaria onde permaneceu antes da admissão na UTI. As três amostras coletadas para culturas durante o período de internação foram negativas. Assim, para confirmar se as amplificações

obtidas eram específicas, foram realizadas as digestões enzimáticas e seqüenciamentos dos produtos das reações. A homologia com a seqüência de *C.glabrata* (IF 00622) do GenBank foi de 94%. É possível que este paciente também tenha apresentado episódio de candidemia transitória auto-limitada. Teria sido interessante verificar se houve internações posteriores para saber se o paciente desenvolveu infecção fúngica.

Singhi et al. (2004) encontraram 25% de crianças assintomáticas entre aquelas com isolamento de *Candida spp.* por hemoculturas. Estes pacientes não desenvolveram sinais de sepse e evoluíram favoravelmente, mesmo sem receber medicação antifúngica, o que também sugere a ocorrência de candidemia transitória. Este fato também foi observado por Stamos e Rowley (1995), em estudo semelhante conduzido em pacientes pediátricos.

É importante salientar que nos dois pacientes portadores da síndrome do intestino curto houve detecção de *C.glabrata* por PCR. É provável que a infecção tenha sido adquirida por via endógena, pela translocação de leveduras a partir do trato gastrointestinal para a corrente sangüínea, após procedimento cirúrgico (Colombo e Guimarães, 2003; Perlroth et al., 2007). Outros autores relatam associação de infecção hematogênica por *C.glabrata* em pacientes portadores de lesões intestinais (Pulimood et al., 2002; Jensen et al., 2007).

Outros dois pacientes do grupo 1, com detecção de candidemia por PCR e hemoculturas persistentemente negativas foram submetidos a terapias imunodepressoras: nº 36 (C.M.S.P.) com lupus eritematoso, e nº 43 (G.F.S.) portador de linfoma de grandes células. Ambos permaneceram internados por períodos prolongados, com PRISM de 13 no momento da admissão, além dos

fatores de risco já descritos para o grupo 1. O paciente C.M.S.P. recebeu fluconazol a partir do 9º dia de internação por apresentar piora do estado geral e candidíase oral, mantendo-se a medicação até o óbito que ocorreu no 25º dia de internação. A PCR detectou *C.tropicalis* a partir do 13º dia, com sete amostras positivas de 11 analisadas.

O outro paciente (G.F.S.) recebeu fluconazol a partir do 6º dia de internação por apresentar febre persistente e radiografia de tórax sugestiva de broncopneumonia fúngica; apresentou duas culturas de urina positivas para *C.albicans* (50.000 UFC/mL) e, como não houvesse melhora do quadro clínico, após 10 dias passou a receber anfotericina B coloidal por 15 dias. Como não houvesse melhora clínica foi administrado novamente fluconazol até o óbito (60 dias após a internação). Após uma semana de internação na UTI, a PCR detectou *C.parapsilosis* em 11 de 19 amostras, e o teste permaneceu positivo.

Da mesma forma que para os outros pacientes, como as culturas eram negativas, foram realizadas confirmações dos amplificadores obtidos. As digestões enzimáticas produziram fragmentos de pesos moleculares idênticos aos dos isolados de referência, e as análises dos seqüenciamentos revelaram homologies de 99%, confirmando a especificidade das amplificações.

Ainda no grupo 1, o paciente nº 5 (H.M.A.) era portador de doença granulomatosa crônica, evoluindo para choque séptico e óbito após 10 dias de internação na UTI. Na admissão o PRISM era de 21 e recebeu itraconazol devido à imagem pulmonar bilateral sugestiva de aspergilose. As hemoculturas do paciente foram negativas, mas a partir do 5º dia de internação, as culturas de urina (sonda vesical) foram positivas para *C.tropicalis* (>100.000 UFC/mL).

A PCR detectou a levedura na amostra de sangue coletada no 4º dia de internação e, de seis amostras analisadas até a data do óbito, em cinco houve detecção de *C.tropicalis*. Embora os resultados das culturas de urina concordassem com os das PCR, também neste caso foram realizadas as confirmações dos produtos amplificados. A análise do seqüenciamento revelou homologia de 98% com a seqüência disponível no GenBank (*C.tropicalis* IFM 41420).

7.7 PCR e hemoculturas: positividade durante o período de internação

Quando hemoculturas positivas foram comparadas às PCR em diferentes tempos durante a internação, observou-se discordância estatisticamente significativa entre as técnicas nos períodos intermediário e imediatamente anterior à alta (ou óbito). Este fato demonstra que o teste molecular permanece positivo por mais tempo quando comparado às culturas. O estudo de Einsele et al. (1997) demonstrou que em quatro pacientes com candidemias que foram tratadas, as amplificações por PCR permaneceram positivas até 14 dias após a negatização das hemoculturas (com mediana de 8 dias).

O maior poder de detecção da PCR em relação aos isolamentos permite não apenas diagnóstico de maior número de casos, como também monitoramento mais adequado de pacientes sob terapêutica antifúngica, uma vez que a negatização mais precoce das hemoculturas dificulta a decisão clínica de interrupção do tratamento. Por outro lado, a utilização de método de amplificação de DNA poderia ocasionar a detecção de leveduras não viáveis

(em pacientes recebendo antifúngicos), problema que poderia ser contornado com o emprego da análise de expressão fúngica (RT-PCR ou “Reverse-Transcriptase” PCR), ou ainda, e de forma mais completa, com técnicas de quantificação, em particular o Real-Time PCR partindo de amostras de DNA complementar (cDNA) (Bretagne e Costa, 2005; Schabereiter-Gurtner et al., 2007)

7.8 Limitações do estudo

Os resultados do presente estudo demonstram que a técnica de nested-PCR detectou DNA de *Candida*, em amostras de pacientes com risco de desenvolver candidemia, sem reatividade cruzada, com apenas um caso (4,8%) que poderia ser considerado falso-positivo.

Como já justificado anteriormente, não foi possível realizar coletas específicas para a realização das amplificações por PCR, o que também ocorreu em outro estudo que envolvia pacientes pediátricos (Tirodker et al., 2003). As coletas de sangue para PCR deveriam ter sido simultâneas às coletas para culturas, e em volumes iguais, o que permitiria estudo comparativo adequado. As variáveis presentes nesta fase do estudo tais como volume residual de sangue, tempo de armazenamento anterior às análises por PCR, assepsia inadequada do local de punção etc, podem ter interferido nos resultados, particularmente no poder de detecção da técnica molecular.

Durante a fase de padronização e validação de qualquer teste laboratorial, os custos decorrentes costumam ser relativamente elevados. No presente estudo, o número de pacientes avaliados foi relativamente pequeno,

entretanto, o número de testes moleculares foi elevado, considerando-se que para cada amostra de sangue foram utilizados sete diferentes sistemas de amplificação (β -actina, ITS e cinco sistemas espécie-específicos), além de controles negativos e positivos. O número total de testes e custos decorrentes levou à decisão de se restringir o número de pacientes no estudo.

O número restrito de pacientes impossibilitou que estes fossem agrupados de acordo com as condições clínicas predisponentes, com o tempo de permanência na UTI, tipo de tratamento antifúngico (terapêutico, empírico, profilático) etc.

Para validação da PCR, a análise de maior número de pacientes e a inclusão de grupo controle, composto por indivíduos sabidamente sem a doença, permitiria determinar valores preditivos positivos e negativos. No entanto, para este estudo, não foi possível obter material biológico de crianças saudáveis.

7.9. Perspectivas

Dando continuidade ao projeto de pesquisa ora apresentado, a padronização de PCR do tipo multiplex permitiria a detecção simultânea das cinco espécies de *Candida* investigadas no presente estudo, com redução dos custos e ganho de tempo (Carvalho et al., 2007). Além disso, a introdução dos métodos de amplificação quantitativos (Real Time PCR) na detecção de infecções fúngicas, tem possibilitado maior rapidez e praticidade na obtenção dos resultados, quando comparados aos métodos convencionais, e até mesmo às amplificações do tipo qualitativas. Estas técnicas possibilitam a

determinação do número de cópias genômicas do microrganismo presentes nas amostras analisadas, com pouca manipulação laboratorial, diminuindo os riscos de “carryover” e, por consequência, resultados falso-positivos. O monitoramento do número de cópias do patógeno por técnicas moleculares com elevada sensibilidade pode, em futuro próximo, facilitar o estabelecimento de critérios de diferenciação entre colonização e infecção fúngica, ou ainda para início e suspensão do tratamento.

8. CONCLUSÕES

- os sistemas de amplificação (nested-PCR) para a detecção de cinco espécies de *Candida* foram padronizados de maneira a atingirem limiares de detecção adequados (1-5 genomas/mL), sem reatividade cruzada.
- as amplificações mostraram maior poder de detecção de *Candida* em amostras de sangue de pacientes pediátricos internados em unidade de terapia intensiva, quando comparadas às hemoculturas.

9. ANEXOS

PRISM (Pediatric Risk of Mortality) – Variáveis fisiológicas

(Adaptado de Pollack et al., 1988)

Variáveis	Variação de acordo com a idade		Pontos
PA sistólica (mmHg)	Lactente	Crianças	
	130-160	150-200	2
	55-65	65-75	2
	>160	>200	6
	40-54	50-64	6
	<40	<50	7
PA diastólica (mmHg)	Todas as idades	>110	6
Frequência cardíaca (bpm)	>160	>150	4
	<90	<80	4
Frequência respiratória (resp/min)	61-90	51-90	1
	>90	>90	5
	apnéia	apnéia	5
PaO ₂ /FiO ₂ ^a	Todas as idades		
	200-300		2
	<200		3
PaCO ₂ ^b (mmHg)	Todas as idades		
	51-65		1
	>65		5
EC Glasgow ^c	Todas as idades	<8	6
Reações Pupilares	Todas as idades		
	Anisocóricas ou dilatadas		4
	Fixas e dilatadas		10
TP/TTPA	Todas as idades	>1,5 x controle	2
Potássio (mg/dL)	Todas as idades		
	3,0-3,5		1
	6,5-7,5		1
	<3,0		5
	>7,5		5
Calcio (mg/dL)	Todas as idades		
	7,0-8,0		2
	12-15		2
	<7,0		6
	>15		6
Glicemia (mg/dL)	Todas as idades		
	40-60		4
	250-400		4
	<40		8
	>400		8
Bicarbonato (mEq/L) ^d	Todas as idades		
	<16		3
	>32		3

a - não deve ser realizado em pacientes com "shunt" intra-cardíaco ou disfunção respiratória crônica; existe necessidade de amostra de sangue arterial; **b** - pode ser realizado com amostra de sangue capilar; **c** - não pode ser realizado em pacientes com sedação, paralisia, anestesia ou disfunção neurológica crônica; **d** - pode-se utilizar os valores medidos

Tabela 3 - Dados demográficos e condições clínicas associadas dos 58 pacientes do Grupo 1

No.	Paciente	Gênero	Idade (meses)	PRISM	Doença de base	A.A.E.	C.V.C.	N.P.P.	Terapia antifúngica	Permanência na UTI (dias)	Óbito
1	L.O.N.	M	84	13	Transplante medula óssea	Sim	Sim	Sim	Profilática	8	Não
2	V.M.A.	M	239	11	Leucemia linfóide aguda	Sim	Sim	Não	Profilática	8	Não
3	D.Q.M.	M	187	13	Imunodeficiência primária	Sim	Sim	Não	Profilática	13	Não
4	V.N.V.	M	20	10	Insufic. renal crônica dialítica	Sim	Sim	Não	Empírica	9	Não
5	H.M.A.	M	17	21	Doença granulomatosa crônica	Sim	Sim	Não	Empírica	10	Sim
6	B.L.A.F.	F	15	12	Transplante hepático	Sim	Sim	Não	Profilática	9	Sim
7	H.R.S.	M	10	10	Síndrome genética a/e	Sim	Sim	Não	Empírica	8	Não
8	R.P.B.R.	M	25	12	Transplante hepático	Sim	Sim	Não	Profilática	13	Não
9	M.E.S.G.	F	2	18	Coartação de aorta grave	Sim	Sim	Não	Empírica	59	Sim
10	S.B.O.P.	F	9	13	Xifópaga+Cirurgia de gde. porte	Sim	Sim	Sim	Empírica	56	Não
11	P.C.L.	F	173	13	Lupus + imunodeficiência a/e	Sim	Sim	Não	Profilática	6	Não
12	J.S.R.	F	101	13	Neuroblastoma	Sim	Sim	Não	Profilática	15	Não
13	C.J.S.G.	M	4	16	Leucemia mielóide aguda	Sim	Sim	Não	Profilática	38	Sim
14	F.R.S.C.	F	123	22	Transplante hepático	Sim	Sim	Não	Profilática	29	Não
15	N.A.S.C.	F	151	18	Hepatite auto-imune	Sim	Sim	Sim	Profilática	52	Não
16	Y.G.R.	M	114	11	Leucemia linfóide aguda	Sim	Sim	Não	Profilática	6	Sim
17	G.V.R.M.	M	128	13	Schwanoma (recidiva)	Sim	Sim	Não	Empírica	8	Não
18	L.L.C.	F	102	14	Osteossarcoma c/ metástase	Sim	Sim	Não	Profilática	23	Não
19	G.D.P.	M	12	17	Cardiopatía congênita	Sim	Sim	Não	Profilática	35	Não
20	D.N.P.	M	59	11	Meduloblastoma disseminado	Sim	Sim	Não	Empírica	18	Sim
21	N.R.A.	F	7	15	Atresia vias biliares	Sim	Sim	Não	Empírica	14	Sim
22	B.S.S.	F	7	13	Hérnia diafragmática	Sim	Sim	Não	Empírica	41	Não
23	S.R.B.S.	F	62	23	Glioma de tronco cerebral	Sim	Sim	Não	Empírica	14	Sim
24	M.H.F.	M	31	19	Cirrose hepática	Sim	Sim	Não	Empírica	7	Sim
25	T.O.C.S.	F	5	19	Atresia vias biliares	Sim	Sim	Não	Empírica	18	Sim

continua

No.	Paciente	Gênero	Idade (meses)	PRISM	Doença de base	A.A.E.	C.V.C.	N.P.P.	Terapia antifúngica	Permanência na UTI (dias)	Óbito
26	L.G.A.R.	M	4	15	Síndrome de Alagille	Sim	Sim	Não	Empírica	56	Sim
27	J.B.O.P.	F	9	13	Xifópaga+Cirurgia de gde. porte	Sim	Sim	Sim	Empírica	18	Não
28	P.G.M.B.	M	26	12	Ataxia teleangiectasia	Sim	Sim	Não	Empírica	33	Não
29	N.M.R.	M	56	9	Insuficiência renal aguda	Sim	Sim	Não	Empírica	31	Não
30	J.P.S.S.	M	30	24	Desnutrição crônica grave	Sim	Sim	Não	Empírica	24	Não
31	L.C.S.	M	60	10	Linfoma não Hodgkin	Sim	Sim	Não	Terapêutico	28	Não
32	W.I.S.	M	120	13	Síndrome do intestino curto	Sim	Sim	Não	Terapêutico	40	Sim
33	J.R.	M	13	14	Estenose traqueal congênita	Sim	Sim	Não	Terapêutico	53	Sim
34	F.F.S.	F	52	21	Cirrose hepática	Sim	Sim	Sim	Terapêutico	20	Sim
35	K.E.G.	F	33	12	Encefalopatia crônica	Sim	Sim	Não	Terapêutico	24	Sim
36	C.M.S.P.	F	130	13	Lupus eritematoso sistêmico	Sim	Sim	Não	Terapêutico	25	Sim
37	A.A.L.	M	9	12	R. gastroes. grave+ Pneum. cr.	Sim	Sim	Não	Terapêutico	39	Não
38	C.S.A.	F	11	9	Hidrocefalia com derivação	Sim	Sim	Não	Terapêutico	22	Não
39	N.T.D.	F	16	9	Hidrocefalia com derivação	Sim	Sim	Sim	Terapêutico	12	Sim
40	D.S.C.	M	101	19	Insuficiência hepática	Sim	Sim	Não	Terapêutico	19	Sim
41	S.C.B.	F	8	16	Síndrome genética a/e	Sim	Sim	Não	Terapêutico	24	Sim
42	Y.V.C.R.	F	20	11	Leucemia linfóide aguda	Sim	Sim	Sim	Terapêutico	30	Sim
43	G.F.S.	M	21	13	Linfoma grandes células	Sim	Sim	Não	Terapêutico	60	Sim
44	Y.B.G.	M	127	13	Leucemia mielóide aguda	Sim	Sim	Não	Não	7	Não
45	L.M.F.	F	164	9	Insuficiência renal crônica	Sim	Sim	Não	Não	6	Não
46	K.C.F.M.	F	14	18	Insuficiência renal aguda	Sim	Sim	Não	Terapêutico	11	Não
47	P.S.A.	F	136	9	Lupus eritematoso sistêmico	Sim	Sim	Não	Não	12	Não
48	J.V.M.S.	M	50	20	Síndrome Down + cardiopatia	Sim	Sim	Não	Terapêutico	27	Não
49	F.B.C.R.	M	69	10	Meduloblastoma	Sim	Sim	Não	Terapêutico	48	Sim
50	W.F.O.	M	41	10	Síndrome do intestino curto	Sim	Sim	Não	Não	12	Não

continua

No.	Paciente	Gênero	Idade (meses)	PRISM	Doença de base	A.A.E.	C.V.C.	N.P.P.	Terapia antifúngica	Permanência na UTI (dias)	Óbito
51	E.B.M.	F	12	16	Síndrome de Fanconi	Sim	Sim	Não	Não	15	Não
52	C.G.D.A.	M	33	10	Insuficiência renal aguda	Sim	Sim	Não	Não	32	Não
53	N.S.S.	M	22	16	Cirrose hepática	Sim	Sim	Não	Não	14	Não
54	M.N.S.O.	F	46	16	Meningomielocele	Sim	Sim	Não	Terapêutico	71	Sim
55	E.A.O.	M	206	10	Sarcoma de Ewing	Sim	Sim	Não	Não	15	Não
56	J.J.T.	F	27	11	Neuropatia crônica	Sim	Sim	Não	Não	25	Não
57	R.P.D.	M	59	15	Síndrome de Lyell	Sim	Sim	Não	Não	17	Não
58	C.F.P.	M	3	14	Hidrocefalia com derivação	Sim	Sim	Não	Terapêutico	79	Sim

A.A.E. = antibioticoterapia de amplo espectro

R. gastroes. = refluxo gastroesofágico

C.V.C. = cateter venoso central

Pneum. cr. = pneumopatia crônica

N.P.P. = nutrição parenteral prolongada

Tabela 4 - Resultados das culturas e PCR dos 58 pacientes do Grupo 1

No.	Paciente	Hemocultura	Urocultura	Cultura de outros materiais	PCR
1	L.O.N.	C.parapsilosis	Negativo	Não realizado	C.parapsilosis
2	V.M.A.	Negativo	Negativo	LBA - C.albicans	Negativo
3	D.Q.M.	Negativo	Não realizado	L. ascítico - C.neoformans	Negativo
4	V.N.V.	Negativo	Não realizado	L.ascítico - Negativo	Negativo
5	H.M.A.	Negativo	S. v. - C.tropicalis (> 100.000 UFC/ml)	Não realizado	C.tropicalis
6	B.L.A.F.	Pichia anomala	Negativo	L.ascítico - Negativo	Negativo
7	H.R.S.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
8	R.P.B.R.	Rhodotorula spp.	Negativo	L.ascítico - Rhodotorula spp.	Negativo
9	M.E.S.G.	Negativo	Negativo	Ferida cirúrgica - P.anomala	Negativo
10	S.B.O.P.	Negativo	Negativo	Secreção traqueal - Negativo	Negativo
11	P.C.L.	Negativo	S.v. - C.albicans (>100.000 UFC/ml)	Cateter - Trichosporon spp.	Negativo
12	J.S.R.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
13	C.J.S.G.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo
14	F.R.S.C.	Negativo	Negativo	L.ascítico - C.guilliermondii	Negativo
15	N.A.S.C.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo
16	Y.G.R.	Negativo	Não realizado	Não realizado	Negativo
17	G.V.R.M.	C.tropicalis	C.tropicalis (>100.000 UFC/ml)	Não realizado	C.tropicalis
18	L.L.C.	Negativo	Não realizado	Cateter - Negativo	Negativo
19	G.D.P.	C.tropicalis	Negativo	Cateter - Negativo	C.tropicalis
20	D.N.P.	C.krusei	Negativo	Cateter - Negativo	C.krusei
21	N.R.A.	Negativo	Negativo	L. ascítico e cateter - Negativo	Negativo
22	B.S.S.	Negativo	C.glabrata (sem contagem)	Não realizado	Negativo
23	S.R.B.S.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo
24	M.H.F.	Negativo	S.v. - C.albicans (>100.000 UFC/ml)	L.ascítico - Negativo	Negativo
25	T.O.C.S.	Negativo	Não realizado	L.ascítico - Negativo	Negativo
26	L.G.A.R.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo
27	J.B.O.P.	Negativo	C.albicans - (>100.000 UFC/ml)	Não realizado	Negativo
28	P.G.M.B.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo
29	N.M.R.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo

continua

No.	Paciente	Hemocultura	Urocultura	Cultura de outros materiais	PCR
30	J.P.S.S.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo
31	L.C.S.	C.albicans	Negativo	Não realizado	C.albicans
32	W.I.S.	C.albicans	Negativo	Cateter - C.albicans (10 UFC)	C.albicans + C.glabrata
33	J.R.	Negativo	C.albicans - (>100.000 UFC/ml)	Não realizado	Negativo
34	F.F.S.	Negativo	C.albicans - (>100.000 UFC/ml)	L. ascítico - Negativo	C.albicans + C.tropicalis
35	K.E.G.	Negativo	Negativo	LBA - C.albicans	Negativo
36	C.M.S.P.	Negativo	Negativo	LBA - C.albicans	C.tropicalis
37	A.A.L.	Negativo	Negativo	LBA - C.albicans	Negativo
38	C.S.A.	C.albicans	Negativo	Cateter - Negativo	C.albicans
39	N.T.D.	C.albicans	S.v. - C.albicans -(>100.000 UFC/ml)	Cateter - Negativo	C.albicans
40	D.S.C.	Negativo	Negativo	Fragmento baço - C.parapsilosis	Negativo
41	S.C.B.	Negativo	S.v. - C.albicans -(50.000 UFC/ml)	Cateter - Negativo	Negativo
42	Y.V.C.R.	C.tropicalis	S.v. - C.tropicalis (>100.000 UFC/ml)	L.ascítico e cateter - C.tropicalis	C.tropicalis
43	G.F.S.	Negativo	S.v. - C.albicans (40.000 UFC/ml)	L. peritoneal e cateter - Negativo	C.parapsilosis
44	Y.B.G.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo
45	L.M.F.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo
46	K.C.F.M.	Negativo	Negativo	L. ascítico e peritoneal - C.albicans	Negativo
47	P.S.A.	Negativo	Negativo	L.ascítico - C.albicans	Negativo
48	J.V.M.S.	Negativo	C.albicans - (>100.000 UFC/ml)	Cateter - Negativo	Negativo
49	F.B.C.R.	Negativo	C.albicans - (>100.000 UFC/ml)	Cateter - Negativo	Negativo
50	W.F.O.	Negativo	Não realizado	L. ascítico - Negativo	C.glabrata
51	E.B.M.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
52	C.G.D.A.	Negativo	Negativo	L.ascítico - Negativo	Negativo
53	N.S.S.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
54	M.N.S.O.	Negativo	C.albicans - (>100.000 UFC/ml)	Cateter - C.albicans (100 UFC)	Negativo
55	E.A.O.	Negativo	Negativo	Cateter - Levedura não <i>albicans</i>	C.glabrata
56	J.J.T.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
57	R.P.D.	Negativo	Negativo	Cateter - Negativo	Negativo
58	C.F.P.	Negativo	C.albicans - (>100.000 UFC/ml)	Cateter - Negativo	Negativo

S.v. = sonda vesical UFC = unidades formadoras de colônias LBA = lavado bronco-alveolar

Tabela 5 - Dados demográficos e condições clínicas associadas dos 22 pacientes do Grupo 2

No.	Paciente	Gênero	Idade (meses)	PRISM	Doença de base	A.A.E.	C.V.C.	N.P.P.	Terapia antifúngica	Permanência na UTI (dias)	Óbito
1	L.D.C.J.	M	4	3	Não	Sim	Sim	Não	Não	7	Não
2	L.A.F.C.	F	48	7	Não	Sim	Sim	Não	Não	3	Não
3	G.H.P.	M	48	6	Não	Sim	Não	Não	Não	5	Não
4	K.P.S.	F	11	6	Não	Não	Não	Não	Não	3	Não
5	G.L.N.	M	16	7	Não	Sim	Sim	Não	Não	8	Não
6	L.B.S.G.	F	116	5	Não	Sim	Sim	Sim	Não	3	Não
7	A.F.M.	M	108	6	Não	Sim	Não	Não	Não	7	Não
8	A.E.C.C.	M	11	6	Não	Não	Não	Não	Não	8	Não
9	A.B.L.A.	F	7	7	Não	Sim	Sim	Não	Não	28	Não
10	A.H.C.	M	72	6	Não	Não	Sim	Não	Não	16	Não
11	J.V.S.	M	108	7	Não	Não	Não	Não	Não	19	Não
12	A.C.V.B.	F	11	8	Não	Sim	Não	Não	Não	4	Não
13	M.V.G.S.	M	8	8	Não	Não	Sim	Não	Não	4	Não
14	B.H.R.P.	M	58	4	Não	Sim	Não	Não	Não	12	Não
15	M.D.S.M.	M	2	7	Não	Não	Não	Não	Não	8	Não
16	Q.R.A.	F	11	7	Não	Não	Não	Não	Não	8	Não
17	M.C.O.S.	F	6	8	Não	Sim	Sim	Não	Não	10	Não
18	K.C.S.C.	F	15	6	Não	Sim	Não	Não	Não	11	Não
19	I.D.P.	F	3	6	Não	Sim	Sim	Não	Não	15	Não
20	T.A.T.S.	F	60	5	Não	Sim	Sim	Não	Não	3	Não
21	N.S.P.	F	29	6	Não	Sim	Não	Não	Não	7	Não
22	S.V.S.B.	M	48	3	Não	Não	Sim	Não	Não	3	Não

A.A.E. = antibioticoterapia de amplo espectro C.V.C. = cateter venoso central N.P.P. = nutrição parenteral prolongada

Tabela 6 - Resultados das culturas e PCR dos 22 pacientes do Grupo 2

No.	Paciente	Hemocultura	Urocultura	Cultura de outros materiais	PCR
1	L.D.C.J.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
2	L.A.F.C.	Negativo	Não realizado	Não realizado	Negativo
3	G.H.P.	Negativo	Não realizado	Não realizado	<i>C.glabrata</i>
4	K.P.S.	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Negativo
5	G.L.N.	Negativo	Não realizado	Cateter - Negativo	Negativo
6	L.B.S.G.	Negativo	Não realizado	Não realizado	Negativo
7	A.F.M.	Negativo	Negativo	L. ascítico - Negativo	Negativo
8	A.E.C.C.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
9	A.B.L.A.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
10	A.H.C.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
11	J.V.S.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
12	A.C.V.B.	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Negativo
13	M.V.G.S.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
14	B.H.R.P.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo
15	M.D.S.M.	Negativo	Não realizado	Não realizado	Negativo
16	Q.R.A.	Negativo	Não realizado	Não realizado	Negativo
17	M.C.O.S.	Negativo	Não realizado	Cateter - Negativo	Negativo
18	K.C.S.C.	Negativo	Não realizado	Cateter - Negativo	Negativo
19	I.D.P.	Negativo	Não realizado	Cateter - Negativo	Negativo
20	T.A.T.S.	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Negativo
21	N.S.P.	Negativo	Negativo	LCR -Negativo	Negativo
22	S.V.S.B.	Negativo	Negativo	Não realizado	Negativo

LCR = líquido cefalorraquiano

10. REFERÊNCIAS

Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2483-9.

Akins R. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2005; 43: 285-318.

Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU. Comparative evaluation of (1,3)- β -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC Infect Dis.* 2007; 7: 103-11.

Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: S15-27.

Antunes AGV, Pasqualotto AC, Diaz MC, d'Azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital : species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2004 ; 46: 239-41.

Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, Harrison LH, Sofair AN, Warnock DW. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for *in vitro* susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2002 ; 46: 2477-81.

Aygan A. Nucleic acid extraction from clinical specimens for PCR applications. *Turk J Biol.* 2006 ; 30 : 107-20.

Beckerman JL, Magee PT. Genomics in fungal pathogenesis. In : Calderone RA, Cihlar RL, editores. *Fungal pathogenesis - principles and clinical applications*. New York : Marcel Dekker, 2002. p.261-78.

Boktour MR, Kontoyiannis DP, Hanna HA, Hachem RY, Girgawy E, Bodey GP, Raad II. Multiple-species candidemia in patients with cancer. *Cancer*. 2004 ; 101 : 1860-5.

Bougnoux ME, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Chanoine MH. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 925-30.

Braz LM, Raiz Jr R, Amato Neto V, Alarcón RS, Gakyia E, Okay TS. The detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: comparison of a PCR-based assay with microscopic examination. *Ann Trop Med Parasitol*. 2007; 5: 461-5.

Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS immunol Med Microbiol*. 2005; 45: 361-8.

Buchman TG, Rossier M, Merz WG, Charache P. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene. *Surgery*. 1990; 108: 338-47.

Carvalho A, Costa-de-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P, Rodrigues F. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol*. 2007; 45: 619-27.

Celebi S, Hacimustafaoglu M, Ozdemir O, Ozkaya G. Nosocomial candidaemia in children: results of a 9-year study. *Mycoses*. 2007; 51: 248-57.

Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3466-71.

Chapman RL. *Candida* infections in neonate. *Curr Opin Pediatr.* 2003; 15: 97-102.

Chapman RL, Faix RG. Invasive neonatal candidiasis: an overview. *Semin Perinatol.* 2003; 27: 352-6.

Chen SCA, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol* 2002; 40: 333-57.

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2302-10.

Chryssanthou E, Andersson B, Petrini B, Löfdal S, Tollemar J. Detection of *Candida albicans* DNA in serum by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis.* 1994; 26: 479-85.

Coignard C, Hurst SF, Benjamin LE, Brandt ME, Warnock DW, Morrison CJ. Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 858-61.

Colom MF, Jover A, Ferrer C. Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico no neutropénico. *Rev Iberoam Micol.* 2006; 23: 26-8.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36: 599-607.

Colombo AL, Guimarães T, Silva LRBF, Monfardini LPA, Cunha AKB, Rady P, Alves T, Rosas R. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007; 28: 570-6.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 2816-23.

Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, Wey SB. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999; 34: 281-6.

Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003; 22: 470-4.

Costa SF, Marinho I, Araújo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect*. 2000; 45: 69-72.

Dimopoulos G, Velegraki A, Pefanis A, Karabinis A. Candiduria in critically ill patients: an early candidemia marker when coupled with multiple blood specimens PCR assay? *Hepatogastroenterology*. 2007; 54: 354-8.

Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhöfer I, Müller CA, Bowden RA, Van Burik JA, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1353-60.

Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3260-5.

Ellepola ANB, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol.* 2005; 43: 65-84.

Erjavec Z, Verweij PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resist Updat.* 2002; 5: 3-10.

Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C.albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 395-401.

França JCB, Ribeiro CEL, Queiroz-Telles F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41:23-8.

García-San Miguel L, Cobo J, Martos I, Otheo E, Muriel A, Pintado V, Moreno S. Risk factors for candidemia in pediatric patients with congenital heart disease. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006; 27: 576-80.

Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, da Matta DA, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98: 401-5.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Berg JV, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*. 2003; 37:1172-7.

Guerra-Romero L, Telenti A, Thompson RL, Roberts GD. Polymicrobial fungemia: microbiology, clinical features, and significance. *Rev Infect Dis*. 1989; 11: 208-12.

Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson HF. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 228-31.

Hopfer RL, Amjadi D. Molecular diagnosis of fungal infections. In : Calderone RA, Cihlar RL, editores. *Fungal pathogenesis - principles and clinical applications*. New York : Marcel Dekker, 2002. p.649-65.

Huskins WC, Goldman DA. Nosocomial infections. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL, editores. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 5thed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2004. v.2, p.2874-925.

Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol*. 2002; 40: 87-109.

Jensen J, Muñoz P, Guinea J, Rodriguez-Créixems M, Peláez T, Bouza E. Mixed fungemia: incidence, risk factors, and mortality in a general hospital. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: e109-14.

Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Rev*. 1990; 3: 32-45.

Jordá-Marcos R, Álvarez-Lerma F, Jurado M, Palomar M, Nolla-Salas J, León MA, León C, the EPCAN Study Group. Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses*. 2007; 50: 302-10.

Jordan JA. PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 2962-7.

Kirkwood BR. *Essentials of medical statistics*. Oxford: Blackwell Science, 1988.

Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 59: 401-6.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. 9a. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Leibovitz E. Neonatal candidosis: clinical picture, management controversies and consensus, and new therapeutic options. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49: 69-73.

Levy I, Rubin LG, Vasishtha S, Tucci V, Sood SK. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis*. 1998; 26:1086-8.

Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 3311-2.

Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2860-5.

Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 3159-63.

Maaroufi Y, De Bruyne JM, Duchateau V, Georgala A, Crokaert F. Early detection and identification of commonly encountered *Candida* species from simulated blood cultures by using a real-time PCR-based assay. *J Mol Diagn.* 2004; 6: 108-14.

MacDonald L, Baker C, Chenoweth C. Risk factors for candidemia in a children's hospital. *Clin Infect Dis.* 1998; 26: 642-5.

Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1634-41.

Maródi L, Johnston Jr RB. Invasive *Candida* species disease in infants and children: occurrence, risk factors, management, and innate host defense mechanisms. *Curr Opin Pediatr.* 2007;19: 693-7.

Méan M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care.* 2008;12:1-9.

Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 3344-7.

Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, D' Amore G, Leone G, Fadda G. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:1871-5.

Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Lo Cascio G, Fadda G. Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens using PCR-restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 667-72.

Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, Moretti ML. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; 24: 721-6.

Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci.* 1985; 82: 6133-7.

Nho S, Anderson MJ, Moore CB, Denning DW. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and *Hha* I digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1036-9.

Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58:77-82.

Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biol.* 2004; 5: 230.

Ostrosky-Zeichner L. New approaches to the risk of *Candida* in the intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16: 533-7.

Pasqualotto AC, de Moraes AB, Zanini RR, Severo LC. Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and a central venous catheter in place. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007; 28: 799-804.

Paula CR. Candidíases. In: C Zaitz, I Campbell, SA Marques, LRB Ruiz, VM de Souza, editores. *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Medsi; 1998. p.99-107.

Pelz RK, Hendrix CW, Swoboda SM, Diener-West M, Merz WG, Hammond J, Lipsett PA. Double-blind placebo-controlled trial of fluconazole to prevent candidal infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 2001; 233: 542-8.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections:epidemiology, diagnosis and treatment. *Med Mycol*. 2007; 45: 321-46.

Pfaller Ma, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretative breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19: 435-47.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20:133-63.

Polanco A, Mellado E, Castilla C, Rodriguez-Tudela JL. Detection of *Candida albicans* in blood by PCR in a rabbit animal model of disseminated candidiasis. *Diagn Microbial Infect Dis*. 1999; 34: 177-83.

Pollack MM, Ruttimann UE, Getson PR. Pediatric risk of mortality (PRISM) score. *Crit Care Med*. 1988; 16: 1110-6.

Pontón J, del Palacio A. Avances y limitaciones del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por levaduras. *Rev Iberoam Micol*. 2007; 24: 181-6.

Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*

DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47: 487-96.

Pulimood S, Ganesan L, Alangaden G, Chandrasekar P. Polymicrobial candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 44: 353-7.

Raymond J, Aujard Y, the European Study Group. Nosocomial infections in pediatric patients: a European multicenter prospective study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000; 21: 260-3.

Reiss E, Morrison CJ. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev*. 1993; 6: 311-23.

Riggsby WS, Torres-Bauza LJ, Wills JW, Townes TM. DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*. 1982; 2: 853-62.

Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros CE, Saporiti A, participantes del grupo EMIFN. Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la Republica Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2005; 37:189-95.

Sandven P. Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micol*. 2000; 17: 73-81.

Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. Development of novel real-time assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 906-14.

See LLC. Bloodstream infection in children. *Pediatr Crit Care Med*. 2005; 6: S42-44.

Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 5660-4.

Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1454-9.

Silva V, Díaz MC, Febré N, Chilean Invasive Fungal Infections Group. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. *Med Mycol.* 2004; 42: 333-9.

Singhi Sc, Reddy TCS, Chakrabarti A. Candidemia in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med.* 2004; 5: 369-74.

Stamos JK, Rowley AH. Candidemia in a pediatric population. *CID.* 1995; 20: 571-5.

Tirodker UH, Nataro JP, Smith S, LasCasas L, Fairchild KD. Detection of fungemia by polymerase chain reaction in critically ill neonates and children. *J Perinatol.* 2003; 23: 117-22.

Tortorano AM, Kibbler C, Pemán J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 27: 359-66.

Tufano R. Focus on risk factors for fungal infections in ICU patients. *Minerva Anesthesiol.* 2002; 68: 269-72.

Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1846-51.

Van Burik J, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1169-75.

Vazquez JA, Dembry LM, Sanchez V, Vazquez MA, Sobel JD, Dmuchowski C, Zervos MJ. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 421-6.

Wahyuningsih RW, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3016-21.

Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn J Med Mycol.* 2007; 48:1-12.

White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2181-7.

Yamamura ML, Abramczyk ML, Carvalho ES. Fungemias em pediatria. Parte I. *Pediatr Moderna.* 2001; 7: 286-304.

Yera H, Poulain D, Lefebvre A, Camus D, Sendid B. Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. *J Clin Pathol.* 2004; 57: 196-8.

Yera H, Sendid B, François N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20: 864-70.

Zaoutis TE, Coffin SE, Chu JH, Heydon K, Zhao H, Greves M, Walsh TJ. Risk factors for mortality in children with candidemia. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24: 736-9.

Zaragoza R & Pemán J. Invasive fungal infections in critically ill patients: different therapeutic options and a uniform strategy. *Rev Iberoam Micol*. 2006; 23:59-63.