

Gabriel Naves Felix

Diagnóstico laboratorial de candidemia em pacientes de unidades de cuidados intensivos: desempenho dos métodos de PCR em tempo real, detecção de (1,3)- β -D-glucana e MALDI-TOF

**São Paulo
2023**

Gabriel Naves Felix

Diagnóstico laboratorial de candidemia em pacientes de unidades de cuidados intensivos: desempenho dos métodos de PCR em tempo real, detecção de (1,3)- β -D-glucana e MALDI-TOF

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Dra. Gilda M. B. Del Negro

**São Paulo
2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP)**

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Felix, Gabriel Naves

Diagnóstico laboratorial de candidemia em pacientes de unidades de cuidados intensivos: desempenho dos métodos de PCR em tempo real, detecção de (1,3)- β -D-glucana e MALDI-TOF / Gabriel Naves Felix. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Gilda Maria Barbaro Del Negro.

Descritores: 1.Micologia 2.Candidemia 3.Biologia molecular 4.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 5.Glucana 1,3-beta-glucosidase 6.*Candida* spp 7.Hemocultura

USP/FM/DBD-506/22

*À minha família, em
especial à minha
companheira Luisa e
minha filha Cora pelo
apoio em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, constante suporte durante todo o processo, sendo meu porto seguro e principalmente pela amizade que construímos durante este período. Esse trabalho não seria possível sem você ao meu lado;

À Dra. Vera Lúcia Teixeira de Freitas pela paciência, confiança, orientação, companheirismo, ensinamentos, amizade, apoio durante uma fase árdua do Doutorado. Muito obrigado;

Ao Prof. Dr. Gil Bernard e Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda pelo suporte durante a realização do doutorado, disponibilizando o Laboratório de Micologia Médica, LIM 53 para realização dos experimentos;

À Dra. Viviane Mazo Fávero Gimenez pela confiança desde o meu primeiro contato com o grupo do LIM 53, sendo fundamental no meu início na vida de pós-graduação;

À Ms. Roseli Santos Freitas por compartilhar a sabedoria e paixão em estudar cada detalhe da micologia médica;

Aos funcionários do LIM 53, Dona Antônia, Sônia Cristina Cavalcante e Fábio Lorenzo pelo carinho e amizade;

Aos companheiros do LIM 53 que passaram e que ainda estão presentes, Lumena Siqueira, Fernanda Marques, Letícia Santos, Vanessa Moraes, Flaviano Luiz Batista da Silva, Giovanna Azevedo Colestrino, Camila Midori Henriques Tanaka, Gabrielle Haddad e Renata Buccheri. Muito obrigado pelo apoio e companheirismo durante essa etapa engrandecedora;

Aos colegas do LIM 48, Vera Lúcia, Daniel Valério, Cláudia, Paula K. Sato e Célia Regina Ueda Tanowe pela confiança e amizade e em especial, Márcia Andréa Ferreira e Vivian Coelho pelo carinho, companheirismo e amizade;

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP pela confiança;

À CAPES pelo auxílio à pesquisa;

Aos meus amigos/irmãos de Uberlândia e São Paulo que me apoiaram nas horas boas e nas mais difíceis dessa etapa;

À Dona Maria, que foi a primeira pessoa que me hospedou em São Paulo, me dando todo o suporte e amizade nesta fase de transição da minha vida;

Aos amigos que tive o prazer em dividir teto, Raphael Rabelo, Gustavo Rabelo, Bassam Hanna e Priscila Arroyo. Com vocês, aprendi muito a conviver em grupo e ser uma pessoa melhor em várias maneiras;

Aos irmãos Fábio Cunha Oliveira, Alexandre Oviedo e Berta Hira por me apoiarem sempre e pelos momentos de distração com muito amor, músicas e boas conversas;

Finalmente à minha família, que sem ela não seria possível o cumprimento dessa etapa. Só a gente entende a nossa cumplicidade. Quando estamos juntos, os bons sentimentos invadem os nossos corações e aproveitamos cada instante único. É bom ter com quem contar nos momentos difíceis, alguém para compartilhar as vitórias, alguém que torça com você. Luisa, Cora, mãe, vô Ennio, vó Pérola, Aline, Maitê, Samuel e Gael, vocês regam a minha vida de sentimentos bons e sou completamente grato por essa dádiva;

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP*. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos Maria Marta Nascimento e Suely Campos Cardoso. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2016.

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

RESUMO

Felix GN. Diagnóstico laboratorial de candidemia em pacientes de unidades de cuidados intensivos: desempenho dos métodos de PCR em tempo real, detecção de (1,3)- β -D-glucana e MALDI-TOF [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

As infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp. representam importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes internados em unidades de cuidados intensivos (UCI). Apesar da importância crescente desta levedura como agente etiológico de infecções graves em condições clínicas críticas, o desempenho dos métodos para diagnóstico precoce ainda permanece um desafio na prática médica. As hemoculturas, consideradas até hoje como padrão-ouro no diagnóstico dessas infecções, apresentam sensibilidade limitada e/ou demandam tempo prolongado para identificação das espécies infectantes. O emprego de técnicas moleculares, como a PCR em tempo real (qPCR) para a detecção de *Candida* diretamente em amostras clínicas, bem como a detecção de (1,3)- β -D-glucana (BDG), tem sido relatado em diversas publicações, demonstrando resultados promissores. No entanto, a falta de padronização do método e de sua validação clínica, têm dificultado sua aplicação em laboratórios de rotina diagnóstica. Por outro lado, a técnica de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF possui elevada acurácia para identificação de micro-organismos e esta tecnologia tem sido empregada para detectar e identificar espécies de *Candida* diretamente em balões de hemocultura positivos, permitindo resultados em menor tempo e com menor custo. Este estudo teve como finalidade avaliar a acurácia de um ensaio qPCR para a detecção e identificação de cinco espécies de *Candida*, diretamente em amostras sanguíneas de 78 pacientes com hipótese diagnóstica de candidemia, atendidos em UCIs de três hospitais públicos da cidade de São Paulo. Foram também avaliados o ensaio para detecção de BDG em amostras séricas destes pacientes, e a técnica de MALDI-TOF para identificação das espécies de *Candida*. Os resultados mostraram que a identificação das espécies de *Candida* por MALDI-TOF foi concordante com as espécies isoladas das hemoculturas positivas em 90% dos casos, e obtida em 2-3 horas após a sinalização de positividade dos balões. Em relação à qPCR e ensaio de BDG, foi observado bom desempenho de ambos os ensaios nos 20 casos de candidemia comprovada pelas hemoculturas positivas, com positividade de 100% e 95%, respectivamente. A técnica molecular mostrou concordância de 100% com as culturas na

identificação das espécies e, em quatro amostras desses pacientes (20%), foi detectada mais uma espécie de *Candida* além da isolada nas hemoculturas. Neste grupo, os valores de Cq variaram de 17,8 a 35,8, e a mediana dos valores de BDG foi de 478,1 pg/mL. Nos casos de candidemia provável [44 pacientes com hemoculturas negativas, mas com sangue de cateter positivo para *Candida* (em 32 pacientes) e em outros sítios do organismo (em 12 pacientes)], a qPCR detectou espécies de *Candida* em 14% dos casos nas amostras de sangue periférico. Nestas seis amostras, os valores de Cq variaram de 17,8 a 33,7, enquanto a mediana dos valores de BDG foi de 457,0 pg/mL. Nas demais amostras do grupo (26), a mediana dos valores de BDG foi de 131,2 pg/mL. Nos casos de candidemia possível (14 pacientes com suspeita clínica de candidemia, mas com todas as culturas para *Candida* negativas), a qPCR foi negativa em 100% e a BDG foi detectada em um caso; a mediana dos valores neste grupo foi de 62,5 pg/mL. Até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado no Brasil empregando estes ensaios em amostras de sangue de pacientes adultos mantidos em UCIs. Os resultados demonstraram que a técnica de qPCR permitiu a detecção das cinco espécies de *Candida* nos episódios de candidemia comprovada, além de detectar infecção pelo agente em seis casos prováveis, com resultados corroborados pela ensaio de BDG. Por outro lado, apesar do pequeno número de amostras analisadas, a negatividade da qPCR no grupo de candidemia possível, demonstra potencial valor preditivo negativo do ensaio, o que permitiria a suspensão de terapia antifúngica empírica em pacientes com menor risco de infecção. Também ficou demonstrado que o uso simultâneo dos ensaios molecular e de detecção de BDG pode contribuir para melhorar a acurácia do diagnóstico laboratorial não baseado em culturas para pacientes com risco para infecção por *Candida*. Entretanto, devido ao seu elevado custo, o ensaio de BDG não é disponível para a rotina diagnóstica laboratorial de centros médicos públicos ou privados no Brasil.

Palavras-chave: Micologia. Candidemia. Biologia molecular. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. Glucana 1,3-beta-glucosidase. *Candida* spp. Hemocultura.

ABSTRACT

Felix GN. Laboratory diagnosis of candidemia in patients in intensive care units: performance of real-time PCR, (1,3)- β -D-glucan and MALDI-TOF detection methods [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Systemic infections caused by *Candida* spp. represent an important cause of morbidity and mortality in patients admitted to intensive care units (ICU). Despite the growing importance of this yeast as an etiological agent of severe infections in critical clinical conditions, the performance of methods for early diagnosis remains a challenge in medical practice. Blood cultures, considered until today as the gold standard in diagnosing these patients, showed limited sensitivity and/or required a long time to identify the infecting species. The use of molecular techniques, such as real-time PCR (qPCR) for the detection of *Candida* directly in clinical samples, as well as the detection of (1,3)- β -D-glucan (BDG), has been reported in several publications, demonstrating promising results. However, the lack of standardization of the method and the clinical validation have hindered its application in routine of diagnostic laboratories. On the other hand, the MALDI-TOF type mass spectrometry technique has high accuracy for the identification of microorganisms and this technology has been used to detect and identify *Candida* species directly in positive blood culture flasks, allowing results in less time and at a lower cost. This study aimed to evaluate the accuracy of a qPCR assay for the detection and identification of five *Candida* species, directly in blood samples from 78 patients with a diagnostic hypothesis of candidemia, treated at the ICUs of three public hospitals in the city of São Paulo. The assay for detecting BDG in serum samples from these patients and the MALDI-TOF technique for identifying *Candida* species were also evaluated. The results showed that the identification of *Candida* species by MALDI-TOF was concordant with the species isolated from positive blood cultures in 90% of the cases and obtained in 2-3 hours after signaling the positivity of the balloons. Regarding qPCR and the BDG assay, good performance was observed for both assays in the 20 cases of candidemia confirmed by positive blood cultures, with positivity rates of 100% and 95%, respectively. The molecular technique showed 100% concordance with the cultures in the identification of the species and, in four samples from these patients (20%), one more species of *Candida* was detected in addition to the one isolated in the blood cultures. In this group, Cq values ranged from 17.8 to 35.8, and the median BDG

value was 478.1 pg/mL. In cases of probable candidemia [44 patients with negative blood cultures, but with positive catheter blood for *Candida* (32 patients) and in other body sites (12 patients)], qPCR detected *Candida* species in 14% of the cases in the samples of peripheral blood. In these six samples, Cq values ranged from 17.8 to 33.7, while the median BDG values were 457.0 pg/mL. In the other samples of the group (26), the median of BDG values was 131.2 pg/ml. In cases of possible candidemia (14 patients with clinical suspicion of candidemia, but with all *Candida* cultures negative), qPCR was negative in 100% and BDG was detected in one case; the median value in this group was 62.5 pg/ml. To the best of our knowledge, this is the first study carried out in Brazil using these assays in blood samples from adult patients maintained in ICUs. The results showed that the qPCR technique allowed the detection of five *Candida* species in episodes of proven candidemia, in addition to detecting infection by the agent in six probable cases, with results corroborated by the BDG assay. On the other hand, despite the small number of analyzed samples, the qPCR negativity in the possible candidemia group demonstrates the potential negative predictive value of the assay, which would allow the suspension of empirical antifungal therapy in patients with a lower risk of infection. It has also been demonstrated that the simultaneous use of molecular and BDG detection assays can contribute to improving the accuracy of non-culture-based laboratory diagnosis for patients at risk for *Candida* infection. However, due to its high cost, the BDG assay is not available for routine laboratory diagnosis in public or private medical centers in Brazil.

Keywords: Mycology. Candidemia. Molecular biology. Real-time polymerase chain reaction. Glucan 1,3-beta-glucosidase. *Candida* spp. Blood culture.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1. Objetivo geral.....	9
3.2. Objetivos específicos	9
3.2.1. Desenvolver a técnica de qPCR, estabelecendo o método de extração de DNA a partir das amostras de sangue total, definindo os <i>primers</i> espécie-específicos e as condições de amplificação;	9
3.2.2. Determinar a sensibilidade analítica para as cinco espécies de <i>Candida</i> , bem como a especificidade da técnica de qPCR;.....	9
3.2.3. Avaliar o desempenho da qPCR nas amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes incluídos no estudo;	9
3.2.4. Empregar o kit comercial Fungitell® (Cape Cod Inc., EUA) para a detecção de BDG nas amostras de soro dos pacientes do estudo;	9
3.2.5. Avaliar a acurácia do método de MALDI-TOF na detecção de espécies de <i>Candida</i> em balões de hemocultura com evidência de crescimento microbiano.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1. Casuística	10
4.1.1. Critérios de inclusão:.....	10
4.1.2. Critérios de exclusão:	10
4.2. Hemoculturas	11
4.3. Extrações de DNA dos protótipos de <i>Candida</i> spp., outros fungos patogênicos e bactérias	11
4.4. Seleção dos <i>primers</i> das cinco espécies de <i>Candida</i>	12
4.4.1. Matriz de <i>primers</i> para uso nas ampliações por qPCR.....	12
4.4.2. Avaliação da temperatura de hibridização dos cinco pares de <i>primers</i> para as ampliações por qPCR.....	13
4.5. Clonagem dos fragmentos amplificados a partir de sequências gênicas das cinco espécies de <i>Candida</i>	13
4.6. Análise das curvas de calibração da qPCR para avaliação da eficiência das ampliações por qPCR e o limiar de detecção	14
4.7. Avaliação da especificidade dos <i>primers</i>	14
4.8. Protocolo de extração de DNA a partir de amostras de sangue “batizadas” com suspensão das 5 espécies de <i>Candida</i>	15
4.9. Ensaios de qPCR com as amostras de sangue semeadas com <i>Candida</i>	15

4.10. Avaliação do desempenho da qPCR para o diagnóstico de candidemia nas amostras dos pacientes do estudo	16
4.11. Detecção e identificação das espécies de <i>Candida</i> nos balões de hemocultura por espectrometria de massa (EM) MALDI-TOF	16
4.12. Detecção de BDG em amostras de soro dos pacientes	17
4.13. Análises estatísticas	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1. Seleção dos pacientes.....	19
5.2. Classificação dos pacientes do estudo em provados, prováveis e possíveis de desenvolver candidemia.....	20
5.3. Hemoculturas	21
5.4. MALDI-TOF	25
5.5. Ensaio de qPCR	26
5.5.1. Avaliação da matriz dos <i>primers</i> : concentração e temperatura de hibridização dos cinco pares de <i>primers</i> para as amplificações por qPCR.....	26
5.5.2. Análise das curvas de calibração contendo DNA humano para avaliação da eficiência das amplificações por qPCR.....	27
5.5.3. Avaliação do limiar de detecção da qPCR através das curvas de calibração para as cinco espécies de <i>Candida</i>	28
5.5.4. Avaliação da especificidade analítica dos <i>primers</i> das cinco espécies de <i>Candida</i> pela qPCR.....	33
5.5.5. Protocolo de extração de DNA a partir de amostras de sangue “batizadas” com suspensão das 5 espécies de <i>Candida</i>	35
5.5.6. Ensaio de qPCR com amostras de sangue semeadas com as cinco espécies de <i>Candida</i>	35
5.5.7. Ensaio de qPCR com as amostras de DNA extraídas do sangue dos pacientes	37
5.5.8. Resultados do desempenho do ensaio de qPCR nas amostras dos 78 pacientes do estudo	40
5.6. Dosagem de BDG	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
7. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas são causas importantes de morbimortalidade, particularmente em pacientes imunodeprimidos e/ou submetidos a procedimentos hospitalares invasivos (Suleyman and Alangaden 2016; Khan, El-Charabaty, and El-Sayegh 2015; Kashiha et al. 2018). Nos dias atuais, cerca de 15% das infecções associadas aos cuidados de saúde são fúngicas, e destas, mais de 80% são causadas por espécies de *Candida*, microrganismo comensal comum do trato gastrointestinal e que também pode ser encontrado na pele. A ruptura das barreiras naturais destes sistemas humanos pode levar a infecções invasivas (Toda et al. 2019). A translocação para a corrente sanguínea pode ocorrer sob condições fisiológicas estressantes, em pacientes hospitalizados por longos períodos, particularmente em unidades de cuidados intensivos (UCI). Cirurgias abdominais e outras intervenções médicas, alteração do microbioma causada por antibióticos, recebimento de nutrição parenteral total, diabetes, doenças malignas, neutropenia, uso de terapias imunossupressoras, e presença de cateteres e outros dispositivos, são considerados fatores de risco para a instalação de infecção invasiva por *Candida* (Cleveland et al. 2015; Kidd et al. 2019).

A candidíase hematogênica ou candidemia, classicamente se refere a um conjunto de situações clínicas, na qual a levedura é encontrada na corrente sanguínea, podendo acometer um ou vários órgãos do hospedeiro por disseminação metastática, o que acarreta impacto significativo na taxa de mortalidade global e por causa específica. A mortalidade atribuível à candidemia é de 15-35% em adultos e 10-15% em recém-nascidos, se tratando de pacientes internados em UCIs (Ahmad and Alfouzan 2021). Uma condição altamente letal ocorre nos episódios de candidemia que levam ao choque séptico, com taxas de mortalidade em torno de 60% dos casos (Delaloye and Calandra 2014; Pappas et al. 2016). Além disso, a infecção está associada à elevada morbidade, com aumento do tempo de internação e conseqüentemente de seus custos associados (Bilir et al. 2015; Pfaller and Castanheira 2016). Em todo o mundo, mais de 250.000 casos, e cerca de 50.000 mortes por ano são atribuídas à candidíase invasiva (Camp, Spettel, and Willinger 2020).

A incidência de candidemia nas UCIs é de 5 a 10 vezes mais elevada quando comparada às demais unidades hospitalares, e a proporção de pacientes com infecção

hematogênica por *Candida* spp. que desenvolve sepse grave e choque séptico é da ordem de 30 e 40% dos casos, respectivamente (Pappas et al. 2016; Fuchs, Lass-Flörl, and Posch 2019).

Estima-se que a incidência de candidemia tenha aumentado, globalmente, em torno de cinco vezes nos últimos 20 anos, sendo que países em desenvolvimento registram uma taxa de 4 a 15 vezes maior em comparação com os países desenvolvidos (Barchiesi et al. 2016). A incidência de infecção em países em desenvolvimento varia de 0,026 a 4,2 casos por 1000 admissões, enquanto em países desenvolvidos, a variação gira em torno de 0,03 a 1,87 casos por 1000 admissões. Os dados disponíveis de UCIs de países em desenvolvimento relataram a incidência variando de 2,2 a 41 casos por 1000 admissões, que é consideravelmente maior do que UCIs de nações desenvolvidas, cuja incidência é de 0,24-6,87 casos por 1000 admissões (Kaur and Chakrabarti 2017).

No Brasil, a incidência de candidemia tem aumentado acentuadamente nas duas últimas décadas, como consequência de mudanças nas características clínicas dos pacientes e pelo limitado número de agentes antifúngicos disponíveis. Em estudo multicêntrico realizado em 16 hospitais terciários de cinco diferentes regiões do Brasil, Doi e colaboradores demonstraram que *Candida* spp. foi o 7º agente mais frequente em infecções de corrente sanguínea, e a taxa de mortalidade geral relatada foi de 72% dos casos. A maior parte dos pacientes apresentava doenças de base malignas e 46,7% dos episódios ocorreram em UCIs (Doi et al. 2016).

A pandemia de COVID-19 provocou um aumento no número de internações de pacientes em UCIs, sobrecarregando a capacidade dos leitos de terapia intensiva e dos serviços de saúde. Cerca de 5% dos pacientes com COVID-19 apresentam condições críticas que requerem acompanhamento em UCIs, com risco elevado de desenvolver infecções hematogênicas por *Candida* spp. (Kayaaslan et al. 2022). Além disso, esses pacientes apresentam taxas de mortalidade mais elevadas em comparação com aqueles sem COVID-19 (Machado et al. 2022). Mesmo com tratamento antifúngico, as taxas de mortalidade entre tais pacientes varia entre 11 e 100% dos casos (Frías-De-León et al. 2021). Portanto, diagnosticar a candidemia no período inicial e iniciar tratamento adequado nesses pacientes de alto risco é crucial para reduzir a mortalidade (Nucci et al. 2021).

Das quase 150 espécies de *Candida* descritas até o presente, apenas 10% são conhecidas por causar infecções humanas (Ahmad and Alfouzan 2021). Cinco são as espécies responsáveis por mais de 90% das infecções hematogênicas em ambientes

hospitalares em todo o mundo: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis sensu lato*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pappas et al. 2016; Pfaller and Castanheira 2016). Nos últimos anos, a incidência de infecções por *C. albicans* reduziu de 70% para cerca de 50% dos casos, substituída por infecções por *C. glabrata* nos EUA (segunda espécie mais frequentemente isolada) e em muitos países europeus, e por infecções por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* em outras regiões, particularmente na América Latina e países asiáticos (da Matta, Souza, and Colombo 2017; Douglass et al. 2018; Giacobbe et al. 2020; Ahmad and Alfouzan 2021).

Algumas espécies de *Candida* estão relacionadas a padrões específicos de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos. Com o emprego indiscriminado desses fármacos na profilaxia e no tratamento, tem merecido destaque a incidência de infecções por espécies resistentes aos azólicos, principalmente ao fluconazol, entre as quais destacam-se *C. krusei* e *C. glabrata*; entretanto, isolados das outras espécies, têm sido referidos na literatura como resistentes (Barchiesi et al. 2016; Chapman et al. 2017). Recentemente, isolados de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol envolvidos em surtos hospitalares têm sido notificados em diversos países, incluindo o Brasil, e *Candida auris* é reconhecida como uma espécie multirresistente emergente em todo o mundo (Thomaz et al. 2018; Thomaz et al. 2022; de Jong and Hagen 2019).

Apesar da importância crescente de *Candida* spp. como agente etiológico de infecções graves em pacientes de risco, o diagnóstico precoce ainda permanece um desafio na prática clínica. Embora a candidemia seja causa frequente de sepse tardia, pode ser facilmente confundida com outras causas de sepse, por apresentar sinais e sintomas inespecíficos. Também contribuem para esta situação, a dificuldade para distinguir colonização de infecção verdadeira, além da limitada sensibilidade das hemoculturas (Chahoud, Kanafani, and Kanj 2013). Mesmo com os recentes avanços no diagnóstico, as taxas de mortalidade geral permanecem elevadas, em torno de 40%, e o tratamento pode ser prejudicado pelo aumento da resistência aos antifúngicos ou pelo surgimento de novas espécies patogênicas, como *Candida auris* (Gabaldón, Naranjo-Ortíz, and Marcet-Houben 2016).

O diagnóstico precoce de candidemia contribui de modo significativo para o sucesso do tratamento e prognóstico do paciente. Estudos conduzidos por diversos autores têm demonstrado, através de análises multivariadas, que a introdução precoce da terapia antifúngica apropriada é fator determinante de sobrevida (Puig-Asensio et al. 2014; Donnelly et al. 2020).

Apesar da baixa sensibilidade das hemoculturas, estimada em 40 a 60% dos casos, o isolamento da levedura a partir do sangue é ainda considerado padrão-ouro para o diagnóstico de candidemia. A sensibilidade pode ser prejudicada ainda mais nos casos em que os pacientes são expostos a tratamento empírico com fármacos antifúngicos (Clancy and Nguyen 2013; Pappas et al. 2016; Camp, Spettel, and Willinger 2020).

As técnicas imunológicas, visando a detecção de antígenos e de anticorpos, apresentam-se como uma opção diagnóstica, e têm sido frequentemente avaliadas em diversos centros médicos; entretanto, a detecção de antígeno de *Candida* é limitada pelo rápido *clearance* da corrente sanguínea, e a sensibilidade do teste é variável para as diferentes espécies de *Candida*. Os ensaios para pesquisa de anticorpos são pouco confiáveis em pacientes com imunossupressão. Deste modo, essas técnicas não têm se mostrado suficientemente precisas e confiáveis para serem utilizadas na prática clínica, contribuindo para a decisão terapêutica (Perfect 2013; Pfaller and Castanheira 2016).

A detecção de (1,3)- β -D-glucana (BDG), um dos principais componentes da parede celular de fungos, tem sido utilizada em estudos mais recentes, como marcador sorológico de infecções fúngicas invasivas. Os resultados positivos não são específicos para candidemia e/ou candidíase invasiva, e por esta razão, o teste tem maior aplicação quando empregado em grupos de pacientes cujo curso clínico ou presença de fatores de risco sejam sugestivos de infecção por *Candida* (Pfaller and Castanheira 2016; McKeating et al. 2018; Martin-Loeches et al. 2019).

Diversos estudos têm avaliado o desempenho do ensaio no diagnóstico da candidemia, demonstrando que a sensibilidade varia amplamente com um intervalo de 47-100%, sendo atribuída a diferenças no desenho do estudo, populações de pacientes e diferentes kits comerciais (Corcione et al. 2022). Por outro lado, esses mesmos estudos relatam seu elevado valor preditivo negativo, útil para indicar a suspensão do tratamento antifúngico em casos de terapia empírica (Liu et al. 2015; Kritikos et al. 2020).

Entretanto, o teste tem sido associado a um considerável número de resultados falso-positivos em pacientes de risco (Karageorgopoulos et al. 2011; Pfaller and Castanheira 2016). Outro fator limitante para sua utilização rotineira nos centros médicos da América Latina, e particularmente do Brasil, é o elevado custo dos testes disponíveis comercialmente (Colombo et al. 2013).

Pelo fato dessas metodologias apresentarem limitações de sensibilidade e/ou especificidade, bem como custos elevados para utilização em rotina clínica, os métodos moleculares se apresentam como uma alternativa no diagnóstico das candidemias. O

emprego da PCR para a detecção de *Candida* diretamente em amostras clínicas tem sido relatado em diversas publicações, demonstrando resultados promissores (Nguyen et al. 2012; Taira et al. 2014; Arvanitis et al. 2014; Kidd et al. 2019).

Entretanto, a diversidade das técnicas de amplificação, bem como de genes alvos e dos métodos de extração de DNA empregados, acarreta grande variabilidade nos valores de sensibilidade e especificidade, dificultando sua padronização e validação para emprego em laboratórios de rotina diagnóstica (Halliday et al. 2015; Kidd et al. 2019; Camp, Spettel, and Willinger 2020). Importante destacar, no entanto, que os valores preditivos negativos das diversas modalidades de PCR têm se mostrado consistentes, variando entre 88 e 100%, o que torna o teste, até o presente momento, mais útil para excluir do que estabelecer o diagnóstico de candidemia (Arvanitis et al. 2014; Halliday et al. 2015; Hasseine et al. 2015; Pfaller and Castanheira 2016).

A introdução do método de PCR em tempo real abriu novas perspectivas para o diagnóstico das infecções fúngicas, pois além da detecção, permite a quantificação da espécie envolvida e possibilita liberação de resultados em poucas horas. Entretanto, até o momento, poucos foram os ensaios de PCR em tempo real avaliados no diagnóstico de candidemia, o que tem limitado sua aprovação entre os clínicos (Clancy and Nguyen 2013; McKeating et al. 2018; Kidd et al. 2019).

A comercialização dos testes moleculares facilita a avaliação em larga escala, contribuindo para a validação clínica e consequente implementação nos laboratórios de rotina diagnóstica (Pfaller and Castanheira 2016). Atualmente estão disponíveis alguns testes comerciais para uso na detecção de *Candida* diretamente em amostras clínicas: *SepsiTest*, *Cand ID*, *MycoReal Candida*, entre outros. Estes testes, entretanto, têm demonstrado que os parâmetros de sensibilidade e especificidade não são superiores aos obtidos com os testes *in house* (Camp, Spettel, and Willinger 2020).

A plataforma comercial *T2 Candida panel* (T2 Biosystems) que integra uma PCR multiplex com detecção do produto amplificado por ressonância magnética, foi avaliada em estudo que empregou frascos de hemoculturas semeados com diferentes concentrações de UFC das cinco espécies de *Candida* mais frequentemente isoladas. Os resultados foram satisfatórios em relação ao tempo ($4,4 \pm 0,1$ h) e à precisão do diagnóstico, com sensibilidade variando de 84% a 100%, dependendo da espécie de *Candida*, e especificidade em torno de 99%; o limiar de detecção do patógeno na amostra clínica foi de 1 a 3 CFU/ml (Mylonakis et al. 2015). Dando continuidade ao estudo de 2015, o mesmo grupo avaliou a plataforma em 152 pacientes hospitalizados em diferentes centros

médicos. O teste molecular e as hemoculturas foram positivos em 45% e 24% dos pacientes, respectivamente, e para pacientes com hemoculturas positivas, a sensibilidade clínica do teste foi de 89% (Clancy et al. 2018). Apesar de representar um potencial avanço no diagnóstico laboratorial das candidemias, até o momento este teste comercial tem um custo muito elevado, dificultando sua aplicação em hospitais da rede pública no Brasil (White et al. 2021).

Embora diversos estudos conduzidos nas duas últimas décadas tenham demonstrado que os métodos moleculares apresentam maior rapidez e precisão no diagnóstico de infecções por *Candida*, quando comparados aos métodos convencionais, pois não necessitam de cultivo do agente infeccioso e são capazes de detectar o agente diretamente na amostra clínica, até hoje nenhum dos ensaios relatados forneceu evidências suficientes de sua acurácia para ser incorporado nos *guidelines*. Deste modo, a maioria dos laboratórios de rotina clínica, reluta em adotá-los em sua prática diagnóstica.

Os principais fatores que limitam sua aplicação em larga escala estão representados pela falta de padronização e consequente validação multicêntrica, sensibilidade analítica variável e dificuldade em estabelecer a metodologia de extração do ácido nucleico a partir das amostras clínicas (Pfaller and Castanheira 2016; Gabaldón and O'PATHY 2019; Kidd et al. 2019). Assim, novos estudos devem ser conduzidos, com o objetivo de avançar na padronização dessas técnicas, e garantir maior confiabilidade de resultados no diagnóstico laboratorial da infecção.

A técnica de MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry*) apresenta baixo custo e permite um fluxo de trabalho simplificado, atributos apropriados para emprego em rotinas laboratoriais. Devido à elevada acurácia, tem revolucionado a identificação de micro-organismos em laboratórios de microbiologia clínica (Clark et al. 2013; Panda et al. 2015). Nos últimos anos, o método tem sido avaliado para detectar e identificar o patógeno diretamente em balões de hemocultura positivos, permitindo resultados em menor tempo (Zengin Canalp and Bayraktar 2021). Nesses estudos, a identificação das espécies de *Candida* foram concordantes com as culturas em mais de 95% dos casos para *C. albicans*, e em torno de 85% para as demais espécies, com resultados obtidos em cerca de 30 minutos (Ferreira et al. 2011; Yan et al. 2011; Spanu et al. 2012; Pulcrano et al. 2013; Zengin Canalp and Bayraktar 2021).

A identificação do patógeno a partir do material dos balões de hemocultura, apresenta a vantagem de evitar procedimentos laboratoriais adicionais, como a utilização de meios de cultura e de sistemas automatizados de identificação fenotípica, reduzindo não somente o tempo para liberação dos resultados, mas principalmente os custos de análise (Tan et al. 2012; Bal and McGill 2018; Zengin Canalp and Bayraktar 2021).

Entretanto, a limitação da técnica para o diagnóstico de infecções de corrente sanguínea por *Candida*, é a exigência de hemoculturas positivas, que em episódios de candidemia, como já referido anteriormente, ocorrem com baixa frequência (Pitarch, Nombela, and Gil 2018).

A elevada morbimortalidade atribuída às candidemias em pacientes críticos, exige a definição de um diagnóstico laboratorial rápido e preciso, possibilitando a prescrição de terapia antifúngica precoce e correta, além de um melhor prognóstico para tais pacientes. Particularmente no Brasil, até o presente momento, há poucos relatos na literatura empregando ensaios de PCR convencional e nenhum estudo avaliando o desempenho da PCR em tempo real, da detecção de BDG e do método de MALDI-TOF no diagnóstico laboratorial dessa infecção (Del Negro et al. 2010; Xafranski et al. 2013; Taira et al. 2014).

2. JUSTIFICATIVA

A dificuldade no diagnóstico precoce de candidemia é largamente reconhecida pelas equipes médicas que atuam particularmente nas UCIs de hospitais terciários. Além dos índices de mortalidade relativamente elevados, episódios de candidemia aumentam de forma significativa os custos com a internação hospitalar, não somente aqueles relacionados à terapêutica antifúngica, mas também pela necessidade de manter os pacientes internados por períodos prolongados. A elevação dos custos resulta em significativo impacto econômico, particularmente em hospitais da rede pública. Esta situação clínica é agravada pela falta de testes diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos. Por outro lado, pacientes sem candidemia são expostos a tratamento antifúngico empírico desnecessário, que implica em interações e efeitos adversos potencialmente severos, e o uso indiscriminado destes fármacos pode contribuir para o desenvolvimento de resistência.

Este estudo foi conduzido pela primeira vez em três hospitais públicos terciários da cidade de São Paulo, com a intenção de introduzir na rotina diagnóstica laboratorial um método mais acurado de diagnóstico laboratorial, e contribuir para melhor manejo dos protocolos hospitalares de terapêutica antifúngica, resultando no melhor desfecho para o paciente e na diminuição significativa de custos para o hospital.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o desempenho dos ensaios de PCR em tempo real (qPCR) e detecção 1,3 β -D- glucana (BDG) diretamente nas amostras clínicas, para a detecção e identificação das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Além desses ensaios, avaliar a técnica de MALDI-TOF para a identificação do patógeno diretamente nos balões das hemoculturas positivas, possibilitando a liberação dos resultados de identificação das espécies de *Candida* em curto período.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Desenvolver a técnica de qPCR, estabelecendo o método de extração de DNA a partir das amostras de sangue total, definindo os *primers* espécie-específicos e as condições de amplificação;

3.2.2. Determinar a sensibilidade analítica para as cinco espécies de *Candida*, bem como a especificidade da técnica de qPCR;

3.2.3. Avaliar o desempenho da qPCR nas amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes incluídos no estudo;

3.2.4. Empregar o kit comercial Fungitell® (Cape Cod Inc., EUA) para a detecção de BDG nas amostras de soro dos pacientes do estudo;

3.2.5. Avaliar a acurácia do método de MALDI-TOF na detecção de espécies de *Candida* em balões de hemocultura com evidência de crescimento microbiano.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Casuística

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP/Plataforma Brasil (CAAE: 74805717.2.0000.0068) para a realização do estudo neste hospital e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), bem como pelo Centro de Desenvolvimento de Ensino e Pesquisa do Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual (IAMSPE) (CAAE: 74805717.2.3001.5463).

Os pacientes elegíveis para inclusão no estudo foram aqueles que apresentaram condições clínicas e fatores de risco para infecção hematogênica por *Candida* spp.. Para as análises dos resultados dos ensaios laboratoriais, os pacientes foram alocados em três grupos: pacientes com hemoculturas de sangue periférico positivas (Provados); pacientes com hemoculturas de sangue de cateter positivas e de sangue periférico negativas (Prováveis); e pacientes com hemoculturas negativas, porém com suspeita clínica de candidemia (Possíveis).

4.1.1. Critérios de inclusão:

Pacientes adultos, com hipótese diagnóstica ou suspeita clínica de candidemia, apresentando sepse/choque séptico, e fatores de risco como permanência nas UCIs por longos períodos, pacientes submetidos a cirurgias de grande porte, portadores de doenças malignas, uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, presença de cateter venoso central, uso de terapias imunossupressoras, e colonização por *Candida* spp., entre outros, que concordaram em participar do estudo (ou seus responsáveis), assinando os termos de consentimento livre e esclarecido.

4.1.2. Critérios de exclusão:

- a. Pacientes menores de 18 anos, e pacientes com AIDS em vigência de doença oportunista, pelo risco elevado da presença de infecção fúngica invasiva por outros agentes oportunistas (a presença destes patógenos resulta em testes positivos para BDG);
- b. Pacientes cujas coletas para as hemoculturas e para os ensaios de PCR foram realizadas com diferença de mais de 48 horas;
- c. Pacientes que estavam recebendo terapia antifúngica há mais de 48 horas no momento das coletas;

d. Pacientes e/ou responsáveis que não concordaram em participar do estudo e não assinaram os termos de consentimento livre e esclarecido.

4.2. Hemoculturas

Para as hemoculturas, foram coletados 10 ml de sangue periférico e/ou de sangue de cateter, para inoculação nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F™ e Plus Anaerobic/F™ (Becton Dickinson), que foram incubados no equipamento Bactec™ por até 7 dias, nos laboratórios clínicos dos hospitais onde esses exames são realizados rotineiramente.

4.3. Extrações de DNA dos protótipos de *Candida* spp., outros fungos patogênicos e bactérias

Extrações de DNA de cepas de referência de *C.albicans* (ATCC 90028), *C.glabrata* (ATCC 90050), complexo *C. parapsilosis* [*C. parapsilosis sensu stricto* (ATCC 22019), *C. orthopsilosis* (ATCC 96141) e *C. metapsilosis* (ATCC 96143)] , *C.tropicalis* (ATCC 750) e *C.krusei* (ATCC 6258) foram realizadas, para serem empregadas nas ampliações dos fragmentos gênicos a serem inseridos nos plasmídeos (clonagem).

Para verificação da especificidade do ensaio de qPCR, foram extraídas amostras de DNA de outras espécies de *Candida* (*C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C.guilliermondii* e *C. dubliniensis*) e de outros fungos patogênicos (*Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Cryptococcus* sp. e *Histoplasma* sp.). Também foram extraídas amostras de DNA de bactérias frequentemente isoladas em episódios de sepse em pacientes críticos (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia mascerans* e *Acinetobacter baumannii*).

As extrações de DNA das espécies de *Candida* e dos outros fungos patogênicos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Van Burik e colaboradores enquanto as extrações das bactérias foram realizadas com o emprego do *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen, Hilden). Amostras de DNA de indivíduos sem doença também foram empregadas para avaliação da especificidade dos ensaios moleculares (Van Burik et al. 1998).

Para avaliação da integridade do DNA extraído ou da presença de inibidores, as amostras de DNA foram submetidas a ampliações por PCR convencional com *primers*

da região do DNA ribossomal de fungos - ITS1 e ITS4, e *primers* da região 16S de bactérias (Luo and Mitchell 2002; Stranieri et al. 2016).

4.4. Seleção dos *primers* das cinco espécies de *Candida*

Foram empregados como genes alvos das ampliações, sequências parciais da região ITS2 do RNA ribossomal das cinco espécies de *Candida*, com *primers* já descritos na literatura, conforme demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. *Primers* utilizados nas ampliações por PCR convencional e qPCR

<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Amplificado	Referências
CALB1/2	F- GGGTTTGCTTGAAAGACGGTA R-TTGAAGATATACGTGGTGGACGTTA	108 pb	(Guiver, Levi, and Oppenheim 2001)
CGL1/2	F- GCGCCCCTTGCCTCTC R-CCCAGGGCTATAACACTCTACACC	124 pb	(Brinkman et al. 2003)
CTR1/2	F- CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT R- TGGCCACTAGCAAATAAGCGT	357 pb	(Luo and Mitchell, 2002)
CPAR1/2*	F- GCCAGAGATTAACACTCAACCAA R- CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC	297 pb	(Luo and Mitchell, 2002)
CKR1/2	F- CTCAGATTTGAAATCGTGCTTTG R- GGGGCTCTCACCCCTCCTG	113 pb	(Brinkman et al., 2003)

CALB = *C. albicans*; CGL = *C. glabrata*; CTR = *C. tropicalis*; CPAR = *C. parapsilosis*; CKR = *C. krusei*

* *Primers* do complexo *C. parapsilosis*

4.4.1. Matriz de *primers* para uso nas ampliações por qPCR

Após definirmos os cinco conjuntos de *primers* espécie-específicos a serem utilizados na técnica de qPCR, executamos o que denominamos de matriz de *primers*, ou seja, definimos a menor concentração dos mesmos capaz de gerar maior eficiência de reação com menor valor de *Ct*, sem a presença de dímeros, conforme demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Matriz de otimização dos *primers* em µM

<i>Primer F</i>	0,05	0,05	0,05	0,05
<i>Primer R</i>	0,05	0,20	0,40	0,90
<i>Primer F</i>	0,20	0,20	0,20	0,20
<i>Primer R</i>	0,05	0,20	0,40	0,90
<i>Primer F</i>	0,40	0,40	0,40	0,40
<i>Primer R</i>	0,05	0,20	0,40	0,90
<i>Primer F</i>	0,09	0,90	0,90	0,90
<i>Primer R</i>	0,05	0,20	0,40	0,90

Os ensaios de qPCR foram realizados com as combinações de concentração dos *primers* descritas na tabela acima, para amplificar 10pg, 1 pg e 100 fg de DNA de cada espécie de *Candida*. em temperatura de 60° C.

4.4.2. Avaliação da temperatura de hibridização dos cinco pares de *primers* para as ampliações por qPCR

Selecionados os cinco pares de *primers* e definidas as concentrações de cada um, a etapa seguinte foi realizada para avaliar a melhor temperatura de hibridização de cada par de *primer* que resultasse em melhor eficiência de amplificação, com valores de sensibilidade analítica ou limiar de detecção satisfatórios. Os ensaios foram realizados com os cinco pares de *primers*, em uma faixa que variou de 58 a 64°C na etapa de hibridização. As ampliações foram realizadas com diluições dos plasmídeos obtidos pela clonagem das cinco espécies de *Candida*.

4.5. Clonagem dos fragmentos amplificados a partir de sequências gênicas das cinco espécies de *Candida*

Para a construção das curvas de calibração a serem empregadas nos ensaios de qPCR, foram utilizados plasmídeos contendo fragmentos das sequências gênicas da região ITS do DNA ribossomal de *Candida* spp., presente em múltiplas cópias (50-100) no genoma da levedura (Chen et al. 2000). Os fragmentos foram obtidos a partir de ampliações de amostras de DNA extraídas das cinco espécies de *Candida* por PCR convencional com os *primers* da **Tabela 1**.

Para a inserção nos plasmídeos, os fragmentos amplificados foram previamente purificados utilizando-se o kit *Illustra ExoProStar 1-STEP* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. A inserção dos fragmentos de DNA nos plasmídeos foi realizada utilizando-se o *CloneJET PCR Cloning kit* (Thermo Scientific) e 10-15 ng dos amplificados purificados, seguindo as etapas descritas pelo fabricante do kit. As demais etapas para obtenção dos plasmídeos recombinantes (preparo das bactérias *E. coli* competentes, transformação destas e extração dos plasmídeos) foram realizadas de acordo com metodologia previamente descrita (Sambrook 2001).

Para identificar a presença dos insertos nos plasmídeos recombinantes, seis clones de cada espécie de *Candida* foram submetidos aos ensaios de PCR convencional, empregando-se os *primers* homólogos às sequências do vetor, próximas ao sítio de clonagem (*pJET1.2/blunt Cloning Vector*, Thermo Fisher), fornecidos pelo *CloneJET*

PCR Cloning kit. As ampliações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, em termociclador Veriti (Applied Biosystems). Os amplificados foram purificados com o kit *Illustra ExoProStar 1-STEP* e submetidos às reações de sequenciamento no equipamento *ABI 3500 DNA Analyser* (Thermo Fisher).

4.6. Análise das curvas de calibração da qPCR para avaliação da eficiência das ampliações por qPCR e o limiar de detecção

Para avaliar a eficiência dos ensaios de qPCR para cada DNA alvo, indicativa da precisão dos resultados, 20 ensaios independentes foram realizados, em dias diferentes, com as diluições seriadas dos plasmídeos. As diluições utilizadas foram na razão 10, indo de 1×10^7 até 1×10^0 UFC/ml de cada uma das cinco espécies de *Candida*. Os ensaios foram realizados no equipamento *ABI StepOne Plus RealTime PCR system* (Applied Biosystems) empregando o *Power SYBR Green PCR master mix* (Thermo Fisher). O programa de ciclagem consistiu em uma etapa de denaturação inicial à 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 10s, hibridização a 62°C por 20s e extensão a 72°C por 30s. Por fim, foi programada uma etapa para a formação da curva de dissociação (*melting curve*), de 50°C até 95°C, com incrementos de 0,3°C/s. Amplificações foram consideradas positivas havendo detecção de sinal fluorescente que cruzava a linha de *threshold* (*Ct*) até 36 ciclos de amplificação.

Para verificar se a presença de DNA humano das amostras clínicas poderia interferir na eficiência das ampliações, foram executados ensaios de qPCR com um *spike-in* com 50 ng de DNA humano de indivíduo sem doença, nos oito pontos da curva. A interferência do DNA humano resulta em curvas de regressão linear não paralelas às curvas obtidas somente com os clones recombinantes.

As curvas geradas pelo número de cópias dos clones e seus respectivos valores de *Ct* foram empregadas para o cálculo da equação de regressão linear e a correlação entre as variáveis pelo R^2 . A inclinação da curva (*slope*), R^2 e eficiência dos ensaios foram calculados (Bustin et al. 2009). Os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação foram calculados com o programa *SPSS Statistics Versão 24.0* (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4.7. Avaliação da especificidade dos primers

As amostras de DNA de outras espécies de *Candida* spp., outros fungos patogênicos e bactérias, bem como amostras de DNA de indivíduos sem doença, foram

então submetidas às amplificações por qPCR para avaliação da especificidade dos *primers* da **Tabela 1**, bem como a possibilidade de reatividade cruzada entre as cinco espécies de *Candida*. Em todos os ensaios foram empregadas amostras de DNA homólogos aos *primers* como controles positivos, e para cada reação foram utilizados controles negativos (água estéril). As reações foram realizadas nas mesmas condições de ciclagem descritas nos itens anteriores.

4.8. Protocolo de extração de DNA a partir de amostras de sangue “batizadas” com suspensão das 5 espécies de *Candida*

Para a padronização do procedimento de extração de DNA nas amostras clínicas, iniciamos os testes com amostras de sangue de indivíduos saudáveis, semeadas com suspensão das leveduras de *Candida*, nas concentrações de 1×10^6 a 1×10^0 UFC/ml.

Antes do procedimento de extração, foram adicionados aos tubos, 1×10^4 plasmídeos com a sequência parcial do gene da giberelina obtida da planta *Arabidopsis thaliana* como controle exógeno interno (Luciano et al. 2007). A presença do controle interno é importante para indicar se a falta de sinal de amplificação das amostras pode ter ocorrido por mal funcionamento do termociclador, falhas no preparo do mix de reagentes ou da *Taq* polimerase, ou ainda presença de inibidores que impedem as amplificações (Hoorfar et al. 2003). Para a “quebra” da parede celular das leveduras, foram adicionadas aos tubos contendo o sangue “batizado”, *glass beads* (Sigma). Os tubos contendo os *pellets* de células com as diferentes concentrações de leveduras foram submetidos ao processo de sonicação no equipamento homogeneizador ultrassônico (Modelo Fast Prep-24 5G, MP Biomedical) em solução de lise (*Rapid Pure DNA Tissue Kit* (MP Biomedical)). Em seguida, as extrações de DNA foram realizadas de acordo com as instruções do *Rapid Pure DNA Tissue Kit* (MP Biomedical). A determinação da concentração de DNA das amostras, obtidas pelos dois protocolos de extração, foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo). As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

4.9. Ensaios de qPCR com as amostras de sangue semeadas com *Candida*

Para as amplificações por qPCR, foram preparados 20 μl de solução contendo 10 μl do *Power SYBR® Green PCR master mix* (Applied Biosystems), 0,5 μL dos *primers* espécie-específicos e *primers* da *A. thaliana* (controle interno exógeno), e 5 μl (100 ng) de DNA de cada amostra dos pacientes em microplacas *MicroAmp Fast 96-well reaction*

plate (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram as mesmas empregadas no ítem 4.7. Os ensaios foram realizados em triplicata e, em todos os ensaios foram incluídas as curvas de calibração (1×10^5 a 1×10^1 plasmídeos recombinantes) como controles das amplificações e água ultrapura como controle negativo.

4.10. Avaliação do desempenho da qPCR para o diagnóstico de candidemia nas amostras dos pacientes do estudo

Foram coletados em torno de 3 ml de sangue dos pacientes incluídos no estudo em tubos de EDTA. As coletas foram realizadas pelas equipes de enfermagem das unidades hospitalares por punção de veia periférica e/ou do cateter venoso. As extrações de DNA das amostras clínicas foram realizadas pelos mesmos procedimentos empregados para as amostras de sangue “batizadas” (ítem 4.8). Todas as amostras foram previamente amplificadas por PCR convencional com *primers* de uma sequência gênica que codifica a β -actina humana, para assegurar que o DNA estivesse íntegro, sem a presença de inibidores da PCR, o que poderia levar a resultados falso-negativos.

Os ensaios de qPCR foram realizados de acordo com o mesmo protocolo descrito no ítem 4.9. As amostras de DNA foram submetidas às amplificações com os *primers* das cinco espécies de *Candida* separadamente e, em todos os ensaios foram incluídos cinco pontos das curvas de calibração. Amplificações foram consideradas positivas havendo detecção de sinal fluorescente que cruzava a linha de *threshold* (*Ct*) até o 36° ciclo. Os resultados foram analisados pelo *StepOne Software version 2.3* (Applied Biosystems).

4.11. Detecção e identificação das espécies de *Candida* nos balões de hemocultura por espectrometria de massa (EM) MALDI-TOF

Os frascos de hemoculturas positivos foram analisados pela técnica de EM MALDI-TOF. O extrato proteico a ser submetido às análises pela técnica, foi obtido por metodologia previamente descrita (Jeddi et al. 2017). Inicialmente os frascos foram homogeneizados e 1,8 ml do conteúdo do frasco foram transferidos para um microtubo de 2 ml. O tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi removido e acrescentou-se 1,8 ml de água estéril, acrescidos de 18 μ l de solução de dodecil sulfato de sódio (Merck) a 10%. A mistura foi mantida por 10 minutos a temperatura ambiente, com agitação em vórtex em intervalos de 2 min. Em seguida, nova centrifugação do tubo a 13.000 rpm por 2 minutos, com descarte do sobrenadante, e nova lavagem com água

estéril. Esta etapa foi repetida até que o *pellet* de células estivesse livre de hemácias. Em seguida, foram adicionados ao tubo 300 µl de água estéril e 900 µl de etanol absoluto (Merck), e a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e deixou-se “secar” o *pellet* em ar ambiente. Ao *pellet* seco, foram adicionados 50 µl de ácido fórmico (Sigma) a 70%, o tubo foi submetido à agitação em vórtex e, em seguida, foram adicionados 50 µl de acetonitrila (Sigma). Nova agitação em vórtex, incubação da mistura por 5 min, e o tubo foi novamente centrifugado a 13.000 rpm por 2 min. Aplicou-se 1 µl do sobrenadante nos spots da lâmina (VITEK® MS *target slides*) e, após secagem, foi adicionado 1 µl da matriz (ácido alfa-4-ciano-hidroxicinâmico, Sigma). Após nova secagem, a lâmina foi colocada no equipamento Vitek MS (BioMérieux) para as análises pelo *software* SARAMIS. Os espectros obtidos foram comparados ao banco de espectros do equipamento para a identificação do micro-organismo presente na amostra clínica.

4.12. Detecção de BDG em amostras de soro dos pacientes

As amostras de soro foram coletadas simultaneamente às coletas para PCR em tempo real (qPCR), e a BDG sérica foi determinada utilizando-se o *kit Fungitell*® (Cape Cod Inc., EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de soro foram armazenadas a -80°C antes da execução da técnica, e os testes foram realizados em duplicata. O *kit Fungitell*® é um teste de diagnóstico que detecta BDG no soro através de uma cascata biológica baseada numa modificação do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL), um extrato das células sanguíneas do caranguejo *Horseshoe Crab*. O composto BDG ativa o fator G, um zimogênio da serina protease. Este, uma vez ativado, converte a enzima de pré-coagulação inativa em enzima de coagulação ativa, que, por sua vez, cliva a paranitroanilida (pNA) a partir do substrato peptídico cromogênico (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA), criando um cromóforo, a paranitroanilina, que absorve a luz a 405 nm. A leitura foi realizada no espectrofotômetro modelo Elx808 (Biotek), durante 40 minutos (leitura cinética), e os resultados foram expressos em pg/ml. Os critérios de positividade dos valores de BDG nas amostras de soro, de acordo com os fabricantes do kit são: negativo < 60 pg/ml; indeterminado 60–79 pg/ml; e positivo ≥ 80pg/ml.

4.13. Análises estatísticas

A padronização dos ensaios de qPCR foi avaliada por estatística descritiva que compreendeu: média, desvio padrão, intervalo de confiança, valores máximo e mínimo,

e coeficiente de variação. Os demais dados foram analisados pelo SPSS for Windows versão 24.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Para os parâmetros categóricos, foram usadas porcentagens e para as variáveis contínuas, foram calculadas as medianas e os intervalos interquartis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos pacientes

Durante o período do estudo foram inicialmente elegíveis pelas equipes clínicas, 95 pacientes internados nas unidades de cuidados intensivos dos três hospitais. Entretanto, deste total, não foi possível incluir no estudo 17 pacientes, a saber: em oito pacientes, não houve coleta simultânea de amostras para hemocultura, qPCR e BDG; cinco estavam recebendo antifúngicos há mais de 48 horas antes da coleta; para quatro pacientes não obtivemos o consentimento dos familiares para inclusão no estudo. Deste modo, restaram 78 pacientes que atendiam aos critérios de inclusão do estudo, cujas coletas ocorreram entre 15/05/2018 e 15/03/2020 (**Figura 1**).

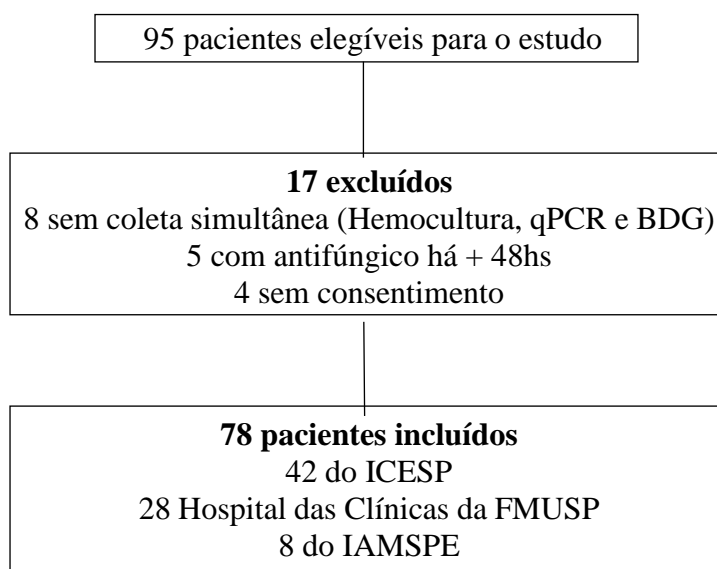


Figura 1. Fluxograma para seleção dos pacientes

De maneira geral, pouco mais da metade dos pacientes era do sexo masculino (51,6%), com mediana de idade de 60 anos. A principal doença de base apresentada por estes pacientes foi neoplasia (66,6%, sendo em 90% desses, casos de tumor sólido). A mediana do escore SAPS3 (*Simplified Acute Physiology Score*) na admissão dos pacientes nas UTIs foi de 64 (menor valor atribuído pelo escore é 31 e o maior é 111 pontos – (Silva Junior et al. 2010), e a mediana do tempo de internação até a suspeita clínica de infecção por *Candida* foi de 12,5 dias (IIQ 8 – 25). Todos os pacientes faziam uso de cateter venoso central (100%) e receberam antibioticoterapia de amplo espectro por mais de 96 horas no momento da coleta. Cinquenta e sete pacientes (73,1%) tinham colonização prévia por

Candida spp. em pelo menos um sítio do organismo. A taxa de mortalidade geral em 30 dias foi de 48,7%. Os dados demográficos e características clínicas apresentadas pelos pacientes no momento da inclusão estão demonstrados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Dados demográficos e características clínicas dos 78 pacientes admitidos nas UTIs do Hospital das Clínicas da FMUSP, ICESP e IAMSPE

Variáveis		Pacientes
Idade (anos)	Mediana	60 (20-85)
Gênero M/F		40(51,6%)/38(48,4%)
Doenças subjacentes		
	Neoplasias	52 (66,6%)
	Insuficiência renal	8 (10,2%)
	Outros	18 (23,2%)
Fatores de risco		
	Cateter venoso central	78 (100%)
	Colonização prévia por <i>Candida</i> spp.	57 (73,1%)
	Ventilação mecânica	35 (44,9%)
	Nutrição parenteral	25 (32,0%)
	Hemodiálise	22 (28,2%)
Escore SAPS3	Mediana	64 (31-111)
Tratamento prévio		
	Antibacterianos	78 (100%)
	Corticóides	32 (41,0%)
Tempo de internação na UTI anterior à suspeita clínica de infecção (dias)		
	Mediana	12,5 (1-120)
Desfecho em 30 dias		
	Óbitos	38 (48,7%)

5.2. Classificação dos pacientes do estudo em provados, prováveis e possíveis de desenvolver candidemia

De acordo com os resultados das hemoculturas e das culturas de outros sítios do organismo (cultura de sangue de cateter, culturas de sonda vesical de demora e de secreção traqueal), e com base nos critérios EORTC/MSG, os 78 pacientes foram classificados neste estudo como provados, prováveis e possíveis de apresentarem candidemia. Deste modo, os provados, que somaram 20 pacientes, foram aqueles que

apresentaram hemoculturas de sangue periférico positivas, com isolamento e identificação do patógeno. Foram considerados como prováveis, 44 pacientes com hemoculturas de sangue periférico negativas, mas que apresentaram culturas de outros sítios positivas para *Candida* spp., em sua maioria de sangue coletado do cateter venoso central; e os 14 pacientes possíveis de desenvolver a infecção de corrente sanguínea, foram aqueles com todas as culturas negativas para *Candida* spp., mas com suspeita clínica de infecção por *Candida* (Donnelly et al. 2020).

5.3. Hemoculturas

Dos 78 pacientes incluídos no estudo, 20 (25,6%) tiveram isolamento de *Candida* nas hemoculturas de sangue periférico, sendo que em sete pacientes (35%) foi isolada *C. albicans*, em cinco pacientes (25%) *C. parapsilosis* sensu stricto, em um *C. orthopsilosis* (5%), em três (15%) *C. glabrata* e em quatro (20%) *C. tropicalis*. Não houve isolamento de *C. krusei* nas hemoculturas de sangue periférico dos pacientes deste estudo (**Tabela 4**).

A distribuição das espécies de *Candida* isoladas de corrente sanguínea nos três hospitais envolvidos no estudo foi similar à de outros estudos em hospitais brasileiros divulgados mais recentemente. Canela e colaboradores relataram prevalência de *C. albicans* (44%), seguida de 19% de *C. glabrata*, 19% de *C. tropicalis* e 14% de *C. parapsilosis* em 79 episódios de infecção de corrente sanguínea em um hospital terciário universitário no Estado de São Paulo (Canela et al. 2018). Outros autores, em estudo retrospectivo de 15 anos, também em hospital terciário universitário, observaram em 331 episódios de candidemia e/ou candidíase sistêmica, discreta prevalência de *C. albicans* (37,5%), seguida de *C. tropicalis* (28,1%), *C. parapsilosis* (18,4%), *C. glabrata* (6,9%) e *C. krusei* em menos de 1% dos casos (Braga et al. 2018).

Ressalte-se que a maior prevalência de *C. parapsilosis* observada nos episódios de candidemia do nosso estudo, quando comparada a dos outros relatos, deve-se ao fato de que durante o período da investigação, ocorreu um surto de infecções por essa espécie na UTI do ICESP (Thomaz et al. 2022).

As limitações das hemoculturas para diagnóstico de candidemia são largamente reconhecidas. Embora avanços nas técnicas microbiológicas tenham proporcionado melhora na recuperação das espécies de *Candida* em amostras sanguíneas, a baixa carga fúngica e o caráter transitório da candidemia, resultam na baixa sensibilidade das hemoculturas (Pappas et al. 2016). Além disso, o emprego profilático ou empírico de

fármacos antifúngicos nos pacientes de risco pode reduzir ainda mais a sensibilidade (Nguyen et al. 2012; Clancy and Nguyen 2013). Em nosso estudo, alguns pacientes portadores de neoplasia, admitidos na UCI do ICESP, haviam recebido antifúngico profilático em períodos anteriores à suspeição de infecção por *Candida* (quando internados nas enfermarias, antes da internação na UCI, por piora do quadro clínico), o que pode ter influenciado o número elevado de hemoculturas negativas nesses pacientes. Outra possível razão para a baixa positividade das hemoculturas de sangue periférico nos pacientes prováveis, é que a colonização por *Candida* spp. em outros sítios do organismo, como sonda vesical e secreção traqueal, não está necessariamente relacionada à infecção sistêmica, particularmente em pacientes não neutropênicos (Pappas et al. 2016).

Por outro lado, o cateter venoso central é frequentemente relacionado a casos de candidemia (Fernández-Cruz et al. 2014). No presente estudo, em 32 pacientes do grupo dos prováveis (72,8%), as hemoculturas de sangue de cateter foram positivas, sem isolamento de *Candida* em sangue periférico (**Tabela 5**). Outros autores verificaram resultados similares aos nossos, com maior frequência de isolamentos em sangue de cateter do que em sangue periférico no mesmo paciente (Hashemi Fesharaki et al. 2018), mas são raros os casos citados na literatura descrevendo esta condição (De Almeida et al. 2014). Assim, para se compreender melhor a possível associação entre o cateter colonizado por *Candida* e a ocorrência de episódios de candidemia em pacientes de risco, estudos clínicos multicêntricos, envolvendo grande número de pacientes, devem ser propostos.

Nos demais pacientes deste grupo (n=12) não houve isolamento em sangue de cateter, mas foram isoladas espécies de *Candida* de sonda vesical de demora (> 100.000 UFC/ml) em 10 pacientes, e de secreção traqueal (> 500.000 UFC/ml) em 2 pacientes (dados não mostrados). Não houve isolamento de *Candida* nas amostras dos 14 pacientes possíveis de desenvolver candidemia (**Tabela 6**).

Tabela 4. Resultados das hemoculturas, MALDI-TOF, dosagem de BDG e dos ensaios de qPCR nas amostras clínicas dos 20 pacientes com candidemia comprovada

Pacientes	Hemoculturas	MALDI-TOF	BDG* (pg/ml)	qPCR (Ct)
P3	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	>500	<i>C. albicans</i> (35,6)
P10	<i>C. glabrata</i>	Indeterminado	>500	<i>C. glabrata</i> (20,1)
P11	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	369,7	<i>C. albicans</i> (18,8)
P14	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	126,1	<i>C. albicans</i> (24,2) - <i>C. glabrata</i> (31,0)
P25	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	433,2	<i>C. glabrata</i> (20,8)
P29	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	>500	<i>C. parapsilosis</i> ** (29,2)
P40	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	>500	<i>C. tropicalis</i> (35,4)
P56	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	121,5	<i>C. parapsilosis</i> (35,8)
P59	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	193,3	<i>C. parapsilosis</i> (20,7)
P64	<i>C. parapsilosis</i>	Indeterminado	361,3	<i>C. parapsilosis</i> (18,1)
P68	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	>500	<i>C. tropicalis</i> (21,2) - <i>C. glabrata</i> (30,8)
P69	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	>500	<i>C. tropicalis</i> (22,1)
P71	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	422	<i>C. tropicalis</i> (20,5)
P74	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	>500	<i>C. albicans</i> (21,1)
P78	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<7,8	<i>C. parapsilosis</i> (28,6)
P84	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	>500	<i>C. glabrata</i> (19,6)
P86	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	391,1	<i>C. parapsilosis</i> (30,6)
P88	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	>500	<i>C. albicans</i> (23,0) - <i>C. krusei</i> (27,1)
P89	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	>500	<i>C. albicans</i> (22,2)
P91	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<7,8	<i>C. albicans</i> (22,6) - <i>C. parapsilosis</i> (35,0)

* Critérios de positividade dos valores de BDG nas amostras de soro, de acordo com o *Fungitell® Assay kit* (Cape Cod Inc.): **Positivo** ≥ 80 pg/ml. ** *primers* para complexo *C. parapsilosis* Ct = cycle threshold
Indeterminado = mais de um micro-organismo presente na amostra de sangue periférico

Tabela 5. Resultados das hemoculturas, MALDI-TOF, dosagem de BDG e dos ensaios de qPCR nas amostras clínicas dos 44 pacientes prováveis

Pacientes	Hemoculturas	β -D-Glucana* (pg/ml)	qPCR (Ct)
P6	Negativo	229,4	Negativo
P8	Negativo	25,8	Negativo
P9	Negativo	33,9	Negativo
P15	Negativo	276,5	Negativo
P16	Negativo	73,3	Negativo
P17	Negativo	57,9	Negativo
P20	Negativo	97	Negativo
P21	Negativo	51,6	Negativo
P22	Negativo	106,7	Negativo
P23	Negativo	437,7	Negativo
P26	Negativo	124,6	Negativo
P27	Negativo	85	Negativo
P28	Negativo	>500	Negativo
P30	Negativo	208,6	Negativo
P34	Negativo	>500	Negativo
P35	Negativo	208,6	Negativo
P37	Negativo	131	Negativo
P39	Negativo	28,1	Negativo
P42	Negativo	64,1	Negativo
P43	Negativo	7,8	Negativo
P45	Negativo	136,1	Negativo
P48	Negativo	>500	Negativo
P49	Negativo	349,3	Negativo
P51	Negativo	31,3	Negativo
P52	Negativo	523	<i>C. albicans</i> (29,7)
P53	Negativo	359,9	Negativo
P54	Negativo	31,8	Negativo
P57	Negativo	47,2	Negativo
P60	Negativo	>500	Negativo
P61	Negativo	424,4	<i>C. albicans</i> (28,9)
P62	Negativo	41,2	Negativo
P65	Negativo	353,4	Negativo
P66	Negativo	157	<i>C. krusei</i> (23,0)
P70	Negativo	7,8	Negativo
P72	Negativo	7,8	Negativo
P73	Negativo	7,8	<i>C. parapsilosis</i> (17,3)
P77	Negativo	146,3	Negativo
P81	Negativo	7,8	Negativo
P82	Negativo	7,8	Negativo
P83	Negativo	>500	Negativo
P87	Negativo	457	<i>C. glabrata</i> (17,8)
P92	Negativo	>500	<i>C. tropicalis</i> (33,7)
P93	Negativo	228,8	Negativo
P94	Negativo	131,3	Negativo

Tabela 6. Resultados das hemoculturas, MALDI-TOF, dosagem de BDG e dos ensaios de qPCR nas amostras clínicas dos 14 pacientes possíveis

Pacientes	Hemocultura	β -D-Glucana* (pg/ml)	qPCR (Ct)
P1	Negativo	333,4	Negativo
P2	Negativo	77,2	Negativo
P4	Negativo	46,1	Negativo
P18	Negativo	9,5	Negativo
P19	Negativo	51,6	Negativo
P24	Negativo	51,8	Negativo
P31	Negativo	16,9	Negativo
P32	Negativo	7,8	Negativo
P33	Negativo	9,7	Negativo
P38	Negativo	37,6	Negativo
P44	Negativo	36,8	Negativo
P47	Negativo	15,5	Negativo
P63	Negativo	38,4	Negativo
P79	Negativo	7,8	Negativo

5.4. MALDI-TOF

Em relação aos testes realizados pelo método de MALDI-TOF a partir dos frascos de hemocultura, tanto do sangue periférico como do sangue de cateter, foi possível observar concordância de 90% na identificação das espécies de *Candida* no grupo dos 20 pacientes provados. Em dois casos, as culturas foram positivas para dois micro-organismos (em um caso *C. glabrata* + *E. faecium*, e no outro caso *C. parapsilosis* + *S. epidermidis*) (Tabela 4). O resultado indeterminado é consequência de uma limitação deste método, pois a presença de mais de um micro-organismo na amostra clínica (co-infecção), dificulta a correta identificação do patógeno (Spanu et al. 2012; Pulcrano et al. 2013). A técnica também foi realizada em frascos de hemocultura positivos para sangue de cateter em 10 dos 44 pacientes prováveis, demonstrando concordância de identificação em 100% dos casos.

No grupo de pacientes prováveis, a técnica de MALDI-TOF foi aplicada nos balões positivos incubados com as amostras de sangue de cateter. A identificação pela espectrometria de massa foi concordante em 100% dos casos com isolamento a partir do cateter (dados não mostrados).

O tempo médio para a realização dos testes até a identificação final das espécies de *Candida* foi de 2 horas, demonstrando que o emprego de MALDI-TOF, diretamente nos frascos positivos de hemocultura, reduz de modo significativo o tempo para liberar

os resultados com a identificação do patógeno na amostra clínica, o que certamente beneficia os pacientes que podem receber terapia adequada em prazo de tempo bem inferior ao obtido pelas culturas (Cattani et al. 2015). Além disso, o emprego do protocolo de extração *in-house*, utilizando solução de SDS 1,8% para a lise das hemácias (Jeddi et al. 2017) foi muito efetivo para a identificação das leveduras, procedimento alternativo de menor custo, se comparado ao emprego do kit de extração proteica comercial *Sepsityper* (Brucker Daltonics). Os resultados foram superiores aos de Bal e colaboradores que, utilizando este kit, verificaram 62,5% de concordância na identificação das espécies. Por outro lado, foram comparáveis aos obtidos pelo grupo do Bidart, que também empregou a solução de SDS para as extrações, com concordância de 88,8% em relação às culturas, superior ao que obtiveram com o uso do *Sepsityper* (81,7% de concordância) (Bidart et al. 2015; Bal and McGill 2018).

5.5. Ensaio de qPCR

5.5.1. Avaliação da matriz dos *primers*: concentração e temperatura de hibridização dos cinco pares de *primers* para as amplificações por qPCR

Os testes foram realizados com os cinco pares de *primers*, com concentrações distintas, em uma faixa que variou de 58 a 64°C na etapa de hibridização. Os diversos experimentos demonstraram que a concentração dos *primers* capaz de gerar maior eficiência de reação com menor valor de *Ct*, sem a presença de dímeros foi de 200 µM e a temperatura de hibridização de 62°C resultou em limiares de detecção que atingiram valores de 1×10^1 até 1×10^0 UFC/ensaio, dependendo da espécie de *Candida* analisada. A partir dessas análises, os parâmetros empregados nas ciclagens ficaram definidos para os experimentos seguintes, conforme descrito abaixo.

Holding stage: 95°C - 5 min

Cycling stage: 40 ciclos

95°C – 30s

62°C – 30s (annealing)

72°C – 30s

Holding stage: 72°C - 2 min

Melt curve: 60°C a 95°C, com incrementos de 0,3°C/s

5.5.2. Análise das curvas de calibração contendo DNA humano para avaliação da eficiência das amplificações por qPCR

É possível observar, na figura abaixo, que as curvas de regressão linear dos plasmídeos recombinantes “puros” e misturados ao DNA humano, ficaram muito semelhantes, demonstrando que não houve interferência deste na eficiência das amplificações (**Figura 2**). A partir desses resultados, os ensaios foram executados utilizando somente as diluições dos plasmídeos como curvas de calibração.

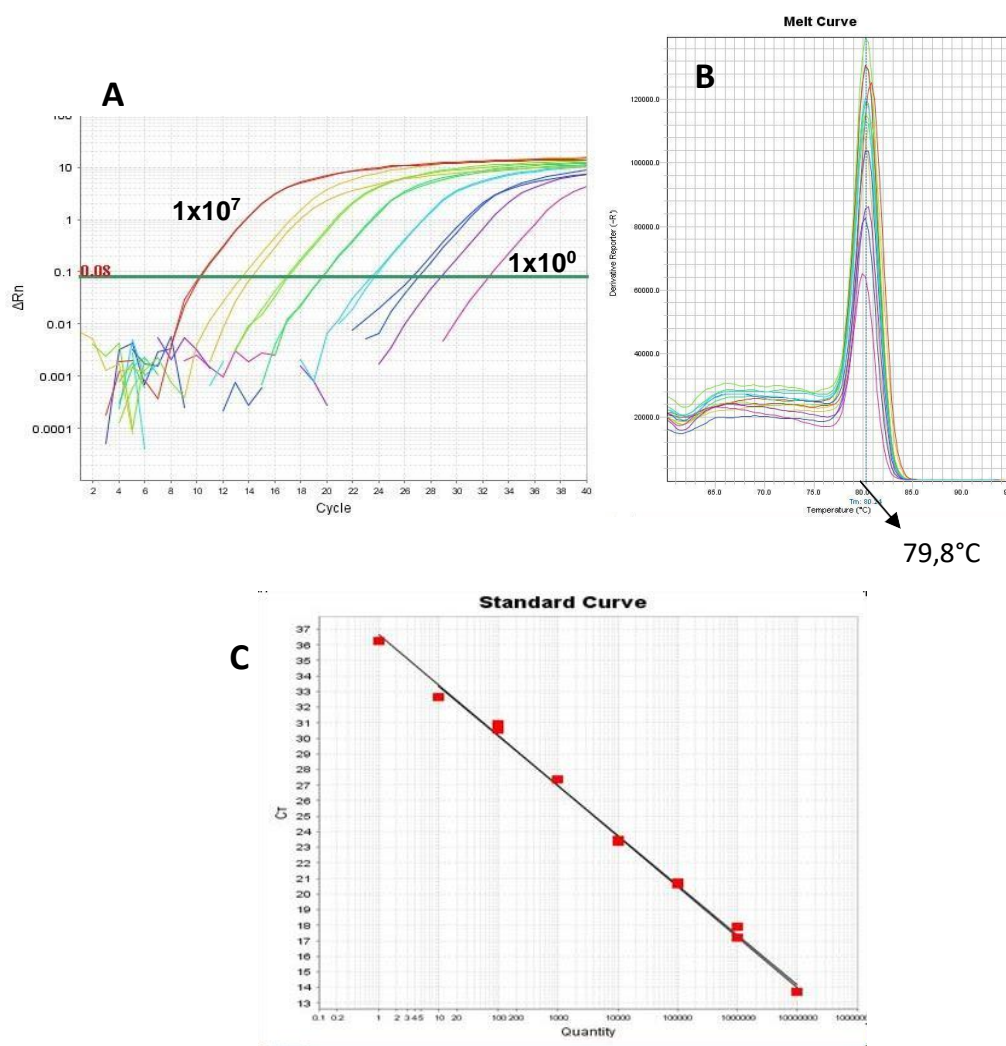


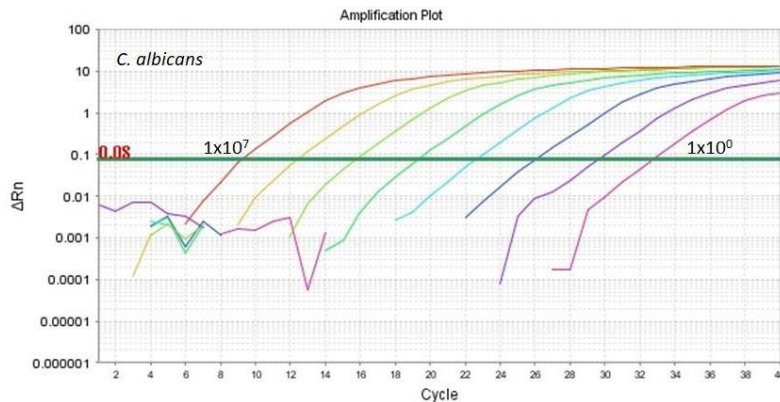
Figura 2. Curvas dos plasmídeos recombinantes de *C.albicans* de 1×10^7 até 1×10^0 UFC/ensaio com e sem DNA obtido de sangue de indivíduo sadio. A – Curvas de amplificação; B – Curvas *Melting*; C – Regressão linear mostrando superposição das duas retas.

5.5.3. Avaliação do limiar de detecção da qPCR através das curvas de calibração para as cinco espécies de *Candida*

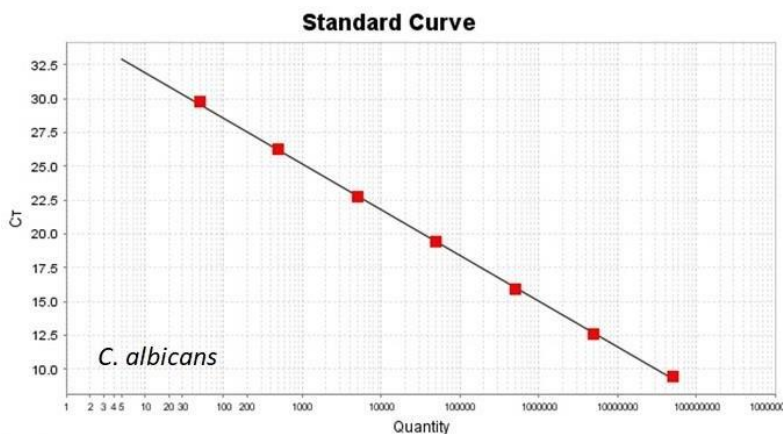
De acordo com o *MIQE Guideline (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)*, o limiar de detecção é definido como a menor concentração do gene alvo, detectada nas amostras positivas, em 95% dos ensaios (Bustin et al. 2009). Os resultados demonstraram que o limiar de detecção (LD) dos ensaios de qPCR foi de 1×10^1 cópias/ensaio, uma vez que esta concentração foi atingida em 100% dos 20 ensaios realizados, para as cinco espécies de *Candida*. Esses resultados são comparáveis aos da literatura, como demonstrados por (McMullan et al. 2008; Tardif and Schlaberg 2017).

Foram calculados os coeficientes de variação (CV), verificando-se que em sua maioria, os ensaios apresentaram valores bastante homogêneos e muito abaixo de 20%, intervalo considerado como válido para a variação das eficiências dos ensaios (Bustin et al. 2009). Abaixo, os resultados das curvas de calibração analisadas para as cinco espécies de *Candida*. (**Figuras 3, 4, 5, 6 e 7**).

Candida albicans



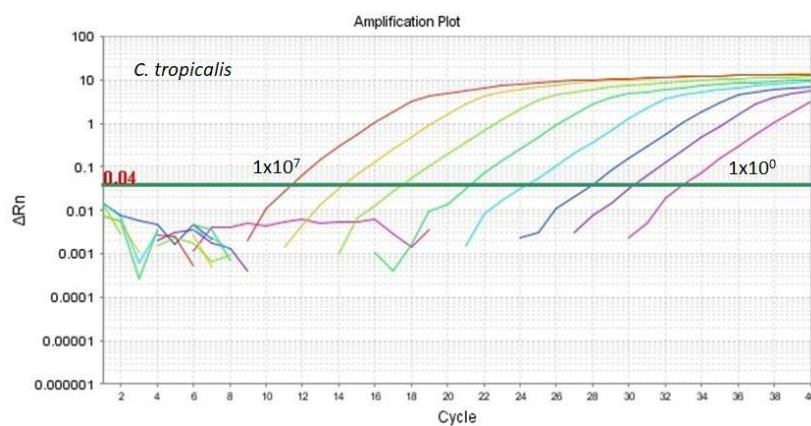
Cópias/ μ L	Média \pm DP	95% IC Média		CV
		Limite inferior	Limite superior	
1,00E+07	11,75 \pm 0,58	11,48	12,02	4,90
1,00E+06	15,20 \pm 0,34	15,04	15,35	2,23
1,00E+05	18,61 \pm 0,54	18,36	18,87	2,92
1,00E+04	21,98 \pm 0,52	21,74	22,22	2,37
1,00E+03	25,39 \pm 0,61	25,11	25,68	2,39
1,00E+02	28,97 \pm 0,63	28,67	29,26	2,18
1,00E+01	32,38 \pm 1,01	31,91	32,85	3,11
1,00E+00	35,68 \pm 1,18	35,00	36,36	3,30



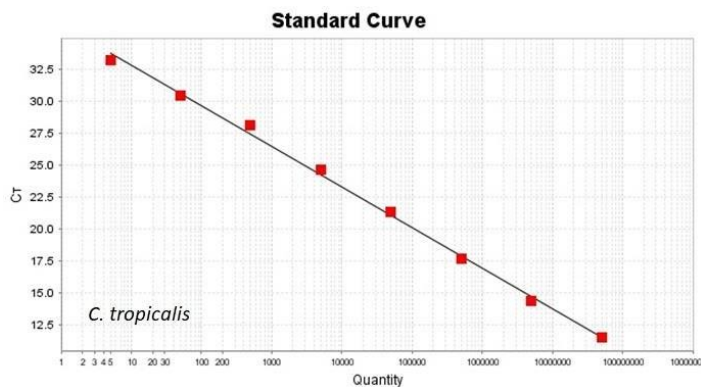
Parâmetros	Média ± DP	95% IC Média		CV%
		Limite inferior	Limite superior	
<i>Efficiency</i>	99,237 ± 3,530	97,584	100,889	3,557
<i>r</i> ²	0,998 ± 0,002	0,997	0,999	----
<i>Slope</i>	-3,343 ± 0,087	-3,384	-3,303	----

Figura 3. *Candida albicans* – Para esta espécie as amplificações resultaram em limiar de detecção de 1×10^0 cópias/ensaio de amostra em **100%** dos 20 testes realizados.

Candida tropicalis



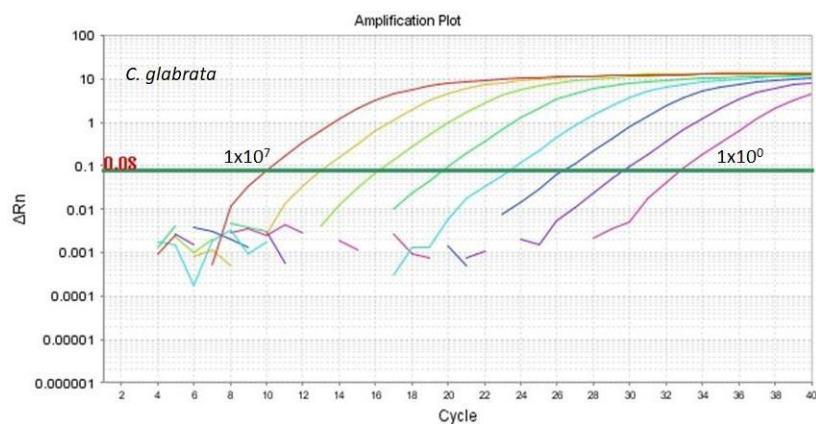
Cópias/ μ L	Média ± DP	95% IC Média		CV%
		Limite inferior	Limite superior	
1,00E+07	11,86 ± 0,53	11,61	12,10	4,48
1,00E+06	15,16 ± 0,42	14,96	15,36	2,80
1,00E+05	18,83 ± 0,59	18,55	19,10	3,11
1,00E+04	22,14 ± 0,53	21,89	22,39	2,40
1,00E+03	25,79 ± 0,57	25,52	26,05	2,20
1,00E+02	29,04 ± 0,60	28,76	29,32	2,07
1,00E+01	32,61 ± 0,97	32,16	33,07	2,97
1,00E+00	34,79 ± 1,63	33,75	35,82	4,68



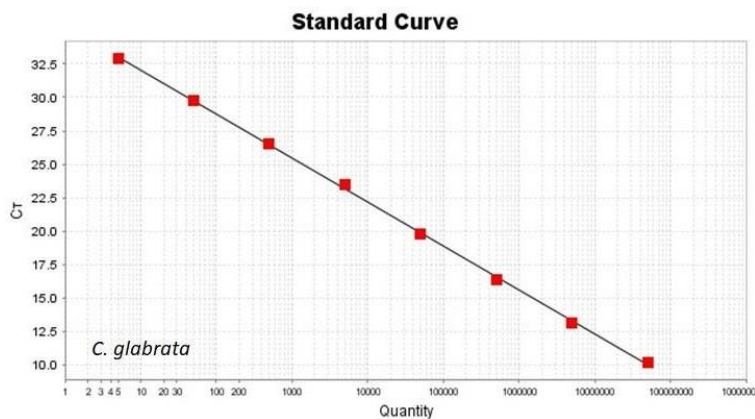
Parâmetros	Média ± DP	95% IC Média		CV
		Limite inferior	Limite superior	
<i>Efficiency</i>	95,613 ± 3,963	93,758	97,468	4,145
<i>r</i> ²	0,995 ± 0,003	0,994	0,997	----
<i>Slope</i>	-3,436 ± 0,103	-3,484	-3,387	----

Figura 4. *Candida tropicalis* – Para esta espécie as amplificações resultaram em limiar de detecção de 1×10^0 cópias/ensaio de amostra em **55%** dos 20 testes realizados.

Candida glabrata



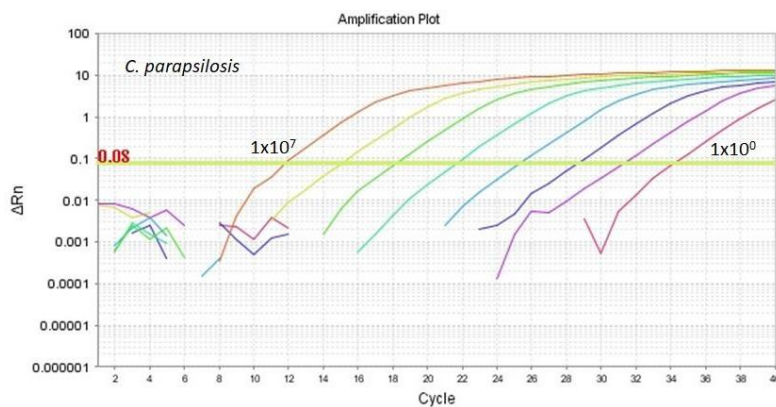
Cópias/ μ L	Média ± DP	95% IC Média		CV%
		Limite inferior	Limite superior	
1,00E+07	10,21 ± 0,27	10,08	10,34	2,64
1,00E+06	13,43 ± 0,39	13,25	13,62	2,94
1,00E+05	16,83 ± 0,43	16,63	17,03	2,57
1,00E+04	20,18 ± 0,50	19,95	20,41	2,48
1,00E+03	23,70 ± 0,35	23,53	23,86	1,47
1,00E+02	26,98 ± 0,57	26,71	27,24	2,10
1,00E+01	30,27 ± 0,48	30,05	30,50	1,58
1,00E+00	33,17 ± 1,09	32,56	33,77	3,29



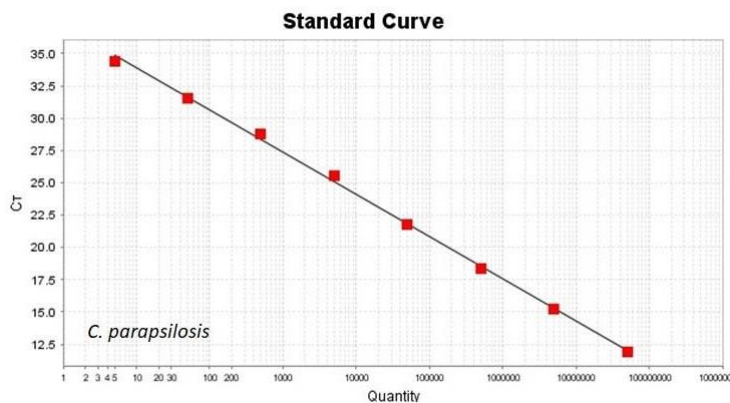
Parâmetros	Média ± DP	95% IC Média		CV%
		Limite inferior	Limite superior	
<i>Efficiency</i>	99,237 ± 3,530	97,584	100,889	3,557
<i>r</i> ²	0,998 ± 0,002	0,997	0,999	----
<i>slope</i>	-3,343 ± 0,087	-3,384	-3,303	----

Figura 5. *Candida glabrata* – Para esta espécie as amplificações resultaram em limiar de detecção de 1×10^0 cópias/ μ l de amostra em 75% dos 20 testes realizados.

Candida parapsilosis



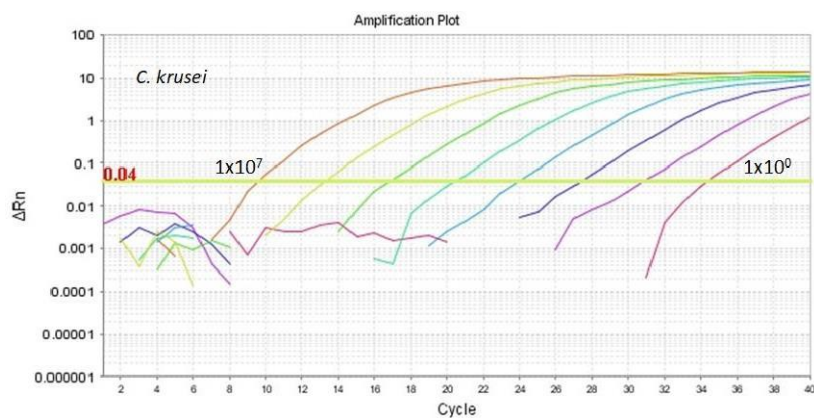
Cópias/ μ L	Média ± DP	95% IC Média		CV
		Limite inferior	Limite superior	
1,00E+07	11,75 ± 0,58	11,48	12,02	4,90
1,00E+06	15,20 ± 0,34	15,04	15,35	2,23
1,00E+05	18,61 ± 0,54	18,36	18,87	2,92
1,00E+04	21,98 ± 0,52	21,74	22,22	2,37
1,00E+03	25,39 ± 0,61	25,11	25,68	2,39
1,00E+02	28,97 ± 0,63	28,67	29,26	2,18
1,00E+01	32,38 ± 1,01	31,91	32,85	3,11
1,00E+00	35,68 ± 1,18	35,00	36,36	3,30



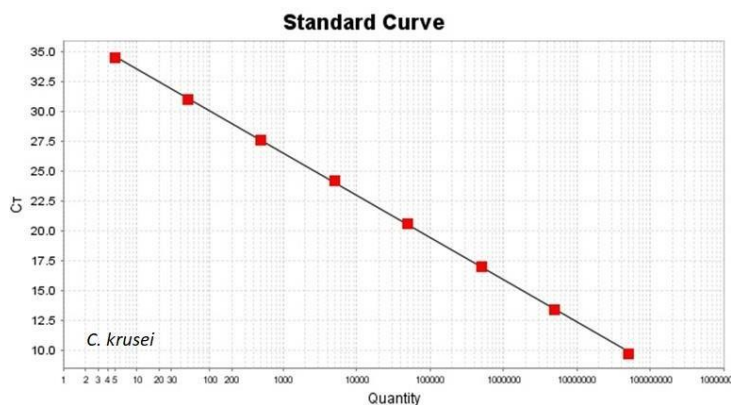
Parâmetros	Média ± DP	95% IC Média		CV%
		Limite inferior	Limite superior	
Efficiency	96,277 ± 4,041	94,386	98,168	4,197
r ²	0,997 ± 0,003	0,996	0,999	----
slope	-3,419 ± 0,103	-3,467	-3,370	----

Figura 6. *Candida parapsilosis* – Para esta espécie as amplificações resultaram em limiar de detecção de 1×10^0 cópias/ μ l de amostra em 70% dos 20 testes realizados.

Candida krusei



Cópias/ μ L	Média ± DP	95% IC Média		CV%
		Limite inferior	Limite superior	
1,00E+07	10,79 ± 0,77	10,43	11,15	7,16
1,00E+06	13,99 ± 0,83	13,60	14,38	5,91
1,00E+05	17,84 ± 0,86	17,44	18,24	4,83
1,00E+04	21,23 ± 0,73	20,89	21,57	3,43
1,00E+03	24,82 ± 0,82	24,44	25,21	3,32
1,00E+02	28,48 ± 0,89	28,06	28,89	3,14
1,00E+01	32,28 ± 0,82	31,90	32,67	2,55
1,00E+00	35,26 ± 1,06	34,67	35,85	3,00

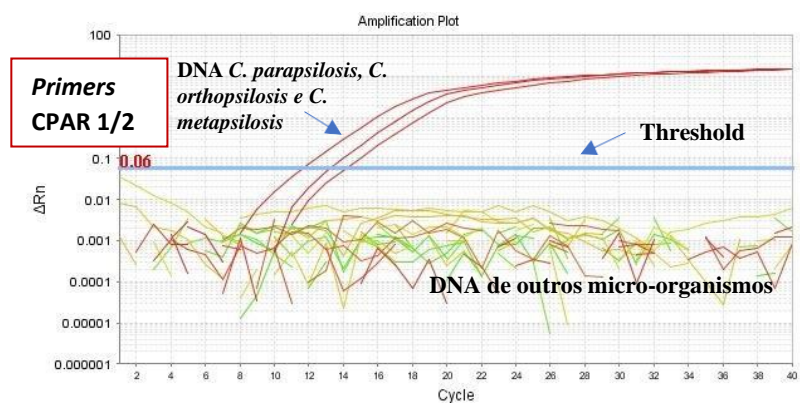
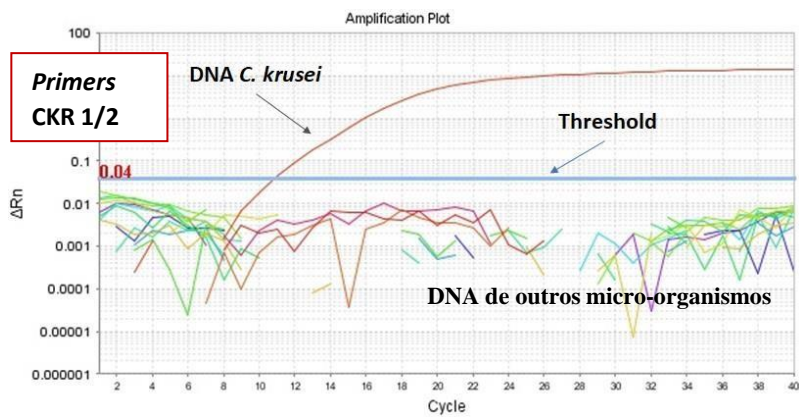
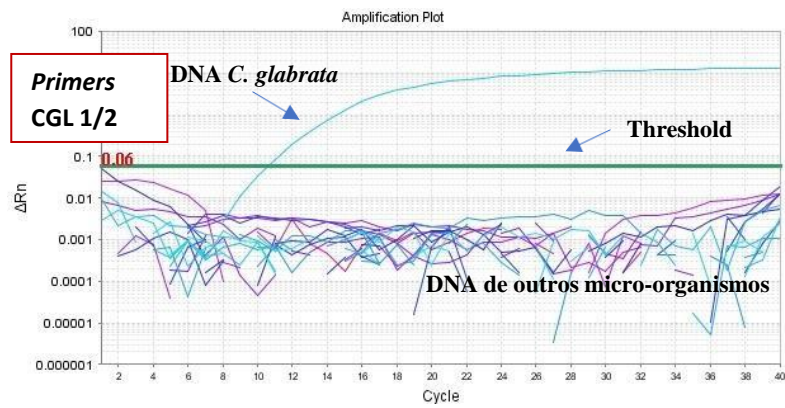
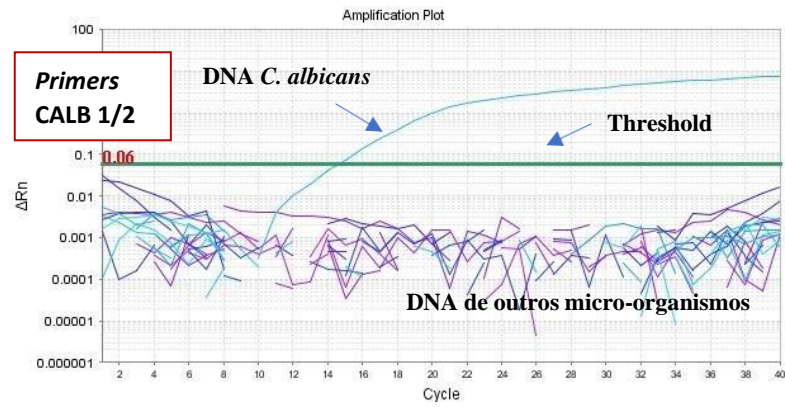


Parâmetros	Média ± DP	95% IC Média		CV%
		Limite inferior	Limite superior	
<i>Efficiency</i>	90,645 ± 3,370	89,068	92,222	3,718
<i>r</i> ²	0,998 ± 0,001	0,997	0,999	----
<i>slope</i>	-3,572 ± 0,101	-3,619	-3,525	----

Figura 7. *Candida krusei* – Para esta espécie as amplificações resultaram em limiar de detecção de 1×10^0 cópias/ μ l de amostra em 75% dos 20 testes realizados.

5.5.4. Avaliação da especificidade analítica dos *primers* das cinco espécies de *Candida* pela qPCR

Os resultados revelaram que os *primers* das cinco espécies de *Candida* não amplificaram amostras de DNA de outras espécies de *Candida*, dos outros fungos patogênicos e das bactérias, demonstrando 100% de especificidade. Também não foi observada reatividade cruzada entre as cinco espécies de *Candida*, bem como não ocorreu amplificação de material genômico quando amostras de DNA de indivíduos sadios foram avaliadas. Na **Figura 8** estão demonstrados, as amplificações para avaliação da especificidade analítica.



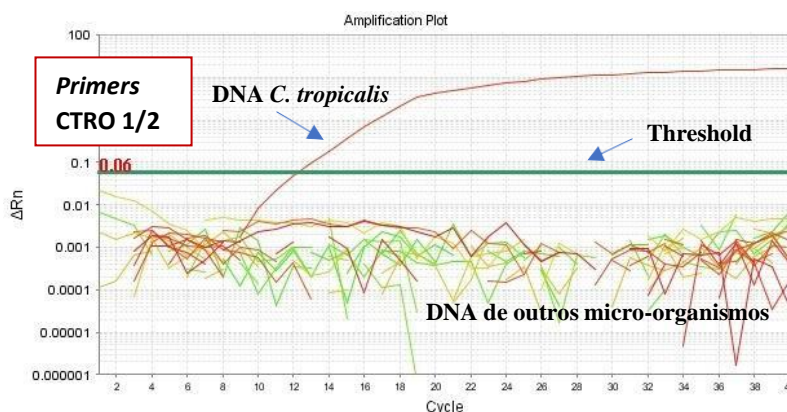


Figura 8. Curvas de amplificação da qPCR para avaliação da especificidade do ensaio com os *primers* específicos selecionados para o estudo. A detecção de sinal das amostras de DNA homólogas aos *primers* foi positiva, enquanto para as amostras heterólogas (DNA de outras espécies de *Candida*, de outros fungos e de bactérias) não houve amplificação acima da linha de *threshold*

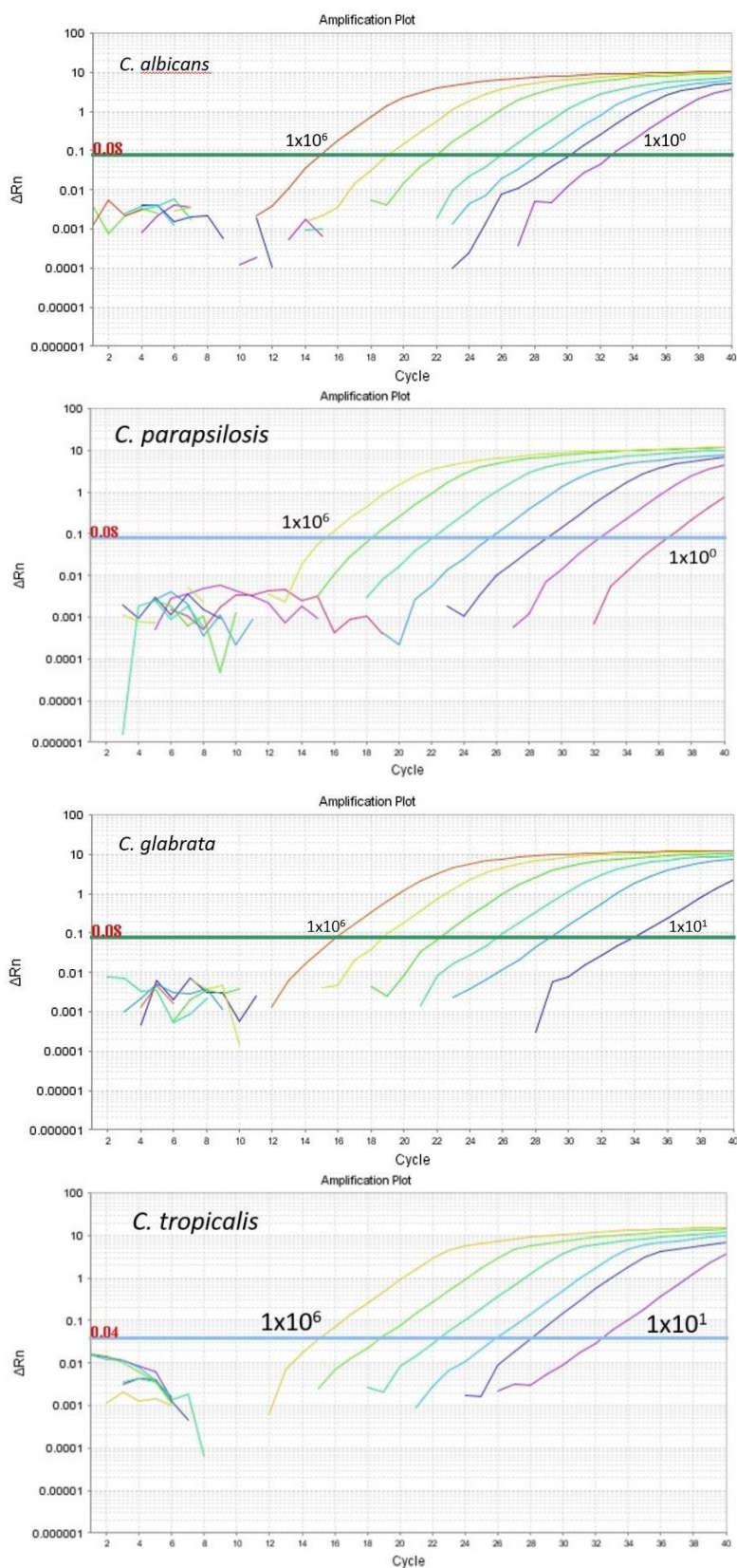
5.5.5. Protocolo de extração de DNA a partir de amostras de sangue “batizadas” com suspensão das 5 espécies de *Candida*

A sensibilidade do diagnóstico molecular, está parcialmente relacionada com a eficiência de extração de DNA (Wickes and Wiederhold 2018). Iniciamos os testes com amostras de sangue de indivíduos saudáveis, semeadas com suspensão das leveduras de *Candida*, nas concentrações de 1×10^6 a 1×10^0 UFC/ml, mimetizando amostras clínicas. Como controle exógeno interno, foi adicionado em cada tubo, 1×10^4 plasmídeos com a sequência parcial do gene da giberelina obtida da planta *Arabidopsis thaliana*. Após diversos ensaios, ficou definido o protocolo de três ciclos de sonicação na velocidade de 6m/s por 45 segundos, com intervalos de 150 segundos entre os ciclos. Em seguida, as extrações de DNA foram realizadas de acordo com as instruções do *Rapid Pure DNA Tissue Kit* (MP Biomedical). A determinação da concentração de DNA das amostras, foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo). As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

5.5.6. Ensaios de qPCR com amostras de sangue semeadas com as cinco espécies de *Candida*

Amostras de sangue de indivíduos saudáveis semeadas “batizadas” com suspensão das leveduras das cinco espécies de *Candida* foram submetidas às amplificações por qPCR. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 9**, mostrando que para *C. albicans* e *C. parapsilosis* o sinal foi detectado até 1×10^0 UFC/ml sangue, e para *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* até 1×10^1 UFC/ml de sangue. Amplificações foram consideradas positivas havendo detecção de sinal fluorescente que cruzava a linha de

threshold (C_t), até 36 ciclos de amplificação. Os resultados foram analisados pelo *Step-One Software version 2.3* (Applied Biosystems).



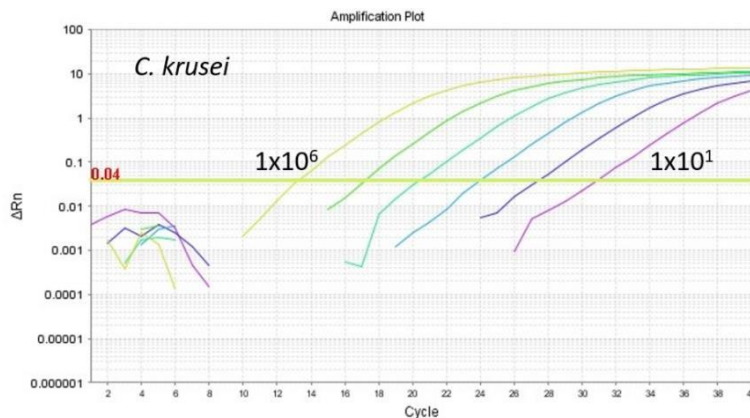


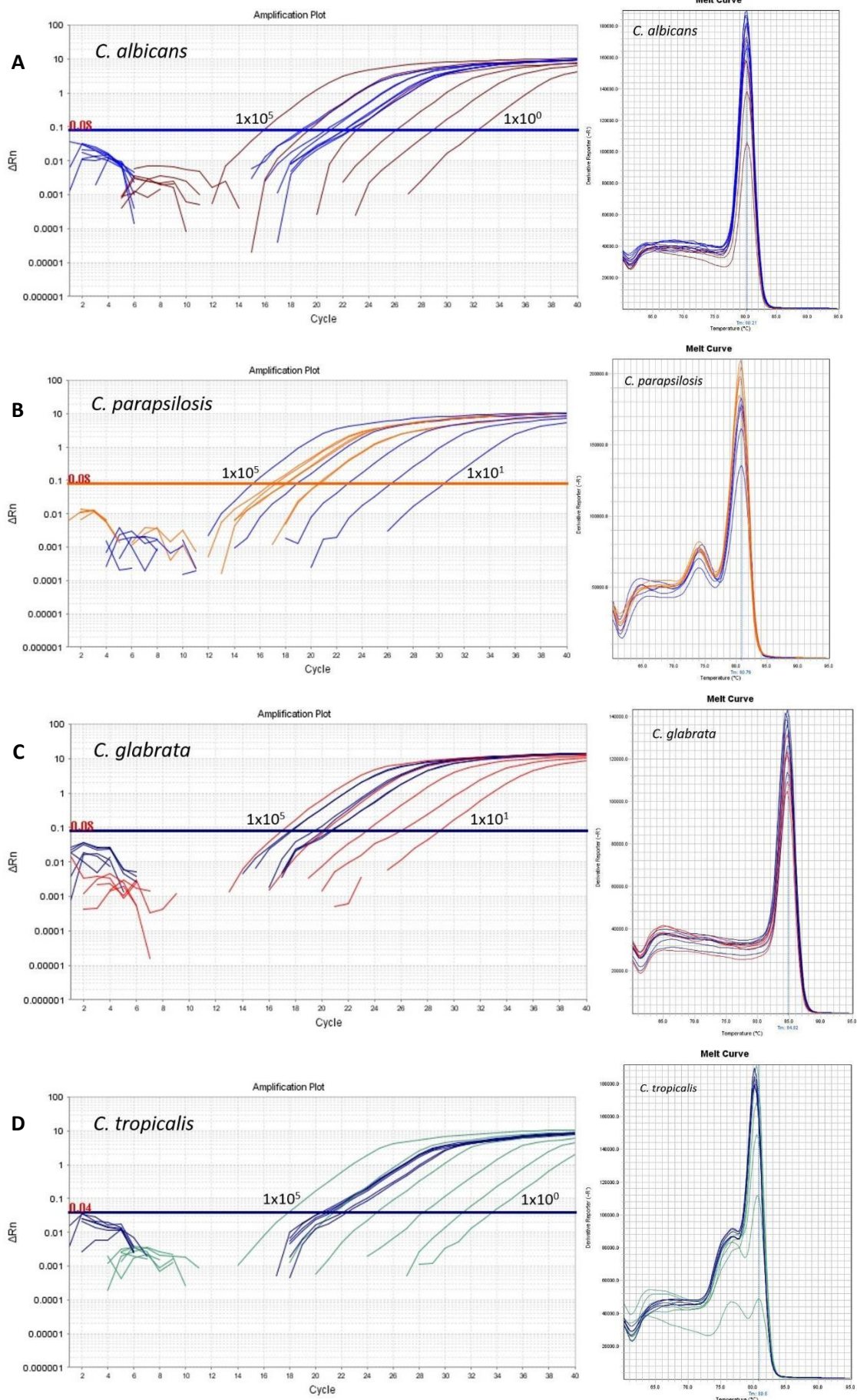
Figura 9. Curvas de amplificação da qPCR para avaliação do limiar de detecção do método para as amostras de sangue semeadas (“batizadas”) com suspensão de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Estes ensaios foram realizados para avaliarmos a metodologia de extração de DNA a ser empregada posteriormente às amostras sanguíneas dos pacientes do estudo. Além da avaliação do método de extração, esses experimentos também foram úteis para verificarmos se a qPCR proposta teria capacidade analítica para detectar poucas CFU de *Candida* no sangue, uma vez que a literatura tem demonstrado que a carga fúngica nos casos de candidemia em geral é baixa (Kourkoumpetis et al. 2012; Neely et al. 2013).

Os resultados de sensibilidade analítica de nosso estudo são comparáveis aos dados de outros autores que empregaram a técnica de qPCR na detecção de espécies de *Candida* em amostras clínicas (sangue, soro e/ou plasma). Outros estudos mostraram ensaios do tipo multiplex com limiares de detecção de 20 e 10 CFU/ml sangue (Innings et al. 2007; Lau et al. 2008). Já o estudo de Guo e colaboradores, demonstrou limiares de detecção para as cinco espécies de *Candida* entre 10 e 100 CFU/ml de sangue (Guo, Yang, and Liang 2016). Por outro lado, em estudo de Than e colaboradores, a mesma técnica de qPCR (*Sybr Green*) empregando como alvo das amplificações um gene de cópia única de *Candida*, atingiu limiar de detecção de 1000 cópias por ensaio, cerca de 100 vezes menos sensível que a qPCR do presente estudo, com a utilização de gene de múltiplas cópias (RNA ribossomal) (Than et al. 2015).

5.5.7. Ensaios de qPCR com as amostras de DNA extraídas do sangue dos pacientes

A **Figura 10** mostra as curvas de amplificação de amostras extraídas dos pacientes, juntamente com as curvas de calibração e as curvas de dissociação (*melt curves*) para as cinco espécies de *Candida*.



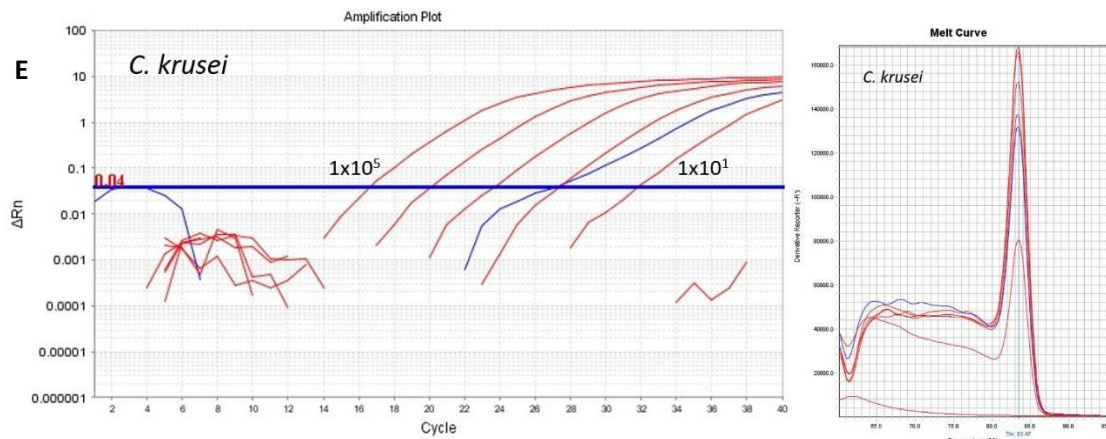


Figura 10. Curvas de amplificação dos ensaios de qPCR das amostras de DNA extraídas de pacientes e respectivas curvas de dissociação, demonstrando que as amplificações foram específicas.

A - Curvas dos plasmídeos recombinantes de *C. albicans* de 1×10^5 até 1×10^0 U/ensaio (em marrom) e as amplificações das amostras de DNA de pacientes (em azul).

B - Curvas dos plasmídeos recombinantes de *C. parapsilosis* de 1×10^5 até 1×10^0 U/ensaio (em azul) e as amplificações das amostras de DNA de pacientes (em laranja).

C - Curvas dos plasmídeos recombinantes de *C. glabrata* de 1×10^5 até 1×10^0 U/ensaio (em marrom) e as amplificações das amostras de DNA de pacientes (em azul).

D - Curvas dos plasmídeos recombinantes de *C. tropicalis* de 1×10^5 até 1×10^0 U/ensaio (em verde) e as amplificações das amostras de DNA de pacientes (em azul).

E - Curvas dos plasmídeos recombinantes de *C. krusei* de 1×10^5 até 1×10^0 U/ensaio (em marrom) e as amplificações da amostra de DNA de paciente (em azul).

Pelos ensaios de qPCR foi possível observar a detecção de mais de uma espécie de *Candida* nas amostras clínicas. A **Figura 11** mostra as curvas de amplificação de amostras extraídas de um paciente para o qual foram detectadas duas espécies de *Candida* simultaneamente.

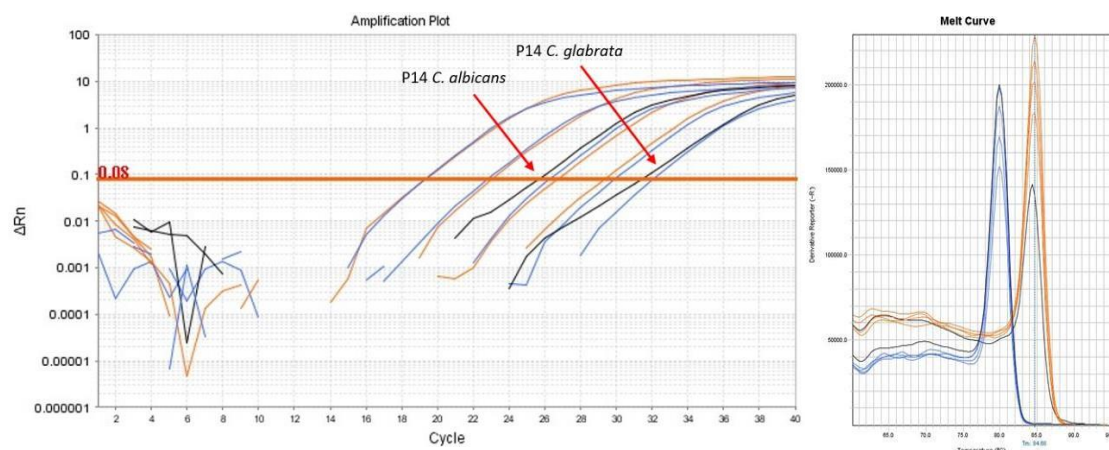


Figura 11. Curvas de amplificação dos ensaios de qPCR de uma amostra de DNA extraída de paciente (P14) e respectivas curvas de dissociação, demonstrando a identificação de duas espécies de *Candida* simultaneamente (*C. albicans* e *C. glabrata*).

5.5.8. Resultados do desempenho do ensaio de qPCR nas amostras dos 78 pacientes do estudo

O presente estudo avaliou o desempenho analítico e a acurácia diagnóstica de um método baseado em PCR em tempo real, com o objetivo de diagnosticar precocemente episódios de candidemia. Para tanto, foram empregados como genes alvos das ampliações, sequências parciais da região ITS2 do RNA ribossomal das cinco espécies de *Candida* mais frequentemente isoladas de episódios de candidemia em pacientes com risco de desenvolver a infecção.

Os ensaios de qPCR apresentaram resultados positivos em 100% dos 20 episódios e candidemia comprovada, com valores de Cq entre 17,8 e 35,8 (**Tabela 4**). Este valor de sensibilidade foi semelhante ao de outros relatos da literatura, como o de Innings *et al.* (2007), que utilizando ensaio de qPCR do tipo multiplex *in-house*, cuja sensibilidade analítica foi de 10 CFU/ml, obtiveram positividade muito próxima à das hemoculturas em pacientes com candidemia comprovada. McMullan *et al.* (2008), também empregando um ensaio de qPCR do tipo multiplex, observou positividade em 9 de 11 pacientes (82%) com candidemia comprovada, apesar da elevada sensibilidade analítica demonstrada.

As identificações das espécies de *Candida* foi concordante em todos os casos pelos três métodos (hemoculturas, MALDI-TOF e qPCR), exceto para quatro episódios de candidemia, em que o ensaio molecular detectou co-infecção por mais de uma espécie da levedura (**Tabela 4**).

Com a melhoria dos métodos diagnósticos laboratoriais, tem sido relatada maior frequência de casos de poli-infecção por *Candida*, particularmente em pacientes em condições clínicas muito críticas (Yang *et al.* 2018). Este fato pode ter implicações clínicas relevantes nos casos em que uma das espécies seja resistente aos fármacos usualmente empregados na terapia antifúngica, como nos casos dos pacientes do estudo que receberam fluconazol para o tratamento da infecção, e somente a qPCR detectou presença de *C. glabrata*, que apresenta resistência dose-dependente, e *C. krusei*, espécie intrinsecamente resistente aos azólicos (Colombo *et al.* 2013; Taira *et al.* 2014).

Um dos aspectos cruciais para a eficiência dos ensaios de qPCR é a extração de DNA a partir da amostra clínica. Neste estudo, empregamos o protocolo recomendado pelo *European Aspergillus PCR Initiative Committee* (EAPCRI) com algumas modificações, uma vez que para detecção molecular de *Candida* não há, até o momento, método padronizado de extração. Mesmo sendo recomendado, talvez o protocolo ainda

não seja totalmente adequado para a lise celular das leveduras, influenciando na sensibilidade dos ensaios de PCR (Arvanitis et al. 2014; Fuchs, Lass-Flörl, and Posch 2019).

Em relação ao grupo de pacientes prováveis, observamos que o ensaio molecular detectou e identificou espécies de *Candida* em seis amostras de pacientes com hemoculturas negativas (13,6%). Em dois pacientes, a qPCR detectou *C. albicans*, em um *C. parapsilosis*, em um paciente *C. glabrata*, em um paciente, *C. krusei* e por fim, um com *C. tropicalis* (**Tabela 5**). As espécies identificadas pela qPCR foram as mesmas isoladas em hemoculturas de sangue de cateter, dias antes das coletas para o estudo, exceto o paciente P66 no qual a qPCR detectou *C. krusei* enquanto a hemocultura de sangue de cateter detectou *C. parapsilosis*. Entretanto, outros 26 pacientes deste grupo apresentaram resultados positivos em sangue de cateter, mas nas amostras extraídas do sangue periférico não foram detectados sinais nos ensaios de qPCR. Uma das explicações para os resultados negativos seria que a presença de *Candida* no cateter indicaria apenas infecção localizada (colonização), sem a existência de candidemia, ou ainda invasão da corrente sanguínea com baixa carga fúngica, não sendo detectada tanto pela cultura como pelo ensaio molecular (DesJardin et al. 1999).

Tal explicação deve ser considerada particularmente nos casos de positividade de sangue de cateter por *C. parapsilosis*. Deste grupo de pacientes prováveis, 14 tiveram isolamento de *C. parapsilosis* e estavam internados na UTI do ICESP, onde ocorreu, um surto de infecções por esta espécie (Thomaz et al., 2021). Diversos estudos têm demonstrado a capacidade desta espécie de formar biofilmes e aderir aos dispositivos médicos, como o cateter. *Candida parapsilosis* é, em geral, alta formadora de biofilme e demonstra elevada capacidade de aderir à superfície, se comparada às demais espécies. Entretanto, a formação de biofilme pelas espécies de *Candida* e sua associação com a ocorrência de candidemia relacionada ao cateter, tem sido pouco estudada. De todo modo, é possível inferir que as leveduras do biofilme por estarem bem aderidas, destacam-se pouco da matriz e mais dificilmente invadem a corrente sanguínea (Shin et al. 2002; Silva-Dias et al. 2015).

Apesar de ser um grupo com poucos representantes (14), para os pacientes possíveis de desenvolver candidemia, os ensaios de qPCR foram todos negativos. Este resultado demonstra boa especificidade do método e possível elevado valor preditivo negativo, concordando com resultados observados por outros autores (Lau et al. 2008; Nguyen et al. 2012). Isto sugere que o ensaio molecular seja útil em excluir, mais do que

estabelecer, um diagnóstico de infecção de corrente sanguínea (Arvanitis et al. 2014; Kidd et al. 2019).

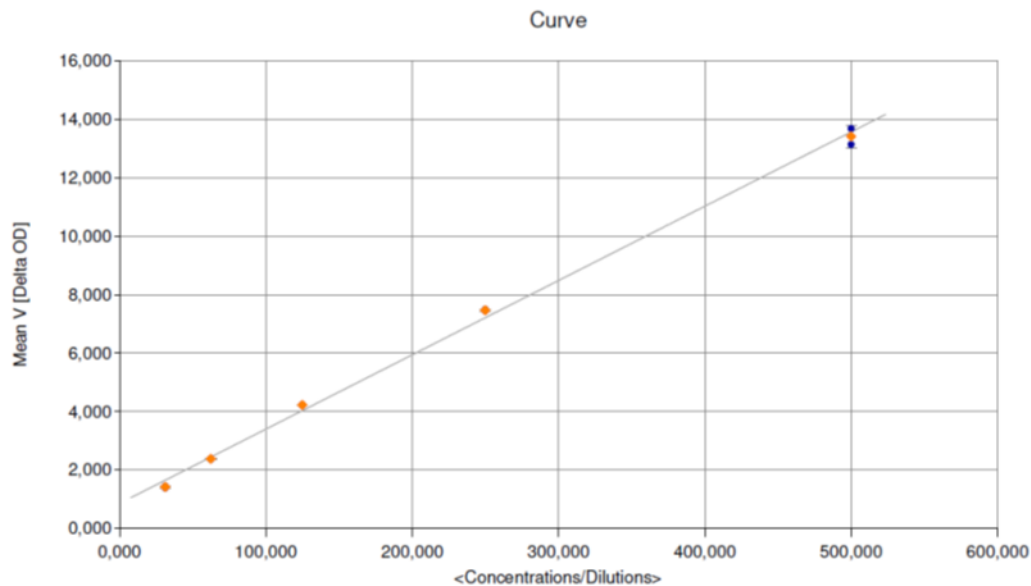
5.6. Dosagem de BDG

O cálculo das concentrações de BDG foi realizado com auxílio do programa *Gen 5*, versão 2.06, conforme exemplo descrito na **Figura 12**.

FUNGITELL VMEAN ASSAY

Curve

A



Curve Fitting Results

Curve Name	Curve Formula	A	B	R
Curve	Y=A*X+B	0,0254	0,846	0,999

B

Conc

Well ID	Name	Well	Conc/Dil	Mean V [Delta OD]	Conc	Count	Mean	Std Dev	CV (%)
NEG	Negative Control	G2		0,382	<7,812	2	<7,812	!0,000!	!0,000!
		G3		0,352	<7,812				
STD1	Standard Curve	B2	500	13,141	483,101	2	493,892	15,261	3,090
		B3	500	13,690	504,684				
STD2	Standard Curve	C2	250	7,444	259,231	2	260,178	1,339	0,515
		C3	250	7,492	261,125				
STD3	Standard Curve	D2	125	4,229	132,910	2	132,643	0,378	0,285
		D3	125	4,215	132,376				
STD4	Standard Curve	E2	62,5	2,387	60,540	2	59,939	0,851	1,420
		E3	62,5	2,356	59,337				
STD5	Standard Curve	F2	31,25	1,379	20,947	2	22,098	1,628	7,366
		F3	31,25	1,438	23,249				

User Name:

System Administrator

Page Number:

3 of 5

Experiment File Name:

Experiment 4 Candida 23-05-2019.xpt

FUNGITELL VMEAN ASSAY

Validation (R [Delta OD])

Formula	Value
Curve(Curve;R)>0,980	Valid

Validation (Mean V [Delta OD])

Formula	Value
NEG<(STD5*0,5)	Valid

Cutoffs (Conc)

Well ID	Name	Well	Conc/Dil	Conc	Symbols (Conc)	Conc - Count	Mear
C SPL1	P41	B5		66,441	Indeterm	4	>2 ^r
		C5		>523,438	OUT+		
		C6		254,603	POS		
		C7		67,977	Indeterm		
SPL2	P3	D5		>523,438	OUT+	2	
		E5		>523,438	OUT+		
SPL3	P4	F5		81,193	POS	2	
		G5		20,400	NEG		
SPL4	P6	B6		231,334	POS		
SPL5	P12	D6		85,030	POS		
		E6		91,159	POS		
SPL6	P22	F6		105,169	POS		
		G6		108,292	POS		
SPL7	P24	B7		63,946	Indete		
SPL8	P26	D7		<7,812	OU ^r		
		E7		9,878	N ^r		
SPL9	P29	F7		>523,438			
		G7		>523,43 ^r			
SPL10	P33	B8		8,412			
		C8		10,0			
SPL11	P38	D8		4 ^r			
		E8					
SPL12	P42	F8					
		G8					
SPL13	P43	B9					
		C9					
SPL14	P44	D9					
		E9					
SPL15	P45	F ^r					
SPL16	P46						
SPL17	P						
User							
Paç							
E							

Figura 12. Resultados das dosagens de BDG nas amostras de soro. **A** = Curva padrão, com valor de R= 0,999; **B** = Valores das dosagens dos padrões (31,25 a 500 pg/mL); **C** = Valores das amostras de soro (em duplicata).

A **Figura 13** mostra a comparação entre os resultados das dosagens séricas de BDG nos três grupos de pacientes. As medianas dos valores de BDG foram 478,1 pg/ml nos pacientes com candidemia comprovada; 127,1 pg/ml no grupo provável e 37,6 pg/ml no grupo possível. Houve diferença estatística significativa nas concentrações séricas de BDG quando os pacientes com candidemia comprovada foram comparados aos outros dois grupos ($p=0,003$). Entre o grupo de prováveis e de possíveis não houve diferença com significância estatística.

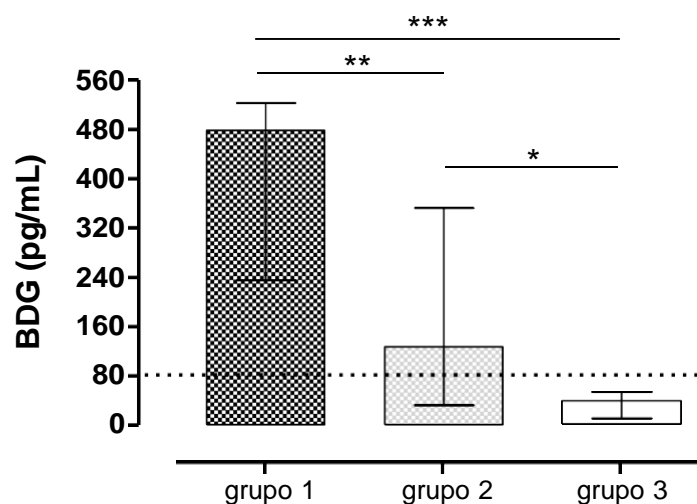


Figura 13. Distribuição das concentrações séricas de BDG nos grupos de pacientes com candidemia comprovada, prováveis e possíveis. * Diferença estatística significativa entre os grupos ($p<0,05$) (*Dunn's multiple comparison test*)

Os níveis séricos de BDG foram indetectáveis em 1 (5%) caso de candidemia comprovada, no qual foi detectado *C. parapsilosis* pela qPCR. De todo modo, a sensibilidade do ensaio de BDG (95%) neste grupo de pacientes, empregando o valor de corte (*cutoff*) sugerido pelo fabricante do *Fungitell Assay* (positividade ≥ 80 pg/ml), foi relativamente superior a outros resultados publicados anteriormente, que de acordo com artigo de revisão de Pfaller e col., a sensibilidade ficou em torno de 75% (Pfaller and Castanheira 2016). Outros autores também obtiveram resultados falso-negativos em pacientes com hemoculturas positivas para diferentes espécies de *Candida* (Nguyen et al. 2012; Abe et al. 2014; Liu et al. 2015). Nos casos de candidemia por *C. parapsilosis*, tem sido relatado que esta espécie possui quantidades menores de 1,3- β -D-glucana na parede celular, como sugerido por sua menor suscetibilidade às equinocandinas (antifúngicos

direcionados à síntese deste polissacáride), podendo levar a resultados falso negativos na dosagem de BDG (Liu et al. 2015; Mikulska et al. 2016).

A BDG foi detectável em amostras de soro de 26 pacientes do grupo de prováveis (59%), com níveis séricos variando de 85 a ≥ 500 pg/ml (**Tabela 5**). Neste grupo, para os seis casos em que a qPCR foi positiva, a mediana de BDG foi de 457,0 pg/ml, muito semelhante à mediana do grupo com candidemia comprovada (478,1pg/ml). Os resultados da BDG reforçam a possibilidade desses seis casos em que a qPCR apresentou resultados positivos, serem de infecção hematogênica, não detectada pelas culturas.

Em 19 pacientes do grupo somente a BDG foi positiva, sendo 16 com resultados positivos em cateter e/ou sangue de cateter; seis pacientes com culturas positivas em sonda vesical de demora, e dois pacientes que apresentaram culturas de sangue periférico positivas quatro dias antes da coleta para o estudo (com hemoculturas negativas na data da coleta simultânea), entre outros fatores que provavelmente influenciaram os níveis de BDG no soro. Fatores como colonização prévia por espécies de *Candida* em outros sítios do organismo, podem elevar o nível sérico de BDG, mas são considerados resultados falso-positivos (Posteraro et al. 2011). Estes também são atribuídos a diversos fatores, tais como pacientes submetidos à hemodiálise, presença de infecção bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa*), pacientes em uso de β -lactâmicos, pacientes que recebem albumina ou imunoglobulinas, uso de gaze cirúrgica, entre outros (Mennink-Kersten, Ruegebrink, and Verweij 2008; Shabaan et al. 2018). Em um estudo multicêntrico, Nucci e col., observaram positividade da BDG em 57 pacientes com hemoculturas negativas. Dentre eles, 11 pacientes apresentavam bacteremia, 49 estavam em uso de β -lactâmicos, sete recebendo infusão de albumina e 13 haviam passado por cirurgias (Nucci et al. 2016). No presente estudo, 97,2% dos pacientes recebiam antibioticoterapia no momento da suspeição de infecção por *Candida*, mas não conseguimos a informação precisa sobre quais antibióticos estavam sendo administrados. No grupo de 14 pacientes possíveis, os níveis de BDG foram positivos em um caso (7,1%).

O ensaio de BDG apresenta valor preditivo positivo mais consistente quando dois ou mais resultados consecutivos são considerados (Nguyen et al. 2012; Colombo et al. 2013). Entretanto, para este estudo não foi possível aplicar o teste em mais de uma amostra de soro dos pacientes, devido à limitação financeira.

Por outro lado, o ensaio tem demonstrado, em geral, que seu elevado valor preditivo negativo é útil para indicar a suspensão do tratamento antifúngico em casos de terapia pré-emptiva (León et al. 2009; Liu et al. 2015).

O aumento na incidência de infecções invasivas por *Candida*, e a emergência de espécies não-*C. albicans*, com suscetibilidade reduzida ou resistência intrínseca aos azóis, revelam a necessidade de desenvolver novas ferramentas de diagnóstico que possam ajudar a identificar, com maior rapidez, pacientes com infecção invasiva por *Candida*, permitindo a introdução precoce de terapêutica adequada (Delaloye and Calandra 2014).

O presente estudo avaliou o desempenho analítico e a acurácia diagnóstica do ensaio de PCR em tempo real, bem como de um marcador sorológico (BDG) em pacientes com suspeita de infecção de corrente sanguínea por *Candida*, diante dos resultados das hemoculturas, ainda consideradas padrão-ouro para o diagnóstico de infecções de corrente sanguínea. Avaliou ainda a acurácia da técnica de MALDI-TOF para a identificação das espécies de *Candida*. Em relação a esta última, foi demonstrado que a identificação das leveduras diretamente dos balões de hemocultura foi praticamente 100% concordante com os resultados das identificações obtidas pelas culturas, e obtida em 2-3 horas após a sinalização de positividade dos balões. Deste modo, podemos concluir que a técnica é rápida e fornece resultados com acurácia, além de apresentar custo inferior às demais técnicas de identificação fenotípica automatizadas. Laboratórios de rotina diagnóstica com capacidade para adquirir o equipamento de espectrometria de massa podem substituir a metodologia clássica de identificação do patógeno, beneficiando os pacientes que poderão receber terapêutica mais precocemente.

Os resultados mostraram bom desempenho dos ensaios de qPCR e BDG na detecção do patógeno nos casos de candidemia comprovada. Entretanto para os pacientes do grupo de prováveis, os resultados de ambos os testes denotam dificuldades na interpretação.

O ensaio de BDG mostrou resultados positivos em vários pacientes deste grupo (prováveis), podendo ser interpretados como inespecíficos, devido a diversos fatores que podem interferir na detecção. Por outro lado, esses resultados podem indicar pacientes com a infecção de corrente sanguínea por *Candida*, apesar das hemoculturas negativas, que apresentam sensibilidade limitada (Pappas et al. 2016). De todo modo, a baixa especificidade do ensaio de BDG, que vem sendo relatada na literatura, dificulta a adoção do teste em laboratórios de rotina diagnóstica, além do elevado custo, questão relevante para hospitais da rede pública de saúde.

Também contribui para uma melhor interpretação dos resultados obtidos pelos dois ensaios (qPCR e BDG), a dificuldade em definir esses pacientes como prováveis de desenvolver a infecção. É tarefa difícil classificar os participantes do estudo nesta

categoria, quando a definição é comumente baseada na decisão clínica de introduzir terapêutica antifúngica, muitas vezes indicada de modo empírico, devido às condições clínicas críticas dos pacientes (McMullan et al. 2008).

A detecção de *Candida* diretamente em amostras clínicas por técnicas moleculares tem sido um desafio, como demonstram os vários relatos da literatura. Nossos resultados mostraram que o desempenho da técnica de qPCR proposta foi superior ao de outros estudos, apresentando sensibilidade de 100% em pacientes com candidemia comprovada; entretanto, poucas amostras de pacientes com risco de desenvolver infecção de corrente sanguínea (prováveis) mostraram resultados positivos. A baixa carga fúngica circulante na corrente sanguínea e dificuldades no processo de extração do DNA podem comprometer os níveis de sensibilidade dos ensaios de PCR (Neely *et al.*, 2013). Para melhorar o desempenho da técnica, acreditamos que a etapa de extração seja o maior desafio. A proposta de um estudo colaborativo, como o que foi conduzido pelo *Working Group European Aspergillus PCR Initiative* para a padronização do diagnóstico molecular da aspergilose, poderia contribuir para a resolução dessas dificuldades técnicas, permitindo sua padronização.

São diversos os estudos relatados na literatura empregando diferentes plataformas de PCR para o diagnóstico precoce de candidemia. Mas até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro realizado no Brasil, empregando os ensaios de PCR em tempo real e detecção de BDG, em amostras de pacientes adultos em condições clínicas críticas. Por outro lado, este estudo apresenta algumas limitações. Projetos de pesquisa que envolvem pacientes em condições clínicas adversas, equipes médicas e de enfermagem de UTIs de diferentes hospitais, enfrentam diversos obstáculos e imprevistos, que dificultam seu desenvolvimento. Além dessas dificuldades, o surgimento da pandemia de COVID19 durante o desenvolvimento da pesquisa, impediu a continuidade das coletas dos pacientes internados nas UTIs, pela gravidade da situação. Neste contexto, não foi possível atingir o número de pacientes que havíamos planejado incluir no estudo, o que permitiria análises estatísticas dos resultados. De todo modo, acreditamos que, mesmo reduzida em relação à proposta inicial, a casuística apresentada foi significativa, permitindo análises que resultarão em informações consistentes em relação ao diagnóstico laboratorial das candidíases.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento na incidência de infecções invasivas por *Candida*, e a emergência de espécies não-*C. albicans*, com suscetibilidade reduzida ou resistência intrínseca aos azóis, revelam a necessidade de desenvolver novas ferramentas de diagnóstico que possam ajudar a identificar, com maior rapidez, pacientes com infecção invasiva por *Candida*, permitindo a introdução precoce de terapêutica adequada (Delaloye and Calandra 2014).

O presente estudo avaliou o desempenho analítico e a acurácia diagnóstica do ensaio de PCR em tempo real, bem como de um marcador sorológico (BDG) em pacientes com suspeita de infecção de corrente sanguínea por *Candida*. Avaliou ainda a acurácia da técnica de MALDI-TOF para a identificação das espécies de *Candida* diretamente dos balões de hemoculturas positivos. Em relação a esta última, foi demonstrado que a identificação das leveduras diretamente dos balões de hemocultura foi de 90% concordante com os resultados das identificações obtidas pelas culturas (com apenas dois resultados indeterminados), e obtida em 2-3 horas após a sinalização de positividade dos balões. Deste modo, podemos concluir que a técnica é rápida e fornece resultados com acurácia, além de apresentar custo inferior às demais técnicas de identificação fenotípica automatizadas. Laboratórios de rotina diagnóstica com capacidade para adquirir o equipamento de espectrometria de massa podem substituir a metodologia clássica de identificação do patógeno, beneficiando os pacientes que poderão receber terapêutica mais precocemente.

Os resultados mostraram boa *performance* dos ensaios de qPCR e BDG na detecção do patógeno nos casos de candidemia comprovada, com sensibilidade de 100% e 90%, respectivamente. Entretanto para os pacientes do grupo de prováveis, os resultados de ambos os testes denotam dificuldades na interpretação.

O ensaio de BDG mostrou resultados positivos em alguns pacientes deste grupo (prováveis), podendo ser interpretados como inespecíficos, devido a diversos fatores que podem interferir na detecção. Por outro lado, esses resultados podem indicar pacientes com a infecção de corrente sanguínea por *Candida*, apesar das hemoculturas negativas, que apresentam sensibilidade limitada (Pappas et al. 2016). De todo modo, a baixa especificidade do ensaio de BDG, que vem sendo relatada na literatura, dificulta a adoção do teste em laboratórios de rotina diagnóstica, além do elevado custo, questão relevante para hospitais da rede pública de saúde.

Também contribui para uma melhor interpretação dos resultados obtidos pelos dois ensaios (qPCR e BDG), a dificuldade em definir esses pacientes como prováveis de desenvolver a infecção. É tarefa difícil classificar os participantes do estudo nesta categoria, quando a definição é comumente baseada na decisão clínica de introduzir terapêutica antifúngica, muitas vezes indicada de modo empírico, devido às condições clínicas críticas dos pacientes (McMullan et al. 2008).

A detecção de *Candida* diretamente em amostras clínicas por técnicas moleculares tem sido um desafio, como demonstram os vários relatos da literatura. Nossos resultados mostraram que a *performance* da qPCR proposta foi superior à de outros estudos, apresentando sensibilidade de 100% em pacientes com candidemia comprovada; entretanto, poucas amostras de pacientes com risco de desenvolver infecção de corrente sanguínea (prováveis) mostraram resultados positivos. A baixa carga fúngica circulante na corrente sanguínea e dificuldades no processo de extração do DNA podem comprometer os níveis de sensibilidade dos ensaios de PCR (Neely et al. 2013). Para melhorar a *performance* da técnica, acreditamos que a etapa de extração seja o maior desafio. A proposta de um estudo colaborativo, como o que foi conduzido pelo *Working Group European Aspergillus PCR Initiative* para a padronização do diagnóstico molecular da aspergilose, poderia contribuir para a resolução dessas dificuldades técnicas, permitindo sua padronização.

Há diversos estudos relatados na literatura empregando diferentes plataformas de PCR para o diagnóstico precoce de candidemia. Mas até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro realizado no Brasil, empregando os ensaios de PCR em tempo real e detecção de BDG, em amostras de pacientes adultos em condições clínicas críticas. Projetos de pesquisa que envolvem pacientes em condições clínicas adversas, equipes médicas e de enfermagem de UTIs de diferentes hospitais, enfrentam diversos obstáculos e imprevistos, que dificultam seu desenvolvimento. Além dessas dificuldades, o surgimento da pandemia de COVID19 durante o desenvolvimento da pesquisa, fomos impedidos de continuar as coletas dos pacientes internados nas UCIs, pela gravidade da situação. Neste contexto, não foi possível atingir o número de pacientes que havíamos planejado incluir no estudo, o que permitiria análises estatísticas dos resultados mais consistentes. De todo modo, acreditamos que, mesmo reduzida, a casuística apresentada foi significativa, permitindo análises que resultarão em informações consistentes em relação ao diagnóstico laboratorial das candidemias.

7. REFERÊNCIAS

- Abe, M., M. Kimura, H. Araoka, S. Taniguchi, and A. Yoneyama. 2014. "Serum (1,3)-beta-D-glucan is an inefficient marker of breakthrough candidemia." *Med Mycol* 52 (8): 835-40. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu066>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25349254>.
- Ahmad, S., and W. Alfouzan. 2021. "Epidemiology, Diagnosis, Pathogenesis, Antifungal Susceptibility, and Infection Control Measures to Combat the Spread of Infections in Healthcare Facilities." *Microorganisms* 9 (4).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040807>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33920482>.
- Arvanitis, M., P. D. Ziakas, I. M. Zacharioudakis, F. N. Zervou, A. M. Caliendo, and E. Mylonakis. 2014. "PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance." *J Clin Microbiol* 52 (10): 3731-42.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01365-14>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122854>.
- Bal, A. M., and M. McGill. 2018. "Rapid species identification of *Candida* directly from blood culture broths by Sepsityper-MALDI-TOF mass spectrometry: impact on antifungal therapy." *J R Coll Physicians Edinb* 48 (2): 114-119.
<https://doi.org/10.4997/JRCPE.2018.203>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29992199>.
- Barchiesi, F., E. Orsetti, R. Gesuita, E. Skrami, E. Manso, and Candidemia Study Group. 2016. "Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in a tertiary referral center in Italy from 2010 to 2014." *Infection* 44 (2): 205-13. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0845-z>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26410297>.
- Bilir, S. P., C. P. Ferrufino, M. A. Pfaller, and J. Munakata. 2015. "The economic impact of rapid *Candida* species identification by T2Candida among high-risk patients." *Future Microbiol* 10 (7): 1133-44. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.29>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848692>.
- Brinkman, N. E., R. A. Haugland, L. J. Wymer, M. Byappanahalli, R. L. Whitman, and S. J. Vesper. 2003. "Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water." *Appl Environ Microbiol* 69 (3): 1775-82. <https://doi.org/10.1128/aem.69.3.1775-1782.2003>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620869>.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellems, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Wittwer. 2009. "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clin Chem* 55 (4): 611-22.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246619>.
- Camp, I., K. Spettel, and B. Willinger. 2020. "Molecular Methods for the Diagnosis of Invasive Candidiasis." *J Fungi (Basel)* 6 (3). <https://doi.org/10.3390/jof6030101>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32640656>.
- Chahoud, J., Z. A. Kanafani, and S. S. Kanj. 2013. "Management of candidaemia and invasive candidiasis in critically ill patients." *Int J Antimicrob Agents* 42 Suppl: S29-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.008>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664579>.
- Chapman, B., M. Slavin, D. Marriott, C. Halliday, S. Kidd, I. Arthur, N. Bak, C. H. Heath, K. Kennedy, C. O. Morrissey, T. C. Sorrell, S. van Hal, C. Keighley, E. Goeman, N. Underwood, K. Hajkiewicz, A. Hofmeyr, M. Leung, N. Macesic, J.

- Botes, C. Blyth, L. Cooley, C. R. George, P. Kalukottege, A. Kesson, B. McMullan, R. Baird, J. Robson, T. M. Korman, S. Pendle, K. Weeks, E. Liu, E. Cheong, S. Chen, and Australian and New Zealand Mycoses Interest Group. 2017. "Changing epidemiology of candidaemia in Australia." *J Antimicrob Chemother* 72 (4): 1103-1108. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw422>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28364558>.
- Chen, Y. C., J. D. Eisner, M. M. Kattar, S. L. Rassouljian-Barrett, K. LaFe, S. L. Yarfitz, A. P. Limaye, and B. T. Cookson. 2000. "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* 38 (6): 2302-10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10834993>.
- Clancy, C. J., and M. H. Nguyen. 2013. "Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care." *Clin Infect Dis* 56 (9): 1284-92. <https://doi.org/10.1093/cid/cit006>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23315320>.
- Clancy, C. J., P. G. Pappas, J. Vazquez, M. A. Judson, D. P. Kontoyiannis, G. R. Thompson, K. W. Garey, A. Reboli, R. N. Greenberg, S. Apewokin, G. M. Lyon, L. Ostrosky-Zeichner, A. H. B. Wu, E. Tobin, M. H. Nguyen, and A. M. Caliendo. 2018. "Detecting Infections Rapidly and Easily for Candidemia Trial, Part 2 (DIRECT2): A Prospective, Multicenter Study of the T2Candida Panel." *Clin Infect Dis* 66 (11): 1678-1686. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1095>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29438475>.
- Clark, A. E., E. J. Kaleta, A. Arora, and D. M. Wolk. 2013. "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology." *Clin Microbiol Rev* 26 (3): 547-603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23824373>.
- Cleveland, A. A., L. H. Harrison, M. M. Farley, R. Hollick, B. Stein, T. M. Chiller, S. R. Lockhart, and B. J. Park. 2015. "Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of Candida resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance." *PLoS One* 10 (3): e0120452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120452>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822249>.
- Colombo, A. L., J. A. Cortes, J. Zurita, M. Guzman-Blanco, T. Alvarado Matute, F. de Queiroz Telles, M. E. Santolaya, I. N. Tiraboschi, J. Echevarría, J. Sifuentes, L. Thompson-Moya, M. Nucci, and Grupo Proyecto Épico. 2013. "[Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America. Grupo Proyecto Épico]." *Rev Iberoam Micol* 30 (3 Suppl 1): 150-7. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.009>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23764553>.
- Corcione, S., L. Chasseur, T. Lupia, N. Shbaklo, S. Scabini, C. Filippini, S. Mornese Pinna, S. Morra di Celle, R. Cavallo, and F. G. De Rosa. 2022. "The Diagnostic Relevance of β -D-Glucan for Candidemia within Internal Medicine Wards." *Diagnostics (Basel)* 12 (9). <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092124>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36140525>.
- da Matta, D. A., A. C. R. Souza, and A. L. Colombo. 2017. "Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Candida Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers." *J Fungi (Basel)* 3 (2).

- <https://doi.org/10.3390/jof3020024>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371542>.
- de Jong, A. W., and F. Hagen. 2019. "Attack, Defend and Persist: How the Fungal Pathogen *Candida auris* was Able to Emerge Globally in Healthcare Environments." *Mycopathologia* 184 (3): 353-365.
<https://doi.org/10.1007/s11046-019-00351-w>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31209693>.
- Del Negro, G. M., A. F. Delgado, E. R. Manuli, L. Yamamoto, and T. S. Okay. 2010. "Dual candidemia detected by nested polymerase chain reaction in two critically ill children." *Med Mycol* 48 (8): 1116-20.
<https://doi.org/10.3109/13693786.2010.499375>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20662631>.
- Delaloye, J., and T. Calandra. 2014. "Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient." *Virulence* 5 (1): 161-9. <https://doi.org/10.4161/viru.26187>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157707>.
- DesJardin, J. A., M. E. Falagas, R. Ruthazer, J. Griffith, D. Wawrose, D. Schenkein, K. Miller, and D. R. Snyderman. 1999. "Clinical utility of blood cultures drawn from indwelling central venous catheters in hospitalized patients with cancer." *Ann Intern Med* 131 (9): 641-7. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-131-9-199911020-00002>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10577325>.
- Doi, A. M., A. C. Pignatari, M. B. Edmond, A. R. Marra, L. F. Camargo, R. A. Siqueira, V. P. da Mota, and A. L. Colombo. 2016. "Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program." *PLoS One* 11 (1): e0146909.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26808778>.
- Donnelly, J. P., S. C. Chen, C. A. Kauffman, W. J. Steinbach, J. W. Baddley, P. E. Verweij, C. J. Clancy, J. R. Wingard, S. R. Lockhart, A. H. Groll, T. C. Sorrell, M. Bassetti, H. Akan, B. D. Alexander, D. Andes, E. Azoulay, R. Bialek, R. W. Bradsher, S. Bretagne, T. Calandra, A. M. Caliendo, E. Castagnola, M. Cruciani, M. Cuenca-Estrella, C. F. Decker, S. R. Desai, B. Fisher, T. Harrison, C. P. Heussel, H. E. Jensen, C. C. Kibbler, D. P. Kontoyiannis, B. J. Kullberg, K. Lagrou, F. Lamoth, T. Lehrnbecher, J. Loeffler, O. Lortholary, J. Maertens, O. Marchetti, K. A. Marr, H. Masur, J. F. Meis, C. O. Morrissey, M. Nucci, L. Ostrosky-Zeichner, L. Pagano, T. F. Patterson, J. R. Perfect, Z. Racil, E. Roilides, M. Ruhnke, C. S. Prokop, S. Shoham, M. A. Slavin, D. A. Stevens, G. R. Thompson, J. A. Vazquez, C. Viscoli, T. J. Walsh, A. Warris, L. J. Wheat, P. L. White, T. E. Zaoutis, and P. G. Pappas. 2020. "Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium." *Clin Infect Dis* 71 (6): 1367-1376.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciz1008>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31802125>.
- Douglass, A. P., B. Offei, S. Braun-Galleani, A. Y. Coughlan, A. A. R. Martos, R. A. Ortiz-Merino, K. P. Byrne, and K. H. Wolfe. 2018. "Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names." *PLoS Pathog* 14 (7): e1007138.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007138>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30024981>.

- Ferreira, L., F. Sánchez-Juanes, J. L. Muñoz-Bellido, and J. M. González-Buitrago. 2011. "Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method." *Clin Microbiol Infect* 17 (7): 1007-12. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03339.x>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718803>.
- Frías-De-León, M. G., R. Pinto-Almazán, R. Hernández-Castro, E. García-Salazar, P. Meza-Meneses, C. Rodríguez-Cerdeira, R. Arenas, E. Conde-Cuevas, G. Acosta-Altamirano, and E. Martínez-Herrera. 2021. "Epidemiology of Systemic Mycoses in the COVID-19 Pandemic." *J Fungi (Basel)* 7 (7).
<https://doi.org/10.3390/jof7070556>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34356935>.
- Fuchs, S., C. Lass-Flörl, and W. Posch. 2019. "Diagnostic Performance of a Novel Multiplex PCR Assay for Candidemia among ICU Patients." *J Fungi (Basel)* 5 (3). <https://doi.org/10.3390/jof5030086>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31533333>.
- Gabaldón, T., M. A. Naranjo-Ortíz, and M. Marcet-Houben. 2016. "Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina." *FEMS Yeast Res* 16 (6).
<https://doi.org/10.1093/femsyr/fow064>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27493146>.
- Gabaldón, T., and Consortium OPATHY. 2019. "Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS." *FEMS Microbiol Rev* 43 (5): 517-547.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz015>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31158289>.
- Giacobbe, D. R., A. E. Maraolo, V. Simeon, F. Magnè, M. C. Pace, I. Gentile, P. Chiodini, C. Viscoli, M. Sanguinetti, M. Mikulska, M. Fiore, and M. Bassetti. 2020. "Changes in the relative prevalence of candidaemia due to non-albicans *Candida* species in adult in-patients: A systematic review, meta-analysis and meta-regression." *Mycoses* 63 (4): 334-342. <https://doi.org/10.1111/myc.13054>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31997414>.
- Guiver, M., K. Levi, and B. A. Oppenheim. 2001. "Rapid identification of candida species by TaqMan PCR." *J Clin Pathol* 54 (5): 362-6.
<https://doi.org/10.1136/jcp.54.5.362>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328834>.
- Guo, Y., J. X. Yang, and G. W. Liang. 2016. "A Real-Time PCR Assay Based on 5.8S rRNA Gene (5.8S rDNA) for Rapid Detection of *Candida* from Whole Blood Samples." *Mycopathologia* 181 (5-6): 405-13. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9977-z>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26687075>.
- Halliday, C. L., S. E. Kidd, T. C. Sorrell, and S. C. Chen. 2015. "Molecular diagnostic methods for invasive fungal disease: the horizon draws nearer?" *Pathology* 47 (3): 257-69. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000234>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25719852>.
- Hasseine, L., S. Cassaing, F. Robert-Gangneux, J. Fillaux, P. Marty, J. P. Gangneux, and PF-qPCR Study Group. 2015. "High negative predictive value diagnostic strategies for the reevaluation of early antifungal treatment: A multicenter prospective trial in patients at risk for invasive fungal infections." *J Infect* 71 (2): 258-65. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.04.005>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25896093>.
- Hoorfar, J., N. Cook, B. Malorny, M. Wagner, D. De Medici, A. Abdulmawjood, and P. Fach. 2003. "Making internal amplification control mandatory for diagnostic

- PCR." *J Clin Microbiol* 41 (12): 5835.
<https://doi.org/10.1128/jcm.41.12.5835.2003>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662997>.
- Innings, A., M. Ullberg, A. Johansson, C. J. Rubin, N. Noreus, M. Isaksson, and B. Herrmann. 2007. "Multiplex real-time PCR targeting the RNase P RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood." *J Clin Microbiol* 45 (3): 874-80. <https://doi.org/10.1128/JCM.01556-06>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215340>.
- Jeddi, F., G. C. Yapo-Kouadio, A. C. Normand, C. Cassagne, P. Marty, and R. Piarroux. 2017. "Performance assessment of two lysis methods for direct identification of yeasts from clinical blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry." *Med Mycol* 55 (2): 185-192. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw038>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281814>.
- Karageorgopoulos, D. E., E. K. Vouloumanou, F. Ntziora, A. Michalopoulos, P. I. Rafailidis, and M. E. Falagas. 2011. "β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis." *Clin Infect Dis* 52 (6): 750-70. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq206>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21367728>.
- Kashiha, A., N. Setayesh, Y. Panahi, A. Ahmadi, M. Soltany-Rezaee-Rad, A. Najafi, M. R. Rouini, A. Namipashaki, A. Sahebkar, and M. Mojtahedzadeh. 2018. "Prevalence of candidemia and associated candida subtypes following severe sepsis in non-neutropenic critically ill patients." *Acta Biomed* 89 (2): 193-202. <https://doi.org/10.23750/abm.v89i2.5385>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29957751>.
- Kaur, H., and A. Chakrabarti. 2017. "Strategies to Reduce Mortality in Adult and Neonatal Candidemia in Developing Countries." *J Fungi (Basel)* 3 (3). <https://doi.org/10.3390/jof3030041>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371558>.
- Kayaaslan, B., A. Kaya Kalem, D. Asilturk, B. Kaplan, G. Dönertas, I. Hasanoglu, F. Eser, R. Korkmazer, Z. Oktay, I. Ozkocak Turan, D. Erdem, H. Bektas, and R. Guner. 2022. "Incidence and risk factors for COVID-19 associated candidemia (CAC) in ICU patients." *Mycoses* 65 (5): 508-516. <https://doi.org/10.1111/myc.13431>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35156742>.
- Khan, A., E. El-Charabaty, and S. El-Sayegh. 2015. "Fungal infections in renal transplant patients." *J Clin Med Res* 7 (6): 371-8. <https://doi.org/10.14740/jocmr2104w>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883698>.
- Kidd, S. E., S. C. Chen, W. Meyer, and C. L. Halliday. 2019. "A New Age in Molecular Diagnostics for Invasive Fungal Disease: Are We Ready?" *Front Microbiol* 10: 2903. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02903>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31993022>.
- Kourkoumpetis, T. K., B. B. Fuchs, J. J. Coleman, A. Desalermos, and E. Mylonakis. 2012. "Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections." *Clin Infect Dis* 54 (9): 1322-31. <https://doi.org/10.1093/cid/cis132>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22362884>.
- Kritikos, A., J. Poissy, A. Croxatto, P. Y. Bochud, J. L. Pagani, and F. Lamoth. 2020. "Impact of the Beta-Glucan Test on Management of Intensive Care Unit Patients at Risk for Invasive Candidiasis." *J Clin Microbiol* 58 (6).

- <https://doi.org/10.1128/JCM.01996-19>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32238435>.
- Lau, A., T. C. Sorrell, S. Chen, K. Stanley, J. Iredell, and C. Halliday. 2008. "Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens." *J Clin Microbiol* 46 (9): 3021-7.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00689-08>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632914>.
- León, C., S. Ruiz-Santana, P. Saavedra, B. Galván, A. Blanco, C. Castro, C. Balasini, A. Utande-Vázquez, F. J. González de Molina, M. A. Blasco-Navalproto, M. J. López, P. E. Charles, E. Martín, M. A. Hernández-Viera, and Cava Study Group. 2009. "Usefulness of the "Candida score" for discriminating between Candida colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study." *Crit Care Med* 37 (5): 1624-33.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819daa14>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325481>.
- Liu, Y., F. Chen, X. Zhu, L. Shen, and S. X. Zhang. 2015. "Evaluation of a Novel Plasma (1,3)- β -d-Glucan Detection Assay for Diagnosis of Candidemia in Pediatric Patients." *J Clin Microbiol* 53 (9): 3017-20.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00673-15>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26109441>.
- Luciano, P., C. M. Berteza, G. Temporale, and M. E. Maffei. 2007. "DNA internal standard for the quantitative determination of hallucinogenic plants in plant mixtures." *Forensic Sci Int Genet* 1 (3-4): 262-6.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.06.003>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19083771>.
- Luo, G., and T. G. Mitchell. 2002. "Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR." *J Clin Microbiol* 40 (8): 2860-5.
<https://doi.org/10.1128/jcm.40.8.2860-2865.2002>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149343>.
- Machado, M., A. Estévez, C. Sánchez-Carrillo, J. Guinea, P. Escribano, R. Alonso, M. Valerio, B. Padilla, E. Bouza, and P. Muñoz. 2022. "Incidence of Candidemia Is Higher in COVID-19 versus Non-COVID-19 Patients, but Not Driven by Intrahospital Transmission." *J Fungi (Basel)* 8 (3).
<https://doi.org/10.3390/jof8030305>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35330307>.
- Martin-Loeches, I., M. Antonelli, M. Cuenca-Estrella, G. Dimopoulos, S. Einav, J. J. De Waele, J. Garnacho-Montero, S. S. Kanj, F. R. Machado, P. Montravers, Y. Sakr, M. Sanguinetti, J. F. Timsit, and M. Bassetti. 2019. "ESICM/ESCMID task force on practical management of invasive candidiasis in critically ill patients." *Intensive Care Med* 45 (6): 789-805. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05599-w>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30911804>.
- McKeating, C., P. L. White, R. Posso, M. Palmer, E. Johnson, and R. McMullan. 2018. "Diagnostic accuracy of fungal PCR and β -d-glucan for detection of candidaemia: a preliminary evaluation." *J Clin Pathol* 71 (5): 420-424.
<https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204692>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28970296>.
- McMullan, R., L. Metwally, P. V. Coyle, S. Hedderwick, B. McCloskey, H. J. O'Neill, C. C. Patterson, G. Thompson, C. H. Webb, and R. J. Hay. 2008. "A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults." *Clin Infect Dis* 46 (6): 890-

6. <https://doi.org/10.1086/528690>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18260751>.
- Mennink-Kersten, M. A., D. Ruegebrink, and P. E. Verweij. 2008. "Pseudomonas aeruginosa as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity." *Clin Infect Dis* 46 (12): 1930-1. <https://doi.org/10.1086/588563>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18540808>.
- Mikulska, M., D. R. Giacobbe, E. Furfaro, A. Mesini, A. Marchese, V. Del Bono, and C. Viscoli. 2016. "Lower sensitivity of serum (1,3)- β -d-glucan for the diagnosis of candidaemia due to *Candida parapsilosis*." *Clin Microbiol Infect* 22 (7): 646.e5-8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.020>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27256062>.
- Mylonakis, E., C. J. Clancy, L. Ostrosky-Zeichner, K. W. Garey, G. J. Alangaden, J. A. Vazquez, J. S. Groeger, M. A. Judson, Y. M. Vinagre, S. O. Heard, F. N. Zervou, I. M. Zacharioudakis, D. P. Kontoyiannis, and P. G. Pappas. 2015. "T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial." *Clin Infect Dis* 60 (6): 892-9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu959>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25586686>.
- Neely, L. A., M. Audeh, N. A. Phung, M. Min, A. Suchocki, D. Plourde, M. Blanco, V. Demas, L. R. Skewis, T. Anagnostou, J. J. Coleman, P. Wellman, E. Mylonakis, and T. J. Lowery. 2013. "T2 magnetic resonance enables nanoparticle-mediated rapid detection of candidemia in whole blood." *Sci Transl Med* 5 (182): 182ra54. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005377>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23616121>.
- Nguyen, M. H., M. C. Wissel, R. K. Shields, M. A. Salomoni, B. Hao, E. G. Press, R. M. Shields, S. Cheng, D. Mitsani, A. Vadnerkar, F. P. Silveira, S. B. Kleiboeker, and C. J. Clancy. 2012. "Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, β -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis." *Clin Infect Dis* 54 (9): 1240-8. <https://doi.org/10.1093/cid/cis200>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431804>.
- Nucci, M., G. Barreiros, L. F. Guimarães, V. A. S. Deriquehem, A. C. Castiñeiras, and S. A. Nouér. 2021. "Increased incidence of candidemia in a tertiary care hospital with the COVID-19 pandemic." *Mycoses* 64 (2): 152-156. <https://doi.org/10.1111/myc.13225>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33275821>.
- Nucci, M., S. A. Nouér, P. Esteves, T. Guimarães, G. Breda, B. G. de Miranda, F. Queiroz-Telles, and A. L. Colombo. 2016. "Discontinuation of empirical antifungal therapy in ICU patients using 1,3- β -d-glucan." *J Antimicrob Chemother* 71 (9): 2628-33. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw188>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27287231>.
- Panda, A., A. K. Ghosh, B. R. Mirdha, I. Xess, S. Paul, J. C. Samantaray, A. Srinivasan, S. Khalil, N. Rastogi, and Y. Dabas. 2015. "MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers." *J Microbiol Methods* 109: 93-105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.014>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25541362>.
- Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. R. Andes, C. J. Clancy, K. A. Marr, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, M. G. Schuster, J. A. Vazquez, T. J. Walsh, T. E. Zaoutis, and J. D. Sobel. 2016. "Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America."

- Clin Infect Dis* 62 (4): e1-50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26679628>.
- Perfect, J. R. 2013. "Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better?" *Curr Med Res Opin* 29 Suppl 4: 3-11. <https://doi.org/10.1185/03007995.2012.761134>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23621588>.
- Pfaller, M. A., and M. Castanheira. 2016. "Nosocomial Candidiasis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis." *Med Mycol* 54 (1): 1-22. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv076>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385381>.
- Pitarch, A., C. Nombela, and C. Gil. 2018. "Diagnosis of Invasive Candidiasis: From Gold Standard Methods to Promising Leading-edge Technologies." *Curr Top Med Chem* 18 (16): 1375-1392. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181025093146>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30360714>.
- Posteraro, B., G. De Pascale, M. Tumbarello, R. Torelli, M. A. Pennisi, G. Bello, R. Maviglia, G. Fadda, M. Sanguinetti, and M. Antonelli. 2011. "Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)-β-D-glucan assay, Candida score, and colonization index." *Crit Care* 15 (5): R249. <https://doi.org/10.1186/cc10507>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018278>.
- Puig-Asensio, M., J. Pemán, R. Zaragoza, J. Garnacho-Montero, E. Martín-Mazuelos, M. Cuenca-Estrella, B. Almirante, Prospective Population Study on Candidemia in Spain (CANDIPOP) Project, Hospital Infection Study Group (GEIH), Medical Mycology Study Group (GEMICOMED) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC), and Spanish Network for Research in Infectious Diseases. 2014. "Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU." *Crit Care Med* 42 (6): 1423-32. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000221>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24557426>.
- Pulcrano, G., D. V. Iula, A. Vollarò, A. Tucci, M. Cerullo, M. Esposito, F. Rossano, and M. R. Catania. 2013. "Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections." *J Microbiol Methods* 94 (3): 262-6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.001>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845229>.
- Sambrook, J.F., Russel, D.W. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100.
- Shabaan, A. E., L. M. Elbaz, W. M. El-Emshaty, and B. Shouman. 2018. "Role of serum (1,3)-β-d-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit." *J Pediatr (Rio J)* 94 (5): 559-565. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.07.020>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29144965>.
- Shin, J. H., S. J. Kee, M. G. Shin, S. H. Kim, D. H. Shin, S. K. Lee, S. P. Suh, and D. W. Ryang. 2002. "Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources." *J Clin Microbiol* 40 (4): 1244-8. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.4.1244-1248.2002>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923339>.
- Silva Junior, J. M., L. M. Malbouisson, H. L. Nuevo, L. G. Barbosa, L. Y. Marubayashi, I. C. Teixeira, A. P. Nassar Junior, M. J. Carmona, I. F. Silva, J. O. Auler Júnior,

- and E. Rezende. 2010. "Applicability of the simplified acute physiology score (SAPS 3) in Brazilian hospitals." *Rev Bras Anesthesiol* 60 (1): 20-31.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169260>.
- Silva-Dias, A., I. M. Miranda, J. Branco, M. Monteiro-Soares, C. Pina-Vaz, and A. G. Rodrigues. 2015. "Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp." *Front Microbiol* 6: 205. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00205>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25814989>.
- Spanu, T., B. Posteraro, B. Fiori, T. D'Inzeo, S. Campoli, A. Ruggeri, M. Tumbarello, G. Canu, E. M. Trecarichi, G. Parisi, M. Tronci, M. Sanguinetti, and G. Fadda. 2012. "Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories." *J Clin Microbiol* 50 (1): 176-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.05742-11>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22090401>.
- Stranieri, I., K. A. Kanunfre, J. C. Rodrigues, L. Yamamoto, M. I. Nadaf, P. Palmeira, and T. S. Okay. 2016. "Usefulness of a 16S rDNA real-time PCR to monitor neonatal sepsis and to assist in medical decision to discontinue antibiotics." *J Matern Fetal Neonatal Med* 29 (13): 2141-4.
<https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1077223>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26334172>.
- Suleyman, G., and G. J. Alangaden. 2016. "Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention." *Infect Dis Clin North Am* 30 (4): 1023-1052. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.07.008>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27816138>.
- Taira, C. L., T. S. Okay, A. F. Delgado, M. E. Ceccon, M. T. de Almeida, and G. M. Del Negro. 2014. "A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients." *BMC Infect Dis* 14: 406. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-406>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25047415>.
- Tan, K. E., B. C. Ellis, R. Lee, P. D. Stamper, S. X. Zhang, and K. C. Carroll. 2012. "Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness." *J Clin Microbiol* 50 (10): 3301-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01405-12>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22855510>.
- Tardif, K. D., and R. Schlaberg. 2017. "Development of a real-time PCR assay for the direct detection of *Candida* species causing Vulvovaginal candidiasis." *Diagn Microbiol Infect Dis* 88 (1): 39-40.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.012>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28242128>.
- Than, L. T., P. P. Chong, K. P. Ng, and H. F. Seow. 2015. "Detection of medically important *Candida* species by absolute quantitation real-time polymerase chain reaction." *Jundishapur J Microbiol* 8 (1): e14940.
<https://doi.org/10.5812/jjm.14940>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789129>.
- Thomaz, D. Y., J. N. de Almeida, G. M. E. Lima, M. O. Nunes, C. H. Camargo, R. C. Grenfell, G. Benard, and G. M. B. Del Negro. 2018. "An Azole-Resistant."

- Front Microbiol* 9: 2997. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02997>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30568646>.
- Thomaz, D. Y., G. M. B. Del Negro, L. B. Ribeiro, M. da Silva, G. O. M.H Carvalho, C. H. Camargo, J. N. de Almeida, A. L. Motta, R. F. Siciliano, O. N. E. Sejas, F. Rossi, E. Abdala, T. M. V. Strabelli, and G. Benard. 2022. "A Brazilian Inter-Hospital Candidemia Outbreak Caused by Fluconazole-Resistant." *J Fungi (Basel)* 8 (2). <https://doi.org/10.3390/jof8020100>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35205855>.
- Toda, M., S. R. Williams, E. L. Berkow, M. M. Farley, L. H. Harrison, L. Bonner, K. M. Marceaux, R. Hollick, A. Y. Zhang, W. Schaffner, S. R. Lockhart, B. R. Jackson, and S. Vallabhaneni. 2019. "Population-Based Active Surveillance for Culture-Confirmed Candidemia - Four Sites, United States, 2012-2016." *MMWR Surveill Summ* 68 (8): 1-15. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6808a1>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31557145>.
- Van Burik, J. A., D. Myerson, R. W. Schreckhise, and R. A. Bowden. 1998. "Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens." *J Clin Microbiol* 36 (5): 1169-75. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.5.1169-1175.1998>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9574670>.
- White, P. L., J. S. Price, A. Cordey, and M. Backx. 2021. "Molecular Diagnosis of Yeast Infections." *Curr Fungal Infect Rep* 15 (3): 67-80.
<https://doi.org/10.1007/s12281-021-00421-x>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34178207>.
- Wickes, B. L., and N. P. Wiederhold. 2018. "Molecular diagnostics in medical mycology." *Nat Commun* 9 (1): 5135. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07556-5>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30510235>.
- Xafranski, H., A. S. Melo, A. M. Machado, M. R. Briones, and A. L. Colombo. 2013. "A quick and low-cost PCR-based assay for *Candida* spp. identification in positive blood culture bottles." *BMC Infect Dis* 13: 467.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-467>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24099320>.
- Yan, Y., Y. He, T. Maier, C. Quinn, G. Shi, H. Li, C. W. Stratton, M. Kostrzewa, and Y. W. Tang. 2011. "Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system." *J Clin Microbiol* 49 (7): 2528-32. <https://doi.org/10.1128/JCM.00339-11>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21543564>.
- Yang, Y. L., W. L. Chu, C. C. Lin, Z. L. Zhou, P. N. Chen, H. J. Lo, and TSARY Hospitals. 2018. "Mixed yeast infections in Taiwan." *Med Mycol* 56 (6): 770-773. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx094>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29087478>.
- Zengin Canalp, H., and B. Bayraktar. 2021. "Direct Rapid Identification from Positive Blood Cultures by MALDI-TOF MS: Specific Focus on Turnaround Times." *Microbiol Spectr* 9 (3): e0110321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01103-21>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34908465>.