CLEISON LEDESMA TAIRA

Validação da PCR multiplex na detecção e identificação de *Candida* spp. em infecções de corrente sanguínea de pacientes pediátricos gravemente doentes

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro

São Paulo

2013

CLEISON LEDESMA TAIRA

Validação da PCR multiplex na detecção e identificação de *Candida* spp. em infecções de corrente sanguínea de pacientes pediátricos gravemente doentes

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro

São Paulo

2013

Aos meus pais (Alfredo e Iracilda) e aos meus queridos irmãos (Tiago e Deborah).

Agradecimentos

A Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro, minha orientadora que esteve ao meu lado durante esta etapa, contribuindo muito na minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

A todos os funcionários e alunos do Laboratório de Micologia do IMT (LIM-53) pelo apoio e alegria desses anos.

Ao Vagner de Oliveira Carvalho, pelo companheirismo e disponibilidade para me ajudar em todas as horas.

A Prof[a.] Dra Thelma Suely Okay por ter disponibilizado seu laboratório sempre que necessário, além de seu conhecimento que contribuiu para realização deste projeto, também servirá de inspiração para as próximas etapas de minha formação acadêmica.

A Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski pelo incentivo e pelo exemplo profissional, acadêmico e pessoal que sempre levarei comigo.

Aos Profs. Gil Benard e Carlos Pelleschi Taborda por terem me recebido no LIM-53, e pelo apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos meus amigos que estiveram presentes em minha jornada, apoiando de todas as formas e fazendo parte do meu dia a dia e de minhas queridas lembranças.

A enfermeira Angela Midori Matuhara por ter realizado as coletas da UTI neonatal, contribuindo muito para realização deste trabalho.

Ao Artur Figueiredo Delgado e Dra. Maria Esther J. R. Ceccon por possibilitarem a realização deste projeto.

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

Normalização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.
Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de símbolos e abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. *Candida* spp. e candidemias – Agente etiológico, epidemiologia, terapêutica e fatores de risco 2

1.2. Diagnóstico laboratorial 11

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO 16

3. OBJETIVOS 17

3.1. Geral 17

3.2. Específicos 17

4. MATERIAIS E MÉTODOS 18

4.1. Pacientes 18

4.1.1. Critérios de inclusão e exclusão 18

4.1.2. Pacientes internados nas UCIs 19

4.1.3. Grupo controle 19

4. 2. Amostras de sangue para realização das hemoculturas 20

4.3. Extrações de DNA das amostras sanguíneas dos pacientes 20

4.4. Extrações de DNA das amostras sanguíneas do grupo controle 22

4.5. PCR universal para DNA genômico humano 23

4.6. Extrações de DNA dos protótipos de *Candida* spp. e PCR universal para fungos 24

4.7. Sistemas e condições de amplificação da *nested* PCR multiplex para as amostras de DNA dos pacientes do estudo 26

4.8. Avaliação do limiar de detecção de DNA de *Candida* spp. pela *nested* PCR multiplex 29

4.9. Avaliação da especificidade em relação a outros agentes de infecção hematogênica e entre as espécies de *Candida* 30

4.9.1. Extrações de DNA das bactérias Gram negativas e positivas, e de outros fungos 30

4.9.2. Amplificações das amostras de DNA de bactérias e de outros fungos com *primers* universais 31

4.10. Detecção dos materiais amplificados nas reações de PCR 32

4.11. Sequenciamento automatizado dos produtos de PCR das amostras clínicas 32
4.12. Controle dos processos de amplificação e dos riscos biológicos 33
4.13. Análise estatística 34
4.14. Cálculo e comparação de custo entre a *nested* PCR multiplex e as hemoculturas 34
5. RESULTADOS 36
5.1. Dados demográficos dos pacientes 36
5.2. Avaliação das amostras de DNA obtidas dos pacientes e do grupo Controle 36
5.3. Avaliação da extração de DNA dos protótipos de *Candida* spp. e de outros micro-organismos utilizados no estudo 36
5.4. Seleção dos *primers* e condições de amplificação da *nested* PCR multiplex 38
5.5. Determinação do limiar de detecção da *nested* PCR multiplex 39
5.6. Avaliação da especificidade em relação a outros agentes de infecção hematogênica e entre as espécies de *Candida* 40
5.7. Resultados das hemoculturas e das amplificações pela *nested* PCR multiplex 41
5.8. Resultados dos sequenciamentos automatizados 43
5.9. Análise estatística 44
5.10. Cálculo e comparação de custo entre a *nested* PCR multiplex e as hemoculturas 44
6. DISCUSSÃO 45
7. CONCLUSÕES 59
8. ANEXOS 60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

β = beta

DNA = ácido desoxirribonucléico

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

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

HCl = ácido clorídrico

KHCO3 = bicarbonato de sódio

$MgCl_2$ = cloreto de magnésio

M = molar

mM = milimolar

µM = micromolar

mg = miligrama

µg = micrograma

ml = mililitro

µl = microlitro

NaCl = cloreto de sódio

NH_4Cl = cloreto de amônia

ng = nanograma

nm = nanômetros

pb = pares de base

pH = potencial hidrogeniônico

Tris = tris(hidroxiaminometano)

U = unidades

UFC = unidades formadoras de colônias

UCI = unidade de cuidados intensivos

v/v = volume a volume

RESUMO

Taira CL. **Validação da PCR multiplex na detecção e identificação de *Candida* spp. em infecções de corrente sanguínea de pacientes pediátricos gravemente doentes** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A ocorrência de candidemias em pacientes internados em unidades de cuidados intensivos é um grave problema por estar relacionada a elevadas taxas de mortalidade. Sinais e sintomas de infecção hematogênica causada por *Candida* sp. são inespecíficos, dificultando o diagnóstico e representando um desafio para o desenvolvimento de métodos diagnósticos que identifiquem precocemente o agente em amostras clínicas. As metodologias tradicionais (hemocultura e identificação fenotípica) e sorológicas (detecção de β-D-glucana, manana e anticorpos anti-manana) apresentam limitações de sensibilidade e especificidade, sendo os métodos moleculares uma alternativa para o diagnóstico dessas infecções. Neste trabalho foi desenvolvida uma técnica de *nested* PCR multiplex capaz de identificar sete espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. pelliculosa*) diretamente em amostras sanguíneas de pacientes com elevado risco de desenvolver candidemias. Na primeira etapa de amplificação foram utilizados *primers* universais para fungos (ITS1 e ITS4); e na segunda, os *primers* espécie-específicos foram distribuídos em dois sistemas de amplificação, a saber: um com *primers* para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*; e outro com *primers* para *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. pelliculosa*. A *nested* PCR multiplex foi capaz de detectar cerca de 4UFC/mL das espécies envolvidas no estudo, não apresentando reatividade cruzada quando avaliada com amostras de DNA de outros fungos e bactérias envolvidos em episódios de infecção hematogênica. Foram analisadas 55 amostras obtidas de pacientes pediátricos internados em unidades de cuidados intensivos do Instituto da Criança do HC-FMUSP e do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - UNESP, com idades variando de seis dias a 16 anos, apresentando Síndrome da Resposta

Inflamatória Sistêmica e/ou dois ou mais fatores de risco para infecção fúngica. Também foi avaliado no estudo um grupo controle, composto por 28 crianças sem risco de desenvolver fungemias, para verificação da ocorrência de possíveis reações inespecíficas pela técnica molecular. As hemoculturas foram positivas em oito pacientes (14,8%), tendo sido identificadas cinco *C. albicans*, uma *C. tropicalis*, uma *C. parapsilosis* e uma *C. krusei*. Por outro lado, a técnica de *nested* PCR multiplex detectou DNA de *Candida* em 13 pacientes (23,6%), tendo havido concordância na identificação das espécies em 100% dos casos. Entretanto, não foi observada discordância estatisticamente significativa (p=0,063) entre as duas metodologias. Dos cinco pacientes com hemoculturas negativas, a técnica molecular foi capaz de detectar dupla candidemia em três casos, identificando nessas amostras *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* simultaneamente. Nos cinco casos em que apenas a técnica de PCR foi positiva, as amostras amplificadas foram sequenciadas, apresentando similaridades de 99 a 100%, quando comparadas às sequencias de cepas de *Candida* depositadas no *GenBank*. O tempo para execução da técnica e liberação de resultados foi de aproximadamente 24 horas. O custo relativo aos procedimentos realizados para execução da PCR foi calculado e comparado ao custo dos procedimentos executados nas hemoculturas, tendo sido mais baixo. Os resultados demonstram que a *nested* PCR multiplex é técnica alternativa para a detecção e identificação de espécies de *Candida* em pacientes com risco de desenvolver candidemias, apresentando limiar de detecção adequado e capacidade de identificar mais de uma espécie de *Candida* simultaneamente em amostras clínicas. A técnica é ainda capaz de permitir a liberação de resultados em menor tempo, além de apresentar menor custo, quando comparada à metodologia convencional de cultivo.

Descritores: Candidemia/diagnóstico, reação em cadeia da polimerase multiplex, unidades de terapia intensiva, *Candida*, criança, recém-nascido

SUMMARY

Taira CL. **Validation of a PCR multiplex assay for detection and identification of *Candida* spp. in bloodstream infections of critically ill pediatric patients** [Dissertation]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

The incidence of candidemia among intensive care unit patients is associated with high mortality rates. The non-specific nature of the signs and symptoms of this infection difficult the diagnosis. Development of methods that allow early identification of the agent in clinical samples still represents a challenge. Classical methodologies (blood cultures and phenotypic identification) and serological tests (β-D-glucan and mannan detection; anti-mannan antibodies) to diagnose candidemia lack sensitivity and specificity. Molecular methods are an alternative approach to the diagnosis of candidemia. In this work we developed a nested PCR multiplex assay able to identify seven *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* and *C. pelliculosa*) directly in blood samples of patients at high risk of candidemia. In the first stage of amplification universal fungal primers (ITS1 and ITS4) were used and in the second stage, the species-specific primers were divided into two amplification systems, one with primers for *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. lusitaniae*, and another with primers for *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. pelliculosa*. The multiplex nested PCR was able to detect approximately 4 CFU/mL of the seven *Candida* species, and showed no cross reactivity when evaluated with samples of DNA from other fungi and bacteria causing hematogenous infection episodes. We analyzed 55 samples obtained from patients admitted to pediatric intensive care units of the Instituto da Criança do HCFMUSP and Hospital de Base of Medical School from São José do Rio Preto - UNESP, with ages ranging from six days to 16 years, presenting the Systemic Inflammatory Response Syndrome and/or two or more risk factors of fungal infection. A control group of 28 children without risk of fungemia, to check for occurrence of nonspecific reactions in the molecular technique, was also evaluated. Blood cultures were positive in eight

patients (14.8%), five were identified as *C. albicans*, and the remaining as *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*. The nested multiplex PCR assay detected *Candida* DNA in 13 patients (23.6%), and there was concordance in species identification in 100% of the cases. In five patients with negative blood cultures, the molecular technique was capable of detecting dual candidemia in three patients' samples, identifying *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* simultaneously. However, there was no statistically significant disagreement ($p = 0.063$) between the two methods. In these five cases for whom only the PCR was positive, the amplified samples were sequenced, showing similarities from 99 to 100% when compared with sequences of *Candida* strains deposited in GenBank. Time for execution of the technique and release of results was about 24 hours. The cost of PCR assay was compared with the cost of the conventional blood culture tests and was lower. In conclusion, we demonstrated that the nested PCR multiplex developed in our laboratory is an alternative technique for the detection and identification of *Candida* species in patients at risk of candidemia, showing appropriate detection threshold and the ability to identify simultaneously more than one *Candida* species in clinical samples. The technique is also rapid, giving results in 24 h and exhibiting lower cost when compared with the conventional culture methodology.

Descriptors: Candidemia/diagnosis, multiplex polymerase chain reaction, intensive care units, *Candida*, child, neonate

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os avanços diagnósticos e terapêuticos têm favorecido muitos pacientes (transplantados, onco-hematológicos, portadores de doenças crônicas, imunossuprimidos, queimados, pacientes submetidos a grandes cirurgias, entre outros), aumentando sua sobrevida; por outro lado, esses pacientes tornam-se suscetíveis às infecções fúngicas oportunistas (Galvan e Mariscal, 2006). A elevada morbi-mortalidade e os custos decorrentes do tratamento tornam essas infecções um importante problema de saúde pública. Diversos estudos revelam que as infecções hospitalares são responsáveis pelas complicações mais frequentes no tratamento de pacientes admitidos em unidades de cuidados intensivos, incluindo as pediátricas e neonatais, onde a frequência das enfermidades causadas por fungos têm aumentado, correspondendo a cerca de 20% de todas as infecções nosocomiais (Yamamura et al., 2001; Colombo e Guimarães, 2003; França et al., 2008).

As leveduras do gênero *Candida* permanecem como principal causa de infecções fúngicas hospitalares (Pfaller e Diekema, 2007), ocupando o quarto lugar na lista de agentes etiológicos mais frequentemente isolados de infecções hematogênicas em hospitais terciários nos Estados Unidos (Wisplinghoff et al., 2004). No Brasil, em estudo realizado por Colombo et al. (2006) em hospitais terciários, *Candida* também aparece como o quarto patógeno mais isolado de hemoculturas.

1.1. *Candida* spp. e candidemias – Agente etiológico, epidemiologia, terapêutica e fatores de risco

As leveduras estão entre os mais importantes fungos causadores de infecções oportunistas, especialmente *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, e as demais espécies destes gêneros, bem como outras leveduras que têm emergido como agentes infecciosos, tais como: *Candida glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis, C. krusei, C. dubliniensis*, *C. nivariensis*, *C. bracarensis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*, *Wickerhamomyces (Pichia) anomalus* (*Candida pelicullosa*), *Ogataea (Pichia) polymorpha*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Cryptococcus gattii*, *Malassezia* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp., e *Pseudozyma* spp (Kurtzman et al., 2011).

Algumas espécies de *Candida* possuem uma relação comensal com humanos, estando presentes na microbiota normal do trato gastrointestinal, tecido muco-cutâneo e pele. No entanto, sendo patógenos oportunistas, podem explorar um desequilíbrio local ou sistêmico na defesa do hospedeiro e causar doença. As candidíases tornaram-se mais frequentes nas últimas décadas, devido a enfermidades e terapias imunossupressoras, aumento de infecções pelo HIV, aumento da sobrevida de pacientes críticos, entre outros fatores (Kurtzman et al., 2011).

As leveduras do gênero *Candida* são ascomicetos pertencentes à família *Saccharomycetaceae,* e o gênero foi originalmente empregado para denominar leveduras sem ciclo sexual (Kurtzman et al., 2011).

Candida albicans é a espécie mais frequentemente isolada, sendo responsável por 50 a 70% das infecções sistêmicas; no entanto, desde os anos 1990, têm ocorrido mudanças nas espécies causadoras de infecção, sendo *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, as com maior frequência de isolamento, depois de *C. albicans*, na maior parte dos países, entre os quais o Brasil (Wisplinghoff et al., 2004; Galvan e Mariscal, 2006; Colombo et al., 2006). *Candida albicans* é diplóide, possui oito cromossomos e apresenta três morfologias distintas: levedura, pseudo-hifa e hifa verdadeira (Kim et al., 2011). Como para outros patógenos, a virulência em *C. albicans* inclui o reconhecimento do hospedeiro, através de mecanismos de adesão e invasão das células humanas, e a co-agregação com outros micro-organismos, para prevenir ou reduzir a depuração pelo hospedeiro (Calderone e Fonzi, 2001).

Candida parapsilosis foi originalmente isolada em Porto Rico, em 1928, das fezes de um paciente com diarréia, e foi descrita por Ashford originalmente como *Monilia parapsilosis*. Diferentemente de *C. albicans* e *C. tropicalis*, esta espécie não forma hifa verdadeira (Trofa et al., 2008). É frequentemente isolada de sangue, pele, unhas, mãos de trabalhadores da saúde, e superfícies de plásticos hospitalares e dispositivos protéticos (Nosek et al., 2009). *Candida parapsilosis* é considerada uma levedura patogênica emergente, e está cada vez mais associada a uma ampla gama de infecções, tais como fungemias, vaginites, endocardites, artrites sépticas, endoftalmites e peritonites (Trofa et al., 2008), além de estar relacionada a surtos em unidades de cuidados intensivos (Diaz-Granados et al., 2008; Hernandez-Castro et al., 2010). Recentemente, *C. parapsilosis* foi classificada como um complexo constituído de três diferentes espécies (*C. parapsilosis stricto sensu, Candida orthopsilosis*

e *Candida metapsilosis*) (Tavanti et al., 2005). Entretanto, pouco se sabe, até o momento, sobre diferenças entre essas espécies quanto aos aspectos epidemiológicos, patogênicos e terapêuticos.

Candida tropicalis é uma levedura diplóide, que se apresenta na forma de blastoconídios (isolados ou em grupos), podendo produzir pseudo-hifas longas e também hifas verdadeiras; é um patógeno humano oportunista, que coloniza vários locais anatomicamente distintos, incluindo a pele e os tratos gastro-intestinal, geniturinário e respiratório, além de ser isolado de ambiente, particularmente ambientes hospitalares. Infecções causadas por *C. tropicalis* podem ter origem endógena, quando o indivíduo já está previamente colonizado; mas também podem ter origem exógena, através de contato com profissionais da saúde colonizados, cateteres, próteses, bem como soluções parenterais,previamente contaminadas (Negri et al., 2011).

Candida glabrata, levedura haplóide, foi originalmente classificada como pertencente ao gênero *Torulopsis,* pela ausência de formação de pseudo-hifas; contudo, em 1978, foi determinado que a habilidade de formar pseudo-hifas não era um fator necessário para pertencer ao gênero *Candida*, e a levedura foi reclassificada neste gênero (Fidel et al., 1999). Nos EUA, é a segunda espécie mais comumente isolada de hemoculturas e de candidíase vaginal (Linhares et al., 2001; Sobel et al., 2004; Pfaller e Diekema, 2007). *Candida glabrata* é de especial importância devido a sua resistência aumentada para agentes antifúngicos do grupo dos azóis (Fidel et al., 1999).

A possibilidade de *C. krusei* causar doença no homem foi proposta por Castellani, mais de 75 anos após a descoberta do gênero *Candida*. Ao contrário da maioria das espécies, as leveduras são geralmente alongadas, e

geneticamente são as mais distantes em relação à *C. albicans,* entre as espécies de importância médica; podem ser isoladas de uma grande variedade de ambientes, frutas, solo, alimentos, vinhos e cerveja (Samaranayake e Samaranayake, 1994). *Candida krusei* tem sido reconhecida como patógeno potencialmente multi-resistente a drogas, devido à resistência intrínseca ao fluconazol combinada com relatos de sensibilidade diminuída à flucitosina e anfotericina B (Pfaller et al., 2008).

O primeiro relato de infecção oportunista causada por *C. lusitaniae* em paciente com leucemia aguda, bem como a capacidade dessa espécie de desenvolver resistência à anfotericina B, foi descrito em 1979 (Blinkhorn et al., 1989). Este patógeno é haplóide e pode se apresentar na forma de pseudo-hifa; sua fase teleomorfa é denominada *Clavispora lusitaniae*. Estudos têm demonstrado que a prevalência entre isolados clínicos é baixa; em ambientes hospitalares, essa levedura pode ser transmitida pelos profissionais da saúde (Kurtzman et al., 2011).

Candida pelliculosa é uma levedura frequentemente encontrada em frutas, exsudatos de troncos de árvores, solo, vegetais e outros compostos orgânicos; é descrita como responsável por episódios de fungemia, tanto em pessoas imunocompetentes, quanto em pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles com AIDS (Barchiesi et al., 2005). Esta espécie tem chamado a atenção por estar relacionada a diversos surtos de fungemia em pacientes pediátricos hospitalizados descritos na literatura (Aragão et al., 2001; Chakrabarti et al., 2001; Pasqualoto et al., 2007).

Candidemia é a presença de *Candida* spp. na corrente sanguínea, sendo essa condição definida nos diversos estudos divulgados na literatura,

quando pelo menos uma cultura de sangue é positiva para a levedura (Colombo et al., 2006; Molina et al., 2012).

As candidemias podem ser adquiridas por via endógena, pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal, local ricamente colonizado por *Candida*. Desequilíbrios na microbiota residente, procedimentos cirúrgicos, desnutrição grave, entre outros fatores, favorecem a translocação da levedura aos capilares mesentéricos, permitindo o acesso à corrente sanguínea. Por via exógena, as infecções podem ocorrer por intermédio das mãos contaminadas dos profissionais de saúde, e pela utilização de cateteres e soluções parenterais contaminadas (Tortorano et al., 2006; Perlroth et al., 2007).

As taxas de mortalidade geral entre pacientes em condições clínicas críticas com candidemia variam de 45 a 75%. Estes elevados índices podem estar relacionados ao diagnóstico tardio, e a falhas no tratamento decorrentes da demora na instituição da terapêutica, ou ainda à utilização de antifúngicos inadequados. Devido à complexidade das condições clínicas desses pacientes, é difícil estimar a taxa de mortalidade atribuída à infecção, que segundo alguns autores, é da ordem de 20 a 40% dos casos (Gudlaugsson et al., 2003; Pfaller e Diekema, 2007).

Estudos de vigilância epidemiológica em infecções hospitalares causadas por *Candida* spp. têm sido realizados em diversos países. Nos EUA, a frequência de candidemias em ambientes hospitalares varia de 0,28 a 0,96 casos/1.000 internações, enquanto na Europa varia de 0,17 a 0,76 casos por 1.000 internações, dependendo do país onde o estudo foi conduzido (Colombo et al., 2006; Tortorano et al., 2006; Pfaller e Diekema, 2007).

No Brasil há diversos relatos sobre a frequência dessas infecções em ambientes hospitalares, mas poucos são os dados específicos sobre a frequência em crianças. Colombo et al. (2006) realizaram o maior estudo prospectivo multicêntrico no Brasil, abrangendo 11 hospitais terciários, e encontraram elevada frequência de candidemias (2,49 casos/1.000 internações), de 2 a 15 vezes maiores que as referidas em países da Europa e nos EUA. Em 41% dos casos, *C. albicans* foi isolada, seguida de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, ambas em 21% dos casos.

No Rio Grande do Sul, Aquino et al. (2005) analisaram 131 episódios de candidemia, em um período de seis anos, observando que 39,7% dos pacientes pertenciam a UCIs, e 19,8% eram neonatos e crianças; a taxa de mortalidade geral observada foi de 51,9%. *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente (45%), seguida de *C. parapsilosis* (24,4%) e *C. tropicalis* (15,3%).

Em outro estudo, realizado no Mato Grosso do Sul, entre dezembro de 1998 e outubro de 2006, foram analisados 25 isolados de casos de candidemia em neonatos internados na UCI, e foi observado que 44% das amostras eram *C. albicans*, 40% *C. parapsilosis*, 11% *C. tropicalis* e 4% *C. glabrata*; a mortalidade geral foi de 76% (Xavier et al., 2008).

França et al. (2008) realizaram um estudo transversal em hospital terciário do Paraná, observando, no período de três anos, 100 episódios de candidemia, dos quais 40 ocorreram em crianças, 80% delas com idade até quatro anos. Entre a população pediátrica, a maior frequência de isolamento foi de *C. albicans* (65%), seguida de *C. tropicalis* em 15% dos casos.

Motta et al. (2010), no ano de 2006, analisaram 136 casos de candidemia ocorridos no Hospital das Clínicas da FMUSP, e observaram

incidência de 1,87 casos por 1000 admissões; *C. albicans* foi a espécie mais isolada (52,2%), seguida por *C. parapsilosis* (22,1%), *C. tropicalis* (14,8%) e *C. glabrata* (6,6%). No mesmo hospital, Girão et al. (2008) realizaram um estudo nas UCIs, avaliando um período de sete anos, e observaram 108 episódios de candidemia: *C. albicans* foi a mais frequentemente isolada (40%), seguida por *C. tropicalis* (34%) e *C. parapsilosis* (18%). A taxa de mortalidade geral observada foi de 76%.

Em São Paulo, o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) realiza a captação de dados dos hospitais do Estado, sendo que o último boletim sobre infecções nosocomiais notificadas em 2009, demonstrou que *Candida* foi responsável por 6% dos micro-organismos isolados de hemoculturas em pacientes com infecção hospitalar (Assis et al., 2010).

A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP registrou que *Candida* spp. foram isoladas da corrente sanguínea de 16 pacientes internados nas diversas unidades da instituição nos anos de 2010 e 2011, sendo que o maior número de episódios ocorreu nas UCIs e no serviço de Cirurgia Infantil. As espécies mais isoladas foram respectivamente *C.albicans*, *C. parapsilosis* e *C.glabrata*. Esta última foi isolada somente dos pacientes cirúrgicos, que em sua maioria eram portadores de síndromes relacionadas ao trato gastro-intestinal (comunicação pessoal).

Nas UCIs neonatais, as infecções por *Candida* são causa frequente de sepse, variando de 4 a 15% em crianças com peso de nascimento < 1.500 g, e de 12 a 20% nas que pesam menos de 1.000 g; as taxas de mortalidade geral estão na ordem de 30 a 60% dos casos. A maior parte das infecções é causada por *C. albicans* e *C. parapsilosis*, mas nos últimos anos tem ocorrido

aumento na frequência de infecções por *C. tropicalis* (Huskins e Goldmann, 2004; Singhi et al., 2004; Celebi et al., 2007; Spiliopoulou et al.; 2012). Nos neonatos, particularmente os de baixo peso ao nascimento, episódios de meningite estão associados a mais de 50% dos casos de candidíase invasiva, acarretando elevadas taxas de mortalidade ou sequelas no desenvolvimento neurológico desses pacientes (Chapman, 2003).

Em estudo que avaliou dados sobre infecções de corrente sanguínea em 27 laboratórios hospitalares de cinco cidades colombianas no período de 2001 a 2007, observou-se que *Candida* spp. foram responsáveis por 5,2% das infecções em pacientes internados em UCIs, sendo *C. albicans* a mais isolada, seguida por *C. tropicalis*, enquanto *C. parapsilosis* foi a espécie mais isolada nas UCIs pediátrica e neonatal (Cortés et al., 2011). Estudo realizado na Índia por Awasthi et al. (2011) em pacientes pediátricos, mostrou que a maior frequência de isolamento foi de *C. tropicalis* (70,8%). Em outro estudo realizado por Celebi et al. (2012) em pacientes neonatais, observou-se maior frequência de *C. parapsilosis* (57,1%) nos casos de candidemia.

O conhecimento sobre a ocorrência das espécies de *Candida* em infecções hematogênicas permite avaliar a eficácia de novas terapias e planejar novas estratégias preventivas. A introdução dos triazólicos, na década de 1990, possibilitou uma nova opção de terapia contra infecções fúngicas sistêmicas. Desde então, particularmente o fluconazol tem sido amplamente utilizado, demonstrando eficácia tanto no uso terapêutico como na profilaxia. Na população pediátrica, o fluconazol é bem tolerado e vem demonstrando a mesma segurança terapêutica observada nos adultos, bem como a eficácia

como profilático em neonatos e crianças com risco elevado de infecção fúngica invasiva (Fridkin et al., 2006).

Nas doses usuais, o fluconazol tem ação fungistática, e o uso excessivo pode acarretar o aparecimento de resistência em espécies antes suscetíveis. *Candida glabrata* frequentemente demonstra resistência dose-dependente, e *C. krusei* é intrinsicamente resistente, graças a uma alteração na enzima alvo deste triazólico. Outra espécie que tem merecido atenção é a *C. lusitaniae*, com capacidade de desenvolver resistência induzida à anfotericina B. Assim, é de extrema importância a identificação da espécie de *Candida* para o direcionamento do tratamento, devido à diferença de suscetibilidade de cada espécie aos antifúngicos (Drago et al., 2004; McCrossan et al., 2007; Weitkamp et al., 2008; Méan et al., 2008).

Diversos estudos têm avaliado os fatores predisponentes às infecções invasivas por *Candida*, demonstrando através de análises multivariadas, que os fatores de risco independentes que favorecem o desenvolvimento de candidemias incluem: antibioticoterapia de amplo espectro, quimioterapia, neutropenia, colonização prévia por *Candida*, presença de cateter venoso central, nutrição parenteral, cirurgias do trato gastrointestinal e hemodiálise (Colombo e Guimarães, 2003; Ostrosky-Zeichner, 2003; Pfaller e Diekema, 2007; Zaoutis et al., 2010). Na população pediátrica, os recém-nascidos pré-termo, crianças submetidas a cirurgias de grande porte, e pacientes internados em UCIs constituem os grupos de maior risco (Maródi e Johnston Jr, 2007; Zaoutis et al., 2010).

1.2. Diagnóstico laboratorial

Sinais e sintomas de infecção hematogênica por *Candida* são muitas vezes inespecíficos. O desafio no diagnóstico das candidemias reside na identificação de pacientes de risco e no desenvolvimento de métodos laboratoriais que as identifiquem precocemente (Alexander e Pfaller, 2006).

O isolamento da levedura a partir do sangue é considerado padrão ouro para diagnóstico das candidíases invasivas. Entretanto, a positividade das culturas é estimada em torno de 30% a 60%, e em crianças prematuras, a sensibilidade pode ser ainda mais reduzida, devido à dificuldade em se obter volume de sangue adequado (Ellepola e Morrison, 2005; See, 2005; Zaoutis et al., 2010). Em geral, os resultados das culturas são obtidos somente após 72 horas, muitas vezes requerendo uma semana até a identificação da espécie. Esta demora pode ser crucial no caso de pacientes em estado crítico, particularmente naqueles que podem estar infectados com espécies de *Candida* resistentes aos triazólicos (Pfaller e Diekema, 2007).

A identificação fenotípica convencional, por isolamento (crescimento em ágar Sabouraud dextrose e meios cromogênicos), assimilação e fermentação de açúcares, em equipamentos semi-automatizados ou automatizados (API 20C AUX, ID 32C e Vitek® System), e teste do tubo germinativo, leva em torno de quatro dias (Ibelings et al., 2005; Liguori et al., 2007), havendo necessidade da utilização prévia de sistemas do tipo Bactec e BacT/Alert, que necessitam de 35,3 ± 18,1 horas para identificação de *C. albicans* e 80 ± 22,4 horas para *C. glabrata*, chegando a um total de cinco a oito dias para a liberação do resultado (Fernandez et al., 2009).

Testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos empregando diversos antígenos, entre os quais a manana e antígenos citoplasmáticos, têm sido empregados nas formas sistêmicas da infecção. Entretanto, apresentam limitações para o diagnóstico de pacientes com imunocomprometimento, além do valor preditivo positivo relativamente baixo, pela incapacidade de diferenciarem pacientes com doença sistêmica, colonizados ou com candidemia transitória. Ensaios com anticorpos monoclonais têm sido utilizados para a detecção de manana circulante; os kits comercialmente disponíveis apresentam bons níveis de especificidade, mas a sensibilidade fica em torno de 50% dos casos de candidemia comprovados (Erjavec e Verweij, 2002; Alexander e Pfaller, 2006; Pontón e del Palacio, 2007).

Atualmente vários grupos de pesquisa estão em busca de marcadores sorológicos para o diagnóstico de candidemia em pacientes que apresentam risco elevado para a infecção, entre os quais transplantados, pacientes onco-hematogênicos, pacientes submetidos a cirurgias de grande porte e neonatos de baixo peso. Detecção de β-D-glucana, manana e anticorpos anti-manana são os marcadores mais pesquisados e avaliados (Alam et al., 2007; Arendrup et al., 2010; Mokaddas et al., 2010; Nguyen et al., 2012).

Pelo fato de tais metodologias apresentarem limitações de sensibilidade ou de especificidade, os métodos moleculares podem ser utilizados como alternativa no diagnóstico das candidemias. O emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de *Candida* em amostras clínicas tem sido relatado em diversas publicações (Ahmad et al., 2002; White et al., 2005; Alam et al., 2007; Carvalho et al., 2007; Nguyen et al. 2012). O principal alvo para as amplificações são as regiões de sequências variáveis denominadas de

interspace regions (ITS) localizadas entre as sequências conservadas das porções 18S, 5.8S e 28S do DNA ribossomal de fungos. A vantagem da utilização destes alvos é que estão presentes em múltiplas cópias no genoma, aumentando ainda mais os níveis de sensibilidade dos testes (Iwen et al., 2002; Avni et al., 2011).

Diversos estudos sobre diagnóstico molecular de candidemias, empregando a PCR ou modificações desta técnica, entre as quais a *nested* PCR convencional, PCR multiplex ou PCR em tempo real, têm sido relatados (Molina e Tobo, 2004). Os resultados têm demonstrado seu potencial para detectar *Candida* em materiais clínicos, com sensibilidade e especificidade elevadas, quando comparadas aos métodos convencionais de diagnóstico, particularmente as hemoculturas (Chen et al., 2002; Ellepola e Morrison, 2005 Nguyen et al. 2012). Alguns estudos realizados com *semi-nested* ou *nested* PCR demonstraram que a técnica aumenta o poder de detecção do patógeno, além de permitir a identificação das espécies, pela utilização de *primers* específicos na segunda etapa da reação (Ahmad et al., 2002; Alam et al., 2007).

Em estudo realizado por Del Negro em 2008, a técnica de *nested* PCR foi empregada para detecção e identificação de cinco espécies de *Candida* em pacientes pediátricos com risco de desenvolver candidemia. Foram analisadas amostras de sangue de 58 pacientes internados na UTI do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, que apresentavam condições predisponentes para desenvolver infecção. A primeira amplificação identificou um fragmento da região ITS do DNA ribossômico de *Candida*, e a segunda etapa amplificou fragmentos espécie-específicos para *C. albicans*, *C. glabrata*,

C. parapsilosis, *C. tropicalis* e *C. krusei*, separadamente. As hemoculturas foram positivas em 15,5% dos pacientes, enquanto as amplificações por PCR detectaram DNA de *Candida* em 25,9% dos casos, incluindo todos os pacientes com culturas positivas, e a diferença foi estatisticamente significativa (p=0,031). Em dois pacientes, a PCR identificou mais de uma espécie infectante, o que não ocorreu pelas hemoculturas. Os resultados do estudo demonstraram que a técnica de PCR apresentou maior poder de detecção de *Candida* em amostras de sangue de pacientes com risco de desenvolver candidemia, quando comparada às hemoculturas. No estudo, o número de testes moleculares foi elevado, considerando-se que para cada amostra do paciente, foram utilizados sete diferentes sistemas de amplificação. Na discussão do trabalho, a autora propôs o emprego da PCR do tipo multiplex, que permitiria a detecção simultânea de espécies de *Candida*, com redução dos custos, possibilidade de análise para pequenas quantidades de DNA e ganho de tempo para o diagnóstico.

A técnica de PCR multiplex, entretanto, exige cuidados, particularmente no delineamento dos *primers*, pois estes não devem interagir entre si, devem possuir especificidade elevada e gerar amplificados de pesos moleculares diferentes, permitindo análise direta dos amplificados em géis de agarose. Além disso, não deve ocorrer perda de sensibilidade em relação às amplificações realizadas separadamente para cada espécie (Méndez-Alvarez e Pérez-Roth, 2004).

Carvalho et al. (2007) empregaram a PCR multiplex do tipo *semi-nested* para a identificação de oito espécies de *Candida* em diversos materiais clínicos, particularmente sangue, demonstrando elevada especificidade. O

método também apresentou bom nível de sensibilidade, pois foi capaz de detectar aproximadamente duas células fúngicas por ml de sangue.

A técnica de PCR em tempo real, que abriu novas perspectivas para o diagnóstico de infecções fúngicas, é baseada em reações do tipo multiplex, e tem demonstrado grande potencial para uso em rotina clínica, graças à elevada sensibilidade e especificidade, além de minimizar os riscos de contaminação (Pryce et al., 2003; Maaroufi et al., 2004; Innings et al., 2007). No entanto, o emprego rotineiro desta plataforma é ainda restrito pela falta de padronização e custos relativamente elevados (Lau et al., 2010).

Disponibilizar métodos laboratoriais de diagnóstico, mais rápidos e confiáveis, aos pacientes com risco de desenvolver infecções fúngicas, constitui ainda um desafio para profissionais da área da saúde. A detecção do patógeno em estágios iniciais da infecção e a identificação precisa da espécie são fundamentais para a introdução precoce e adequada da terapêutica, contribuindo para a redução da mortalidade atribuída à doença.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os métodos de cultivo empregados no diagnóstico das infecções causadas por *Candida* apresentam limitações de sensibilidade, além do tempo relativamente prolongado para a liberação de resultados. Para pacientes pediátricos internados em UCIs, particularmente neonatos, a dificuldade na obtenção de amostras sanguíneas em volumes adequados, prejudica ainda mais a sensibilidade das culturas. A técnica de *nested* PCR multiplex pode ser aplicada a pequenos volumes de sangue, permitindo diagnóstico mais rápido em relação às culturas, bem como a identificação precisa das espécies de *Candida*.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Validar e empregar a técnica de *nested* PCR multiplex para a detecção molecular de sete espécies de *Candida*, em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos internados em UCIs, comparando os resultados com os isolamentos obtidos a partir das hemoculturas.

3.2. Específicos

3.2.1. Selecionar da literatura e/ou delinear *primers* para a identificação molecular das espécies: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. pelliculosa*.

3.2.2. Determinar os limiares de detecção e a especificidade dos sistemas de amplificação da técnica de *nested* PCR multiplex;

3.2.3. Empregar a *nested* PCR multiplex em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos com risco de desenvolver candidemia;

3.2.4. Verificar a concordância entre os resultados obtidos pelas hemoculturas e pela *nested* PCR multiplex, em relação à detecção do patógeno e à identificação das espécies de *Candida*.

3.2.5. Avaliar o custo da técnica de *nested* PCR multiplex para a detecção e identificação das espécies de *Candida* em amostras sanguíneas, comparando ao custo das hemoculturas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP - Protocolo n° 0426/10 (**Anexo A**) e Comissão de Pesquisa e Ética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/UNESP) – Protocolo n° 087/2010.

4.1. Pacientes

Foram analisadas amostras sanguíneas de pacientes internados na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal (UCINE) e na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTI) do Instituto da Criança (ICr) do HC-FMUSP, e de pacientes neonatos da UCI do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/UNESP). Como grupo controle, foram utilizadas amostras sanguíneas obtidas de crianças atendidas na Clínica de Cirurgia Pediátrica do ICr-HCFMUSP.

Todas as coletas foram realizadas com a concordância dos pais e/ou responsáveis, com assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecido (**Anexos B e C**).

4.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

No estudo, foram incluídos pacientes internados em UCIs, que apresentavam síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e/ou dois ou mais fatores de risco para desenvolver fungemia (doenças de base imunossupressoras, doenças malignas, cirurgias de grande porte, transplantes, antibioticoterapia de amplo espectro por mais de 72 horas, presença de cateter

venoso central, quimioterapia, nutrição parenteral, ventilação mecânica, entre outros).

Foram excluídos os pacientes cujas coletas não foram realizadas simultaneamente para hemoculturas e PCR, e/ou que estavam recebendo terapia antifúngica há mais de 48 horas no momento das coletas; e ainda quando o período entre as coletas e o processamento das amostras sanguíneas, mantidas em geladeira, foi maior do que cinco dias.

4.1.2. Pacientes internados nas UCIs

Este grupo foi constituído por 14 neonatos e 30 pacientes com idade entre um mês e 16 anos, mantidos nas UCIs do ICr-HC-FMUSP; e 10 neonatos internados na UCI do Hospital de Base da FAMERP. Um a dois mililitros de sangue foram assepticamente coletados para as hemoculturas em balões Bactec Péds Plus/F (Becton Dickinson), e o mesmo volume foi simultaneamente coletado em tubos com EDTA para a realização da técnica de PCR.

4.1.3. Grupo controle

Vinte e oito crianças atendidas na Clínica de Cirurgia Pediátrica do ICr-HC-FMUSP, para a realização de pequenas cirurgias, tais como correção de fimose, hérnia umbilical ou inguinal, etc., sem risco de desenvolver infecção fúngica, foram incluídas no estudo como grupo controle. As coletas de sangue para a PCR foram realizadas no mesmo momento das coletas para a realização de hemogramas e coagulogramas, solicitados pela equipe cirúrgica como exames pré-operatórios. Neste grupo não foram realizadas coletas para hemoculturas.

4.2. Amostras de sangue para realização das hemoculturas

As hemoculturas dos pacientes internados no ICr foram realizadas no Setor de Microbiologia da Divisão do Laboratório Central (DLC) do HC-FMUSP. Os balões de cultura Bactec Péds Plus/F (Becton Dickinson) foram incubados no equipamento Bactec^{TM} série 9000, e as leveduras, quando isoladas, foram identificadas pelo sistema Vitek®2 (bioMérieux). Os resultados das hemoculturas foram obtidos através de consulta ao sistema eletrônico de informação hospitalar (SIGH) da DLC.

Para os pacientes do Hospital de Base da FAMERP, as hemoculturas foram realizadas pela mesma metodologia.

4.3. Extrações de DNA das amostras sanguíneas dos pacientes

Após as coletas, as amostras foram mantidas em geladeira e recolhidas pela equipe do laboratório no mesmo dia; quando as coletas foram realizadas nos finais de semana, as amostras de sangue ficaram armazenadas na geladeira até o início da semana seguinte.

No total, foram processadas 55 amostras de 54 pacientes, pois de um paciente foram obtidas duas amostras de sangue, com intervalo de mais de um mês entre as coletas, tendo sido consideradas como amostras diferentes.

As extrações de DNA foram realizadas de acordo com a técnica descrita por Löeffler et al. (1997), com algumas modificações.

O volume de sangue coletado foi transferido para tubos tipo Falcon de 15 ml e foram acrescentados 13 ml de tampão *blood lysis* 1x (NH_4Cl 155 mM; $KHCO_3$ 10 mM; EDTA 1 mM; pH 7,4). Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos, para acelerar a lise das hemácias. Após este período, os

tubos foram retirados do gelo e centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos à 4°C em centrífuga refrigerada (RT6000D, Sorvall). O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com auxílio de pipeta Pasteur descartável. Aos tubos, foram acrescentados mais 5 ml de solução de *blood lysis* 1x, submetidos à agitação cuidadosa por alguns segundos em agitador tipo vórtex, e novamente centrifugados a 3.000 rpm por 5 min à 4ºC. O sobrenadante foi retirado e, ao *pellet* de células, foi acrescentado 1 ml de tampão *nucleo lysis* 1x (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 0,4 mM; EDTA 2 mM). Os tubos foram então vigorosamente agitados em vórtex, para romper as membranas celular e nuclear, e liberar as leveduras presentes na amostra. Em seguida, a mistura foi transferida para dois microtubos de 1,5 ml, com auxílio de pipeta Pasteur, em volumes de cerca de 500µl em cada um. Aos tubos foram adicionados 250 U/ml da enzima liticase (L-4276, Sigma) e 2% de β-mercaptoetanol (Merck), e os mesmos foram mantidos em banho seco à 37ºC por 2h30min. Após incubação, os microtubos foram centrifugados a 13.800 rpm por 20 minutos à 4°C, em centrífuga refrigerada (5804R, Eppendorf). Os sobrenadantes foram retirados com auxílio de micropipeta. As etapas a seguir foram realizadas utilizando-se o *QIAamp® DNA Mini kit* (Qiagen), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Sobre o *pellet* foram pipetados 180 µl da solução *ATL* e 20 µl de proteinase K 20 mg/ml (Sigma). Os tubos foram agitados vigorosamente por 1 minuto e incubados à 56ºC por 15 minutos em banho seco. Após incubação, foram adicionados 200 µl da solução *AL* e os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos em vórtex; em seguida, foram incubados à 70ºC por 10 minutos. Foram acrescentados 200 µl de etanol absoluto (Merck), os tubos foram agitados por 15 segundos em vórtex e os conteúdos foram

pipetados nos tubos contendo “colunas” para retenção do DNA. Estes tubos foram então submetidos à centrifugação a 8.000 rpm por 1min à 4°C; foram realizadas duas lavagens com as soluções *Wash* 1 e *Wash* 2 com centrifugação à 8.000 e 13.800 rpm, respectivamente para cada uma das lavagens. Em seguida, foram acrescentados 100 µl de solução *AE*, os tubos foram mantidos por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugados novamente a 8.000 rpm por 1 min à 4°C. Os eluatos contendo o DNA foram coletados para microtubos limpos, que foram devidamente identificados com o número da amostra e iniciais do nome do paciente. A determinação da concentração de DNA das amostras foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo), com leituras a 230, 260 e 280 nm. O material foi mantido a -20°C até o momento do uso.

4.4. Extrações de DNA das amostras sanguíneas do grupo controle

As extrações foram realizadas pela metodologia proposta por Miller et al. (1988). Os volumes de sangue coletados (2 a 3 ml) foram adicionados a tubos tipo Falcon de 15 ml e acrescentou-se solução *blood lysis* 1x até completar o volume de 14 ml; os tubos foram incubados por 30 minutos em banho de gelo para promover a lise das hemácias. Os tubos foram então centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm à 4◦C (RT6000D). O sobrenadante foi desprezado e foram acrescentados mais 5 ml de *blood lysis* 1x ao *pellet* de células, centrifugando-se novamente à 4◦C por 5 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado e acrescentou-se 3 ml de solução *nucleo lysis* 1x agitando em vórtex para promover a lise celular e nuclear. Foram então adicionados 10 µl de proteinase K 20mg/ml (Sigma) e 300 µl de SDS a 10% (Sigma). A solução foi

misturada por inversão e os microtubos incubados a 37°C *overnight*. Após a incubação, adicionou-se 1 ml de solução saturada de NaCl 6 M, agitou-se vigorosamente por 30 segundos e o material foi centrifugado por 20 minutos a 2.500 rpm à 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Falcon de 15 ml e foram adicionados cerca de 8 ml (duas vezes o volume de material) de etanol absoluto (Merck). Homogeneizou-se por inversão para promover a precipitação do DNA, o precipitado foi retirado com o auxílio de uma ponteira e transferido para um microtubo de 1,5 ml. Para retirar o excesso de NaCl, realizou-se uma lavagem com 500 µl de etanol 70% e posterior centrifugação a 13.800 rpm por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo foi submetido à centrifugação à vácuo (miVac Duo concentrator, Genevac) para evaporação completa do etanol 70%. Após essa etapa, foram adicionados ao precipitado de DNA, de 100 a 400 µl de tampão TE (Tris-EDTA 0,1M), na dependência do *pellet* de DNA obtido. A determinação da concentração de DNA das amostras foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 1000, nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

4.5. PCR universal para DNA genômico humano

Todas as amostras de DNA obtidas dos pacientes e das crianças do grupo controle foram submetidas às reações de PCR que amplificam um fragmento do gene da proteína β-actina humana.

As amplificações para β-actina tiveram por objetivo assegurar que as amostras de DNA extraídas estivessem em condição de serem amplificadas, ou seja, sem fragmentações ou presença de inibidores da PCR (Del Negro,

2008). Estas reações foram realizadas em volume total de 25 µl de solução, contendo tampão da enzima 1x (Invitrogen), 200 µM de dNTP (GE Healthcare), 0,4 µM dos *primers* β1 (5'-GTGGGCGCCCCAGGCACCA-3') e β2 (5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'), 1,5 mM de $MgCl_2$; 1,25 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA obtidos das amostras de sangue. As condições de amplificação foram: denaturação inicial de 5 minutos à 95ºC, seguida de 35 ciclos de 1 minuto à 95ºC, 1 minuto à 45ºC e 1 minuto à 72ºC, com extensão final de 5 minutos à 72ºC, em termociclador (Veriti, Applied Biosystems).

Os resultados foram observados após eletroforese dos amplificados, conforme metodologia descrita no item 5.4.1.

4.6. Extrações de DNA dos protótipos de *Candida* spp. e PCR universal para fungos

As cepas de *Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis*, *C. krusei, C. pelliculosa* e *C. lusitaniae* empregadas no estudo foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC*)* e estavam armazenadas, sob congelamento a -80°C, na coleção de culturas de fungos do Laboratório de Micologia Médica (LIM-53) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/USP.

Para o estudo, as cepas foram descongeladas e semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco); após crescimento em cultura (48 horas), as leveduras foram semeadas em *CHROMagar Candida Medium* (Becton Dickinson) para a verificação da pureza das colônias.

As extrações de DNA foram realizadas a partir da suspensão das leveduras contendo 10^6 células/ml, de acordo com a metodologia descrita por

Van Burik et al. (1998), com algumas modificações: 1 ml da suspensão foi submetido à centrifugação a 13.500 rpm por 10 minutos, e ao *pellet* de células foram adicionados 600 µl de uma solução contendo 50 mM TRIS, 10 mM EDTA, 250 U/ml de liticase (L4276, Sigma) e 2% de β-mercaptoetanol (Merck). Os tubos foram mantidos à 37ºC por 2h30min para a digestão da parede celular. Foram adicionados à suspensão dos esferoplastos, 0,2% de dodecilsulfato de sódio (Sigma) e 200 µg/ml de proteinase K (Sigma), e os tubos mantidos à 65ºC por 45 minutos para lise nuclear e digestão proteica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes transferidos para tubos limpos. Para a precipitação do DNA, acrescentou-se isopropanol (Merck) v/v, e as amostras foram mantidas à -20ºC por uma noite. Após centrifugação a 13.500 rpm por 20 minutos, foram adicionados ao *pellet* contendo o DNA, 500 µl de etanol a 70% e os tubos foram novamente centrifugados a 13.500 rpm por 5 minutos. O *pellet* final de DNA foi solubilizado em solução de Tris-EDTA. As concentrações de DNA obtidas destas extrações foram determinadas por espectrofotometria a 230, 260 e 280 nm em Nanodrop 1000.

Em seguida aos procedimentos de extração, foram realizadas as PCR com *primers* universais para fungos (Luo e Mitchell, 2002): ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Foram preparados 25 µl de solução contendo tampão da enzima, 200 µM de dNTP; 0,4µM de cada um dos *primer*s ITS1 e ITS4; 1,5 mM de $MgCl_2$, 1,25U da enzima *Taq* DNA polimerase e 1 ng de DNA das cepas de *Candida*. As condições de amplificação foram: denaturação inicial de 5 minutos à 95ºC, seguida de 30 ciclos de 1 minuto à 95ºC, 1 minuto à 50ºC e 1 minuto à 72ºC,

com extensão final de 5 minutos à 72ºC, em termociclador Veriti. A visualização dos resultados da PCR universal para fungos foi realizada conforme descrição no item 5.4.1.

4.7. Sistemas e condições de amplificação da *nested* PCR multiplex para as amostras de DNA dos pacientes do estudo

A metodologia de *nested* PCR multiplex consistiu em duas etapas de amplificação. Na primeira foram utilizados os *primers* ITS1 e ITS4; e na segunda etapa, foram utilizados dois sistemas de amplificação com *primers* para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, já utilizados anteriormente por outros autores (Bougnoux et al.,1999; Luo e Mitchell, 2002). Para *C. lusitaniae* e *C. pelliculosa*, os *primers* foram delineados no presente estudo, com o auxilio dos programas PrimerQuest^{SM}, ClustalW2 e Primer-BLAST. A utilização destes programas também possibilitou a verificação de possíveis ligações, de todos os *primers* selecionados para o estudo, com sequências gênicas de outros gêneros e espécies de fungos (*Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp.), bem como de bactérias frequentemente isoladas em episódios de sepse em pacientes pediátricos (*Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Streptococcus pyogenes, S. pneumoniae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Na **Tabela 1**, estão descritos os *primers* e respectivos tamanhos dos amplificados, utilizados nos sistemas de amplificação da *nested* PCR multiplex.

Tabela 1: *Primers* utilizados nas amplificações pela *nested* PCR multiplex

Primers	Sequência (5'⟶3')	Amplificado	Referências
ITS1/4	F- TCCGTAGGTGAACCTGCGG R- TCCTCCGCTTATTGATATGC	variável	Luo e Mitchell, 2002
CALB1/2	F- TTTATCAACTTGTCACACCAGA R- ATCCCGCCTTACCACTACCG	272pb	Luo e Mitchell, 2002
CGL1/2	F- TTATCACACGACTCGACACT R- CCCACATACTGATATGGCCTACAA	423pb	Luo e Mitchell, 2002
CTR1/2	F- CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT R- TGGCCACTAGCAAAATAAGCGT	357pb	Luo e Mitchell, 2002
CPAR3/2	F- GCCAGAGATTAAACTCAACCAA R- CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC	297pb	Luo e Mitchell, 2002
CKR2/3	F- ACTACACTGCGTGAGCGGAA R- ACTACACTGCGTGAGCGGAA	362pb	Bougnoux et al.,1999
CLU1/2	F- GCGATACGTAGTATGACTTGCAG R- GATATTTCGGAGCAACGCCTAACC	137 pb	*
CPEL F/R	F-GAACTTTGCTTTGGGTGGTGAG R- CTTCATCGTTGCGAGAACCAAG	160 pb	*

F = *forward*; R = *reverse*; CALB = *C. albicans*; CGL = *C. glabrata*; CTR = *C. tropicalis*; CPAR = *C. parapsilosis;* CKR = *C. krusei;* CLU = *C. lusitaniae;* CPEL = *C. pelliculosa*
***** = *primers* delineados no estudo; pb=pares de base

Na primeira etapa de amplificação, foram preparados 25 µl de solução contendo tampão da enzima 1x (Invitrogen); 200 µM de dNTP; 0,2 µM dos *primers* ITS1 e ITS4; 1,5 mM de $MgCl_2$; 1,25 unidades da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA total das amostras sanguíneas. As condições de amplificação foram: denaturação inicial de 5 minutos à 95ºC, seguida de 35 ciclos de 45 segundos à 95ºC, 45 segundos à 50ºC e 45 segundos à 72ºC, com extensão final de 5 minutos à 72ºC, em termociclador Veriti.

A segunda etapa de amplificação foi idealizada para dois sistemas diferentes, considerando-se a necessidade de diferenciar as espécies de *Candida* através dos diferentes tamanhos dos amplificados analisados em géis de agarose. O sistema 1 foi composto por *primers* de *C. albicans* (CALB), *C. tropicalis* (CTR), *C. glabrata* (CGL) e *C. lusitaniae* (CLU); e o sistema 2, por

primers de *C. pelliculosa* (CPEL), *C. parapsilosis* (CPAR) e *C. krusei* (CKR) (**Tabela 1**).

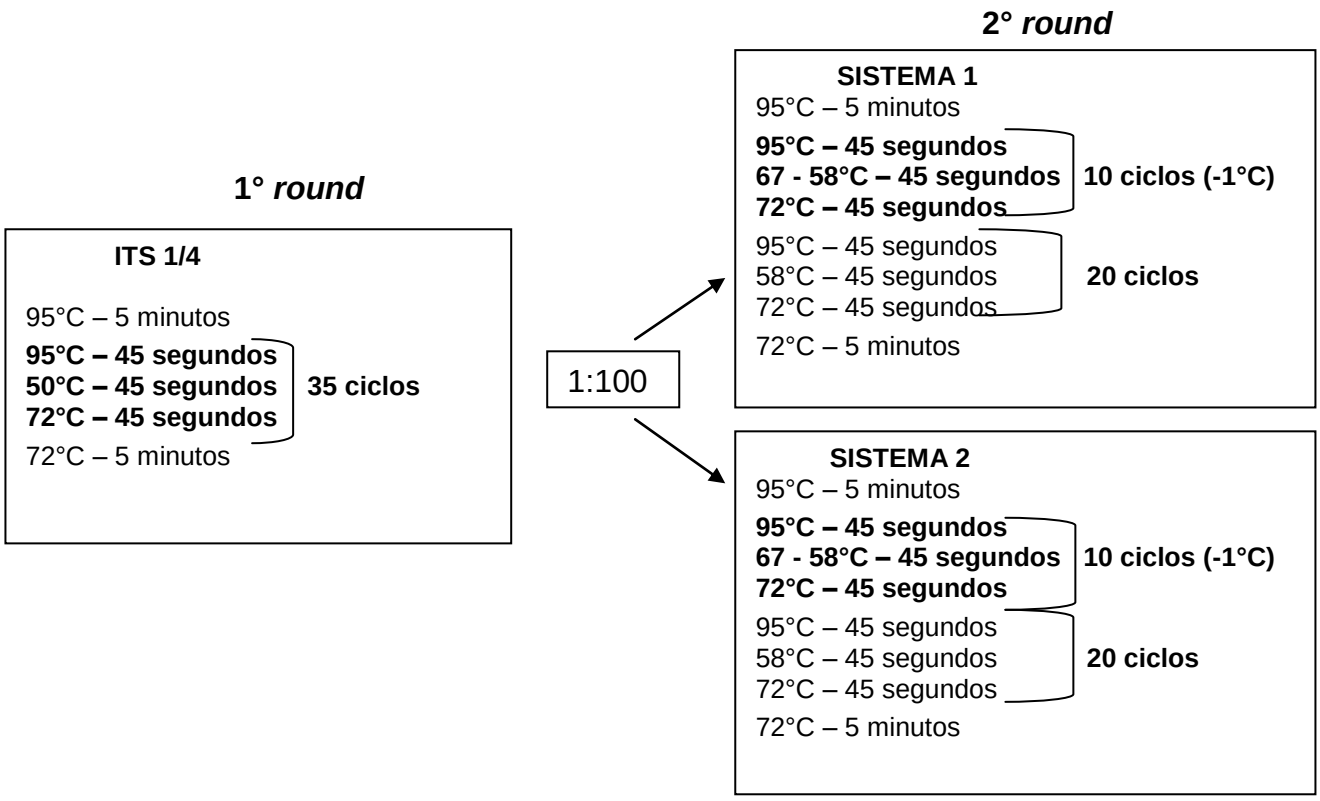
Em relação à concentração dos *primers* na mistura de reagentes, os testes foram iniciados com concentrações equimolares (0,4 µM), mas durante a padronização das condições de amplificação, essas foram sendo ajustadas. Para o sistema 1, contendo os *primers* CALB, CTR, CGL e CLU, ficaram definidas as concentrações de 0,20 µM; 0,12 µM; 0,30 µM e 0,10 µM, respectivamente. Já para o sistema 2, as concentrações de 0,20 µM; 0,12 µM e 0,15 µM foram definidas para CKR, CPEL e CPAR, respectivamente.

Para os dois sistemas (1 e 2) da segunda etapa de amplificação, foram avaliadas diferentes composições da mistura de reagentes, adicionando-se aos demais componentes, substâncias como glicerol (Sigma), soro albumina bovina (BSA, Sigma) e dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) em diferentes concentrações, com o intuito de melhorar a especificidade e eficiência das amplificações.

Após diversos experimentos, definiu-se a composição dos reagentes de ambos os sistemas, conforme descrito a seguir: foram preparados 25 µl de solução contendo tampão da enzima 1x, 200 µM de dNTP; *primers* nas concentrações determinadas; 1,5 mM de $MgCl_2$; 1,25 unidades da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase, 5% de DMSO (Merck), e foram adicionados 2 µl do produto da primeira amplificação, diluídos a 1:100 (Sambrook e Russell, 2001).

As condições de amplificação foram definidas, utilizando-se o sistema *touchdown* (Roux, 2009): denaturação inicial de 5 minutos à 95ºC, seguida de 10 ciclos de 45 segundos à 95ºC, 45 segundos à 67-58ºC (temperatura decrescente de 1°C por ciclo) e 45 segundos à 72ºC, seguidos de 20 ciclos de

45 segundos à 95ºC, 45 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C, com extensão final de 5 minutos à 72ºC, em termociclador Veriti (**Esquema 1).**



Esquema 1. Sistemas de amplificação da *nested* PCR multiplex; (-1°C) = decréscimo de 1°C de temperatura a cada ciclo (*touchdown*)

4.8. Avaliação do limiar de detecção de DNA de *Candida* spp. pela *nested* PCR multiplex

Foram utilizadas as mesmas condições de reação descritas no item 4.7, aplicando-se 50 ng de DNA humano extraído de sangue de indivíduo hígido, misturados a diluições de DNA das espécies de *Candida*, de 1,5 nanograma até atingir 15 fentogramas.

4.9. Avaliação da especificidade das PCR em relação a outros agentes de infecção hematogênica e entre as espécies de *Candida*

Após determinação do limiar de detecção, foi avaliada a especificidade da técnica, para se verificar a possibilidade de reações cruzadas com agentes bacterianos (*S. aureus, S. epidermidis, S. pyogenes, E. coli, E. faecalis, P. aeruginosa*), com outros gêneros de fungos (*Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp.) e outras espécies de *Candida* (*C. famata*, *C. kefyr* e *C. guilliermondii*). As extrações de DNA desses isolados de fungos foram realizadas conforme protocolo descrito no item 4.6.

Para as extrações de DNA das bactérias foi utilizado o *QIAmp® DNA mini kit*, conforme protocolo recomendado pelo fabricante e descrito a seguir.

4.9.1. Extrações de DNA das bactérias Gram negativas e Gram positivas

Para as bactérias Gram negativas, 1 ml de uma suspensão com 10^6 células foi centrifugada a 7.500 rpm por 10 minutos e, ao *pellet* de células foram adicionados 180 µl de solução *ATL*, agitando-se vigorosamente em vórtex. Foram adicionados 20 µl de proteinase K 20 mg/ml (Sigma), os tubos foram novamente agitados em vórtex e incubados à 56°C por 1 hora, agitando-se os tubos ocasionalmente. Em seguida, foram adicionados 200 µl de solução *AL*, os tubos foram agitados em vórtex por 15 segundos e incubados à 70°C por 10 minutos. Adicionou-se 200 µl de etanol absoluto à mistura, e os tubos foram novamente agitados em vórtex. Cuidadosamente, pipetou-se a mistura em tubos contendo “colunas” para a retenção do material genômico, e centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto. Ao material absorvido na coluna,

foram adicionadas soluções de lavagem *Wash* 1 e *Wash* 2 e, em seguida foram adicionados 200 µl do B*uffer* AE para eluição do DNA; após 5 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto.

Para as bactérias Gram positivas preparou-se uma suspensão em 1 ml de água estéril e centrifugou-se a 7.500 rpm por 10 minutos. Ao *pellet* de células, foram adicionados 180 µl de solução de lisozima 20 mg/ml em solução contendo Tris-HCl 20 mM pH 8,0; 2 mM de EDTA e 1,2% de Triton® (Baker Chemical). Os tubos foram incubados por 30 minutos à 37°C. Em seguida, adicionaram-se 20 µl de proteinase K 20 mg/ml e 200 µl de solução *AL.* Os tubos foram agitados rapidamente no vórtex e incubados à 56°C por 30 minutos, e depois à 95°C por 15 minutos. A partir desta etapa, passou-se a seguir o mesmo protocolo utilizado para as bactérias Gram negativas.

As concentrações de DNA obtidas destas extrações foram determinadas por espectrofotometria em comprimentos de 230, 260 e 280 nm em Nanodrop 1000.

4.9.2. Amplificações das amostras de DNA de bactérias e de outros fungos com *primers* universais

As amostras de DNA extraídas das bactérias foram submetidas às PCR com *primers* que amplificam uma sequência da região 16S do DNA ribossomal (F: 5'-CGTAAGGGCCATGATGACT-3' e R: 5'- CAGCTCGTGTCGTGAGATGT-3'). Para as amplificações, foram preparados 25 µl de solução contendo tampão da enzima 1x; 200 µM de dNTP; 0,5 µM dos *primers*; 1,5 mM de $MgCl_2$; 1,25U da enzima *Taq* DNA polimerase e 1 ng de DNA das bactérias. As condições de amplificação foram: denaturação inicial de 5 minutos à 95ºC,

seguida de 40 ciclos de 30 segundos à 95ºC, 30 segundos à 53ºC e 1 minuto à 72ºC, com extensão final de 10 minutos à 72ºC, em termociclador Veriti.

Com o mesmo objetivo, as amostras de DNA de outros fungos e de outras espécies de *Candida* foram submetidas às amplificações com os *primers* ITS 1 e ITS4, conforme descrito no item 4.6.

Uma vez verificada a qualidade dessas amostras de DNA, as mesmas foram então submetidas à *nested* PCR multiplex, nas mesmas condições descritas no item 4.7, adicionando-se aos tubos de reação 1 ng de DNA de cada micro-organismo. Além desses testes, também foi verificada a possibilidade de reatividade cruzada entre as sete espécies de *Candida* envolvidas no estudo.

4.10. Detecção dos materiais amplificados nas reações de PCR

A detecção dos amplificados foi realizada em géis de agarose (Invitrogen) na concentração de 2% para as reações de PCR universais (β-actina, ITS e 16S), e a 2,5% para as reações de *nested* PCR. As eletroforeses foram realizadas em cubas horizontais Horizon H-58 (Life Technologies), em tampão TAE 1x (TRIS-ácido acético-EDTA pH 8,0), a 80V por 45 minutos Após eletroforese, os géis foram corados com GelRed™ (Biotium), e os resultados registrados em sistema de fotodocumentação (UVITEC).

4.11. Sequenciamento automatizado dos produtos de PCR das amostras clínicas

Para os casos em que as amostras de DNA de pacientes resultaram positivas em algum dos dois sistemas de amplificação, mas os resultados das hemoculturas foram negativos, os produtos das PCR foram sequenciados no equipamento *ABI 3730 DNA Analyser* (Applied Biosystems).

Após eletroforese dos amplificados obtidos nos sistemas 1 e/ou 2, as bandas visualizdas nos géis foram “recortadas” com auxílio de bisturi, e transferidas para microtubos de 1,5 ml. Os fragmentos foram submetidos à purificação pelo kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), de acordo com protocolo do fabricante. Em seguida, os produtos purificados foram quantificados em gel de agarose a 2%, comparando-se a intensidade das bandas com o marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

Para as reações de sequenciamento, aproximadamente 100 ng dos purificados e 2,5 µl dos *primers foward* e *reverse* a 5 µM, em tubos separados, foram enviados ao Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP.

As sequências foram analisadas, com auxílio do *software Sequence Scanner* v1.0 (Life Technologies) e foram alinhadas pelo programa ClustalW2. As sequências nucleotídicas consenso obtidas foram comparadas às sequências de cepas de *Candida* de referência, disponíveis no *GenBank*, com o auxílio do programa BLAST.

4.12. Controle dos processos de amplificação e dos riscos biológicos

Para diminuir os riscos de contaminação das reações de dupla amplificação de PCR, foram utilizados espaços físicos diferentes para cada etapa do processo (preparo dos reagentes, extração das amostras clínicas e reações de amplificação). Também foram empregados materiais descartáveis “DNase” e “RNase-free”, além de micropipetas, aventais e luvas descartáveis específicos de cada uma das áreas físicas. Para evitar a utilização do brometo

de etídeo, optou-se pelo uso do corante GelRed™ (Biotium), que é não-citotóxico e não mutagênico nas concentrações utilizadas na coloração dos géis.

4.13. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SPSS ("Statistical Package for the Social Sciences") – versão 13.0.

A concordância entre os resultados obtidos pelas duas técnicas (PCR e hemoculturas) foi avaliada pelo teste de McNemar (Kirkwood, 1988), adotando-se o nível de significância de 5%.

4.14. Cálculo e comparação de custos entre a *nested* PCR multiplex e as hemoculturas

O custo total do teste de hemocultura para isolamento e identificação de *Candida* em amostras sanguíneas foi calculado pela equipe do Setor de Microbiologia da DLC-HCFMUSP, considerando-se apenas os custos envolvidos na aquisição dos materiais utilizados para as análises: balões de hemocultura Bactec, *Chromagar® Candida* e demais materiais envolvidos na identificação das leveduras pelo sistema Vitek™2.

Para o cálculo dos custos da técnica de PCR multiplex foram considerados os valores dos materiais empregados para a realização de todas as etapas, desde o processamento da amostra de sangue até a detecção do material amplificado. Para efeito de comparação com o custo da hemocultura, foram calculados os custos da PCR multiplex realizada com apenas uma amostra de sangue e com 10 amostras analisadas simultaneamente.

Os valores finais dos custos, tanto para a hemocultura como para a PCR multiplex, não incluíram custos indiretos (mão de obra, estrutura física,

aquisição de equipamentos, etc.), mas em ambos os casos, 20% do valor foi acrescido ao custo final, considerando-se a possibilidade de repetição dos testes.

5. RESULTADOS

5.1. Dados demográficos e condições clínicas dos pacientes

Dos 54 pacientes incluídos no estudo, 32 eram do sexo masculino e 22 do sexo feminino, com idade variando de seis dias a 16 anos. Quarenta e quatro pacientes apresentavam síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Todos os pacientes recebiam antibioticoterapia há mais de 72 horas no momento das coletas para as hemoculturas e para as PCR; 49 utilizavam cateter venoso central, e 38 receberam terapia antifúngica, principalmente fluconazol, após a suspeita de infecção por *Candida*. As condições clínicas, fatores de risco, resultados das hemoculturas e das PCR, bem como a evolução dos pacientes estão descritos nos **Anexos D1 e D2**.

5.2. Avaliação das amostras de DNA obtidas dos pacientes e do grupo controle

As 55 amostras de DNA extraídas dos 54 pacientes, e as 28 amostras das crianças do grupo controle, amplificaram pelas reações de PCR para o gene da β-actina humana, demonstrando ausência de inibidores nessas amostras e integridade do material genômico **(Figura 1)**.

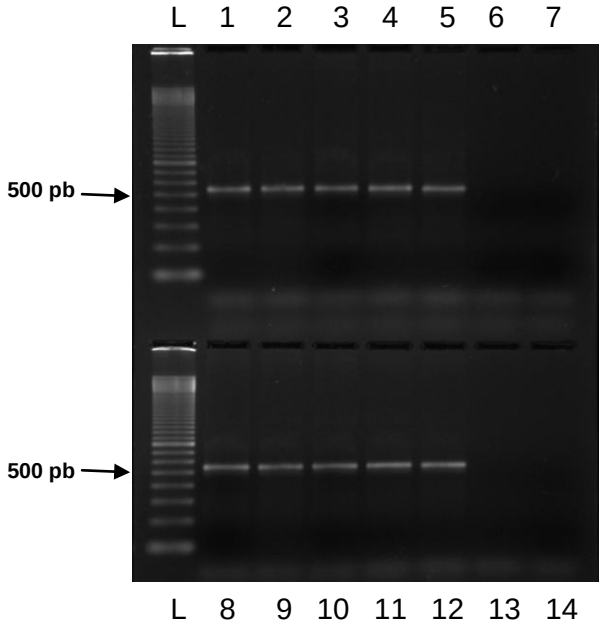


Figura 1. Gel de agarose a 2% mostrando amplificações das amostras de DNA de pacientes (1 a 4) e do grupo controle (8 a 11) para o gene da β-actina humana (540pb); 6, 7, 13 e 14 = controles negativos (salas de preparo de reagentes e de extração); 5 e 12=controles positivos L= marcador de peso molecular de 100pb (GE Healthcare)

5.3. Avaliação das amostras de DNA dos protótipos de *Candida* spp. e dos outros micro-organismos

Após a extração de DNA dos protótipos de *Candida* e dos outros micro-organismos, as amostras foram submetidas às reações de PCR para as regiões 16S e ITS, observando-se bandas de amplificação específicas e ausência de inibidores nas mesmas **(Figuras 2** e **3)**.

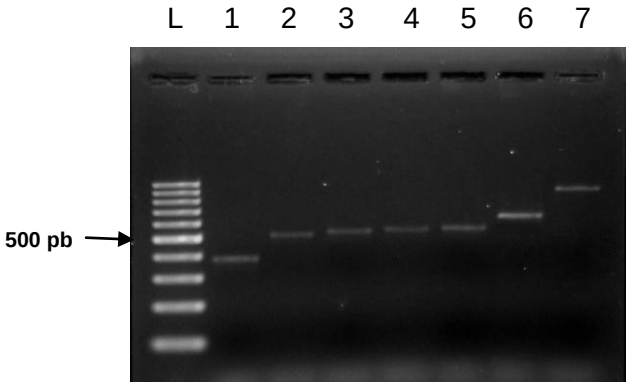


Figura 2. Gel de agarose a 2,5% mostrando amplificações dos sete protótipos de *Candida* com os *primers* ITS1/ITS4. 1 (*C. lusitaniae* ~ 383pb); 2 (*C. krusei* ~ 510pb), 3 (*C. parapsilosis* ~ 520pb); 4 (*C. tropicalis* ~ 526pb); 5 (*C. albicans* ~ 537pb); 6 (*C. pelliculosa* ~ 618pb); 7 (*C. glabrata* ~ 881pb); L= marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

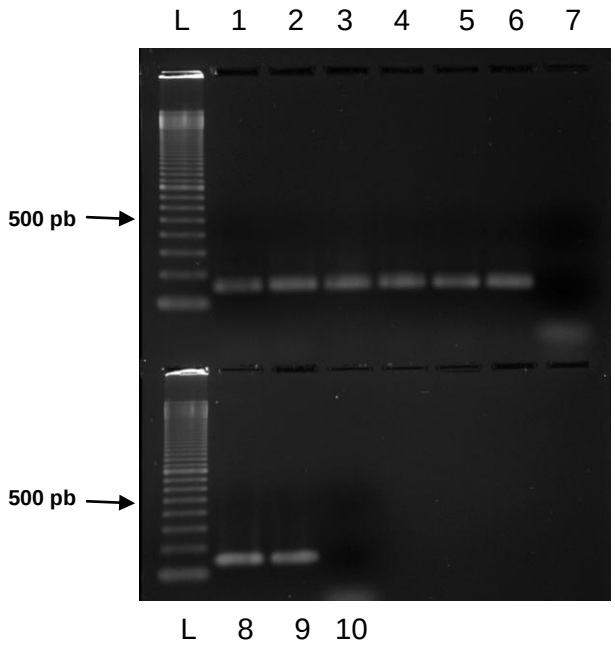


Figura 3: Gel de agarose a 2,5% mostrando amplificados (149 pb) após PCR com *primers* 16S. 1 (*S. aureus*); 2 (*S. epidermidis);* 3 (*S. pyogenes)*; 4 (*S.pneumoniae*); 5 (*S. agalactiae*); 6 (*E. coli)*; 8 (*E. faecalis*); 9 (*P. aeruginosa*); 7 e 10 (controles negativos); L= marcador de peso molecular de 100 pb (GE Healthcare)

5.4. Seleção dos *primers* e condições de amplificação da *nested* PCR multiplex

Após análises *in silico*, realizadas com os programas *PrimerQuest* e *PrimerBlast*, foram definidos os *primers* para *C. lusitaniae* e *C. pelliculosa* **(Tabela 2)**.

Tabela 2: *Primers* delineados no estudo através de análise *in silico*

Primers	**Sequência (5' ⟶ 3')**	**Amplificado**
CLU 1/2	F- GCGATACGTAGTATGACTTGCAG	137 pb
	R- GATATTTCGGAGCAACGCCTAACC	
CPEL F/R	F-GAACTTTGCTTTGGGTGGTGAG	160 pb
	R- CTTCATCGTTGCGAGAACCAAG	

As condições das reações para a *nested* PCR multiplex que forneceram a melhor eficiência de amplificação, com especificidade e reprodutibilidade de resultados foram as descritas no item 4.7 e demonstradas no **Esquema 1**.

Das substâncias adjuvantes (glicerol, BSA e DMSO) que foram adicionadas aos componentes de reação, a selecionada para compor a mistura

de reagentes foi o DMSO na concentração de 5%, pois permitiu obter resultados mais específicos, com melhor eficiência das amplificações.

5.5. Determinação do limiar de detecção da *nested* PCR multiplex

O limiar de detecção observado para cada uma das sete espécies de *Candida* foi de aproximadamente 150 fg de DNA (**Figura 4**). Este valor corresponde a cerca de quatro equivalentes genômicos de *Candida*, pois 37 fentogramas é o valor aproximado de um genoma da levedura (Riggsby et al., 1982).

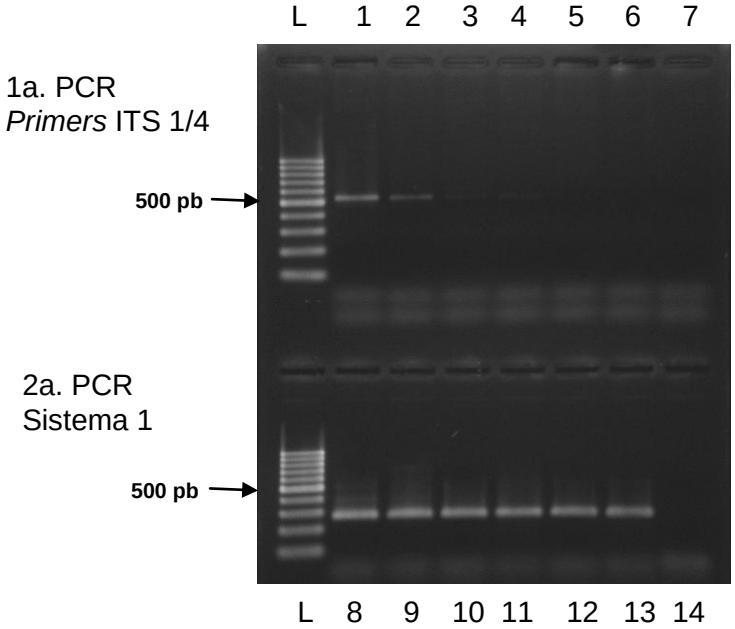


Figura 4: Gel de agarose a 2 % mostrando as bandas resultantes das amplificações da *nested* PCR multiplex realizadas com as amostras de DNA de *C. albicans* diluídas de 1,5 ng a 15 fg. 1 ao 6 (1ª PCR) 1 (1,5 ng); 2 (150 pg); 3 (15 pg); 4 (1,5 pg); 5 (300 fg); 6 (150 fg); 7 (15 fg); 8 ao 14 (2ª PCR - Sistema 1); 8 (1,5 ng); 9 (150 pg); 10 (15 pg); 11 (1,5 pg); 12 (300 fg); 13 (150 fg); 14 (15 fg); L = marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas); ng = nanograma; pg = picograma; fg = fentograma

5.6. Avaliação da especificidade em relação a outros agentes de infecção hematogênica e entre as espécies de *Candida*

Os resultados das amplificações demonstraram ausência de reações cruzadas com todos os micro-organismos avaliados, entre bactérias, outros gêneros de fungos e outras espécies de *Candida*.

Também foi verificada ausência de reatividade cruzada entre as sete espécies de *Candida* envolvidas no estudo com os *primers* espécie-específicos selecionados para o estudo (**Figura 5**).

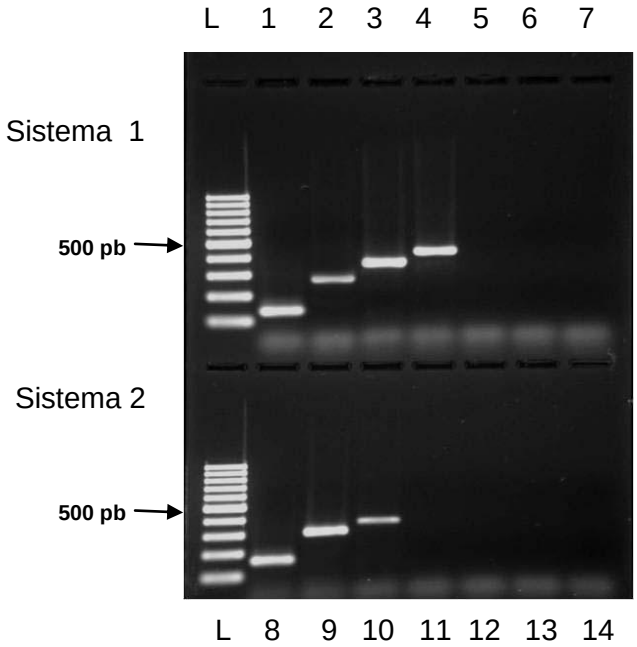


Figura 5: Gel de agarose a 2,5% mostrando as amplificações nos dois sistemas espécie-específicos com os DNAs das sete espécies de *Candida*
(1) *C. lusitaniae* (137 pb), (2) *C. albicans* (272 pb),(3) *C. tropicalis* (357 pb), (4) *C. glabrata* (423 pb), (5) *C. pelliculosa* (ausência de amplificação), (6) *C. parapsilosis* (ausência de amplificação), (7) *C. krusei* (ausência de amplificação), (8) *C. pelliculosa* (160 pb), (9) *C. parapsilosis* (297 pb), (10) *C. krusei* (362 pb), (11) *C. lusitaniae* (ausência de amplificação), (12) *C. albicans* (ausência de amplificação), (13) *C. tropicalis* (ausência de amplificação), (13) *C. glabrata* (ausência de amplificação); L= marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

5.7. Resultados das hemoculturas e das amplificações pela *nested* PCR multiplex

Das 55 amostras dos pacientes do estudo, oito (**14,5%**) apresentaram hemoculturas positivas, enquanto 13 (**23,6%**) foram positivas nas amplificações pela *nested* PCR multiplex, incluindo as oito positivas nas hemoculturas **(Figuras 6, 7** e **8)**. Em relação à identificação das espécies de *Candida*, os resultados de ambos os métodos foram 100% concordantes (**Tabela 3**).

A técnica de *nested* PCR multiplex foi capaz de detectar mais de uma espécie de *Candida* (*C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) nas amostras sanguíneas de três pacientes, cujas hemoculturas foram negativas (**Figuras 7** e **8**).

As amostras das 28 crianças do grupo controle não amplificaram em nenhum dos dois sistemas da *nested* PCR, demonstrando ausência de reações inespecíficas por esta técnica.

Tabela 3: Resultados das identificações das espécies de *Candida* obtidos pelas hemoculturas e pela *nested* PCR multiplex

Pacientes	Hemoculturas	*Nested* PCR multiplex
P.R.B.S.	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis*
M.C.G.	*C. albicans*	*C. albicans*
I.J.S.	*C. albicans*	*C. albicans*
Y.V.C.R.	*C. tropicalis*	*C. tropicalis*
L.C.S.	*C. albicans*	*C. albicans*
C.S.A.	*C. albicans*	*C. albicans*
D.N.P.	*C. krusei*	*C. krusei*
N.T.D.	*C. albicans*	*C. albicans*
F.H.R.A.	Negativa	*C. tropicalis* + *C. parapsilosis*
A.O.R.	Negativa	*C. parapsilosis*
D.M.G.S.	Negativa	*C. tropicalis*
R.V.L.G.	Negativa	*C. tropicalis* + *C. parapsilosis*
G.L.T.	Negativa	*C. tropicalis* + *C. parapsilosis*

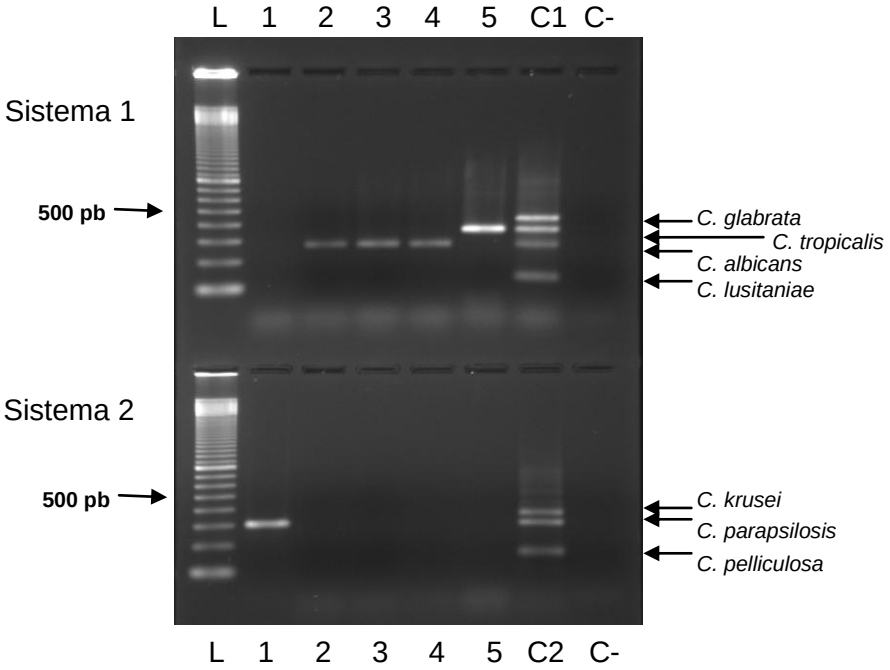


Figura 6: Gel de agarose a 2,5% mostrando as amplificações das amostras de DNA dos pacientes nos sistemas 1 e 2 da *nested* PCR multiplex. (1) P.R.B.S. (*C. parapsilosis*), (2) M.C.G. (*C. albicans*), (3) I.J.S. (*C. albicans*), (4) L.C.S. (*C. albicans*), (5) Y.V.C.R. (*C. tropicalis*), (C1) controles positivos do sistema 1, (C2) controles positivos do sistema 2, (C-) controles negativos**;** L= marcador de peso molecular de 100 pb (GE Healthcare)

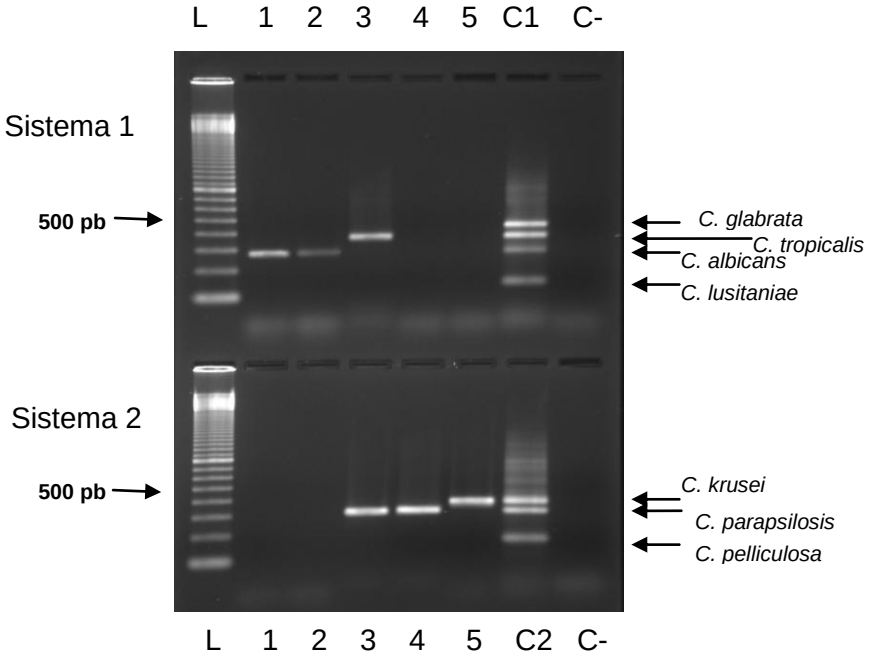


Figura 7: Gel de agarose a 2,5% mostrando amplificações das amostras de pacientes pelos sistemas 1 e 2 da *nested* PCR multiplex. (1) C.S.A. (*C. albicans*), (2) N.T.D. (*C. albicans*), (3) F.H.R.A. (*C. tropicalis* + *C. parapsilosis*), (4) A.O.R. (*C. parapsilosis*), (5) D.N.P. (*C. krusei*), (C1) controles positivos do sistema 1, (C2) controles positivos do sistema 2, (C-) controles negativos; L= marcador de peso molecular de 100 pb (GE Healthcare)

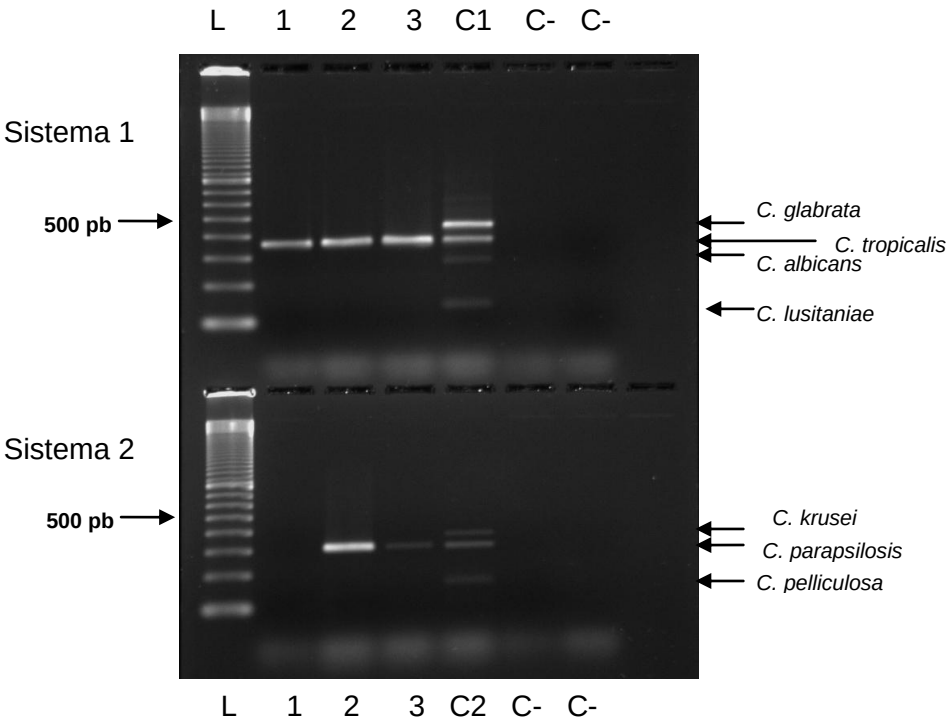


Figura 8: Gel de agarose a 2,5% mostrando amplificações das amostras de pacientes pelos sistemas 1 e 2 de amplificação da *nested* PCR multiplex. (1) D.M.G.S. (*C. tropicalis*), (2) R.V.L.G. (*C. tropicalis* + *C. parapsilosis*), (3) G.L.T. (*C. tropicalis* + *C. parapsilosis*), (C1) controles positivos do sistema 1, (C2) controles positivos do sistema 2, (C-) controles negativos L= marcador de peso molecular de 100 pb (GE Healthcare)

5.8. Resultados dos sequenciamentos automatizados

Para os cinco pacientes que apresentaram resultados positivos apenas pela PCR, os amplificados foram sequenciados. As oito amostras analisadas apresentaram similaridade que variaram de 99 a 100%, quando comparadas às sequências de cepas de referência de *Candida*, disponíveis no *GenBank* (**Tabela 4** e **Anexo E)**.

Tabela 4. Similaridades entre as sequências dos amplificados dos pacientes que apresentaram apenas PCR positivas e as sequências do *GenBank*

Pacientes	Identificação das espécies pela *nested* PCR multiplex	Sequências do *GenBank*	Similaridade
F.H.R.A.	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis* JN997459.1	100 %
F.H.R.A.	*C. tropicalis*	*C. tropicalis* EU266571.1	100 %
A.O.R.	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis* FJ872019.1	99 %
R.V.L.G.	*C. tropicalis*	*C. tropicalis* EU266571.1	99 %
R.V.L.G.	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis* HQ263346.1	99 %
D.M.G.S.	*C. tropicalis*	*C. tropicalis* AY939810.1	100 %
G.L.T.	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis* JN997459.1	99 %
G.L.T.	*C. tropicalis*	*C. tropicalis* EU266571.1	99 %

5.9. Análise estatística

O teste de McNemar, aplicado aos resultados obtidos pelas hemoculturas e pela *nested* PCR multiplex, mostrou que a discordância encontrada entre os testes não foi estatísticamente significante (p=0,063).

5.10. Cálculo e comparação de custo entre a *nested* PCR multiplex e as hemoculturas

O valor estimado para o custo de uma hemocultura informado pelo Setor de Microbiologia da DLC-HCFMUSP, incluindo a detecção e identificação de *Candida* (Bactec + sistema Vitek™2), foi de R$ 60,00 que, acrescido de 20% do valor, totalizou R$ 72,00.

Para a PCR multiplex, considerando-se a realização da técnica para apenas uma amostra sanguínea, o valor estimado do custo foi de R$ 42,40, que acrescido de 20%, resultou no total de R$ 50,88. Quando foi considerado o processamento simultâneo de 10 amostras, o valor total estimado por amostra foi de R$ 24,81, que acrescido de 20%, resultou no valor de R$ 29,77 (**Anexo F).** A redução do custo para o processamento de 10 amostras foi de 41,5 %.

6. DISCUSSÃO

Candida é o principal agente causador de micoses oportunísticas no mundo, e está associada a elevadas taxas de mortalidade geral, que variam de 46 a 75% dos pacientes com a infecção (Pfaller e Diekeman, 2007).

A candidemia é um grave problema em pacientes internados em UCIs, tanto crianças como adultos, observando-se maior frequência dessa infecção nesses pacientes quando comparados aos pacientes internados em outras unidades hospitalares. Um estudo realizado na França, demonstrou que candidemia afeta 6,7 casos por 1000 admissões em UCIs (Bougnoux et al. 2008), enquanto nos EUA a frequência é de 6,9 casos por 1000 admissões (Kett et al., 2011). Em recente estudo realizado no Brasil por Marra et al. (2011), também foi observado um número maior de casos de candidemia em pacientes internados em UCIs, em relação a pacientes internados em outras unidades hospitalares (7,4% contra 3,9%).

Devido às elevadas taxas de mortalidade associadas à infecção e ao aumento no tempo de internação desses pacientes acarretando elevação dos custos hospitalares, é de grande importância o diagnóstico rápido e especifico, propiciando o início do tratamento precoce nesses pacientes.

A detecção de bacteremias e fungemias têm sido uma das atividades mais relevantes dos laboratórios de microbiologia clínica, utilizando hemoculturas para isolamento dos agentes patogênicos (Weinstein, 1996). Entretanto, vários fatores influenciam nos resultados das hemoculturas, como a assepsia do local (pele) antes da coleta, o volume de sangue coletado, o

número de hemoculturas coletadas do paciente, entre outros fatores (Mylotte e Tayara, 2000).

O padrão ouro para o diagnóstico das candidemias é o isolamento da levedura a partir de hemoculturas que, entretanto, apresentam sensibilidade de apenas 50 a 60%, como demonstrado por estudos de autópsias (Zaoutis et al., 2005). Para se atingir maior eficiência do método, há necessidade de coletas de grandes volumes de sangue (10 a 30 ml), além de três punções endovenosas de cada paciente (Cuenca-Estrella et al., 2012). Esse procedimento é difícil de ser realizado na rotina clínica, principalmente em pacientes pediátricos internados em UCIs.

Segundo Mylotte e Tayara (2000), para pacientes pediátricos, volumes pequenos de sangue são adequados para as hemoculturas em casos de suspeita de bacteremia, não afetando significativamente a positividade dos testes. Por outro lado, um estudo realizado por Isaacman et al. (1996), demonstrou a importância do aumento do volume de amostra para se identificar bacteremias em pacientes pediátricos, verificando-se maior sensibilidade, ao compararem resultados das hemoculturas com volumes de 2 ml e 6 ml. Outro aspecto importante que ocorre em pacientes neonatos é a prática usual de se realizar apenas uma hemocultura antes do início do tratamento, diminuindo a positividade do teste (Buttery, 2002). Especificamente para fungos, não há relatos na literatura que avaliam a positividade das culturas em relação ao volume de sangue coletado; entretanto, é possível inferir que o mesmo ocorra para os isolamentos de *Candida*.

Devido às limitações do método de hemocultura, como a baixa sensibilidade e o tempo prolongado para isolamento e identificação do

patógeno, vários grupos vêm desenvolvendo e avaliando metodologias não baseadas em cultura, principalmente a técnica de PCR, que demonstra bom potencial quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade na detecção de *Candida* em amostras clínicas (White et al., 2005).

Existem várias modalidades da técnica, tais como a *nested* PCR, PCR multiplex, *nested* PCR multiplex, *real time* PCR (qPCR), entre outras. Os genes alvos dessas técnicas são bem variados, incluindo os do citocromo P450, da *heat shock protein*, e o gene do DNA ribossomal, que é o mais frequentemente utilizado, pela sua natureza universal e grande número de cópias presentes no genoma de *Candida* (White et al., 2005).

No presente estudo, foram empregados *primers* descritos por Luo e Mitchell (2002), que foram escolhidos por demonstrar boa especificidade quando utilizados em reações do tipo multiplex, como relatado por esses autores. Os *primers* para *C. lusitaniae* e *C. pelliculosa* foram delineados neste estudo, por análise *in silico*, avaliando-se a especificidade de ligação com os alvos e a possibilidade de ocorrência de *primer dimers* entre as combinações utilizadas.

Em seguida, foram realizadas as análises *in vitro* para avaliação da especificidade e eficiência desses *primers* nas amplificações. Em todos os testes realizados, não foi observada reatividade cruzada dos *primers* com as espécies de *Candida* não correspondentes, e ainda com os outros micro-organismos avaliados (outros gêneros de fungos e bactérias).

Em relação às condições de amplificação da PCR multiplex, foi necessário diluir 1:100 os produtos da primeira etapa de amplificação (ITS) para aplicar aos tubos da segunda etapa (*nested*), pois para as amostras

clínicas positivas para *Candida*, observou-se o aparecimento de bandas secundárias inespecíficas, quando os produtos da primeira amplificação foram aplicados nos sistemas 1 e 2 sem diluição.

Outros autores, empregando técnicas de PCR do tipo *nested* multiplex, também utilizaram diluições para diminuir o excesso de produtos inespecíficos revelados na segunda etapa de reação (Arbour et al., 2000; Figueiredo et al., 2008; Paudel et al., 2011).

Na técnica de PCR, o método de *touchdown* tem a finalidade de empregar sucessivas temperaturas decrescentes de hibridização, proporcionando a interação mais específica entre os *primers* e o DNA alvo, nos ciclos iniciais de reação (Korbie e Mattick, 2008). O emprego do *touchdown* foi uma modificação adotada nas condições de amplificação da segunda etapa da PCR, devido ao surgimento de produtos inespecíficos nas reações iniciais do estudo.

Outro problema observado na técnica de PCR multiplex, quando dois ou mais DNAs alvos estavam presentes simultâneamente nos tubos de reação [como para os tubos controles positivos contendo os DNAs das quatro (Sistema 1) ou das três (Sistema 2) espécies de *Candida*], foi o favorecimento das amplificações para os alvos com pesos moleculares mais baixos (menor número de pares de base). Para solucionar a questão, foram avaliadas diferentes substâncias, entre as quais BSA, glicerol e DMSO, com o objetivo de melhorar a sensibilidade para as amplificações de baixo peso molecular (principalmente *C. lusitaniae* e *C. pelliculosa*) e a eficiência das reações (Henegariu et al., 1997). Os melhores resultados foram obtidos com DMSO a 5%, que possibilitou a detecção de até quatro espécies de *Candida* em uma

mesma reação, com bandas de amplificação de intensidades semelhantes e definidas.

A PCR do tipo multiplex possui a vantagem de amplificar simultâneamente alvos diferentes, que podem ser vários genes de um único micro-organismo ou de organismos diferentes.

Em estudo que empregou a PCR multiplex para identificação de oito espécies de leveduras em 237 culturas de sangue positivas, a técnica foi capaz de identificar corretamente os patógenos em 234 amostras (98,7%), sendo necessárias apenas 6 horas para realizar o teste (Li et al. 2003).

Lau et al. (2008) utilizaram essa técnica em dois *rounds* (multiplex-tandem PCR), para a detecção e identificação de fungos em frascos de hemocultura, demonstrando boa correlação entre os dois métodos. Os autores identificaram fungos em 100% dos frascos de hemocultura positivos (n=44) em menos de 24 horas, não observando reatividade em 200 hemoculturas com crescimento de bactérias e em 30 negativas (sem micro-organismos presentes). O limiar de detecção observado foi de 10 UFC/ml para C*. albicans,* demonstrando boa sensibilidade da técnica de PCR. Em 2010, o mesmo grupo avaliou a metodologia em amostras clínicas de 109 pacientes com candidemia (255 amostras de sangue total em EDTA, 29 amostras de soro e 24 amostras de plasma) observando sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 75%, 97%, 95% e 85%, respectivamente para sangue total; os valores observados para soro e plasma foram mais elevados. Estes autores, portanto, recomendaram o emprego da técnica de PCR em amostras de soro ou plasma, discordando de Avni et al. (2011), que

demonstraram, em trabalho publicado com resultados de meta-análise, que sangue total é mais adequado para diagnóstico de candidemia por PCR.

No estudo realizado por Enomoto et al. (2009), foi desenvolvida uma PCR multiplex para identificar, diretamente das amostras clínicas de pacientes neonatos, oito patógenos (*Streptococcus* do grupo B, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* metacilina-resistente, *Ureaplasma urealyticum*, vírus herpes simplex, *Cytomegalovirus* e *C. albicans*). Os autores observaram sensibilidade de 50%, especificidade de 93%, valor preditivo negativo de 96% e valor preditivo positivo de 38%, demonstrando a necessidade de aprimoramento da PCR que, de acordo com os autores, poderia ser através da utilização de duas etapas de amplificação, como a técnica empregada no presente estudo.

Lucignano et al. (2011) encontraram melhores resultados, utilizando uma metodologia de *real time* PCR multiplex comercial (*LightCycler SeptiFast test*, Roche), que permite a identificação de mais de 20 bactérias e fungos (cinco espécies de *Candida* e *Aspergillus fumigatus*). A detecção do patógeno foi realizada diretamente em amostras clínicas (sangue), sendo a positividade do teste mais elevada para a detecção de *Candida* quando comparado às culturas. Entretanto, a técnica falhou na detecção deste patógeno em quatro casos, nos quais as culturas foram positivas.

Pasqualini et al. (2012) utilizaram a mesma metodologia para avaliar 291 pacientes com suspeita de septicemia; os resultados do *SeptiFast* e das hemoculturas foram concordantes em 82% dos casos (289 amostras foram concordantes negativas e 32 amostras concordantes positivas), mas o sistema falhou na identificação de alguns patógenos, entre os quais nove micro-organismos que não estão inclusos no kit, e portanto, não poderiam ser

identificados. Em relação à detecção de *Candida*, não foi possível obter uma avaliação adequada do teste, uma vez que houve somente um caso positivo para *C. albicans*, que foi isolada também pela hemocultura.

Esses resultados demonstram que a técnica de PCR em tempo real do tipo *SeptiFast* (Roche), é promissora, particularmente em relação ao tempo de detecção, pois fornece resultados em apenas 6 horas; a técnica, entretanto, ainda apresenta limitações em relação à sensibilidade de detecção do patógeno nas amostras clínicas e necessita ampliar o número de patógenos envolvidos em infecções nosocomiais, além da necessidade de mais estudos para avaliar particularmente as infecções por *Candida* e *Aspergillus*.

No presente estudo, a *nested* PCR multiplex demonstrou a capacidade de detectar até 150fg de DNA das sete espécies de *Candida*, correspondendo a aproximadamente quatro genomas da levedura ou quatro unidades formadoras de colônia (UFC), resultado também observado por outros autores em técnicas de PCR do tipo *nested* (Ahmad et al., 2002; Carvalho et al., 2007).

Deste modo, o limiar de detecção da técnica atingiu valores esperados, uma vez que ensaios baseados na metodologia de PCR, devem idealmente ter a capacidade de detectar i*n vitro* pelo menos 10 UFC/ml (Avni et al., 2011). Para tanto, foi necessária a realização da técnica de PCR do tipo *nested*. A primeira etapa de amplificação (ITS) atingiu um limiar de detecção de um picograma de DNA de *Candida* sp. nos ensaios de sensibilidade por diluição de DNA; este limiar é insuficiente para o diagnóstico de candidemia, visto que nesta infecção, a “quantidade” de leveduras circulantes em 10 ml de sangue periférico parece estar entre 10 e 25 UFC (Telenti et al., 1991).

Pfeiffer et al. (2011) revisaram registros de pacientes com hemoculturas consecutivas positivas para *Candida*, entre 1987 e 1991, realizando análise estatística descritiva e análise de regressão logística. Os autores observaram que a média de UFC/ml nas hemoculturas iniciais dos pacientes era muito variável, mas em 58% deles, foi igual a um, concluindo que as técnicas moleculares seriam inadequadas para o diagnóstico de candidemia nesses casos, por não atingirem este limiar de detecção (1UFC/ml). Entretanto, os próprios autores admitem que a técnica de PCR seja capaz de detectar menos de 10 UFC/ml, pela escolha de alvos multicópias (DNA ribossomal) e pela possível presença de DNA de micro-organismos mortos no sangue total, que não são detectados pelas hemoculturas. No presente estudo, o limite de detecção da técnica empregada ficou abaixo de 10 UFC/ml, estando dentro do limite recomendado pela literatura.

Quanto à avaliação da especificidade da técnica, não foram observadas reações cruzadas com bactérias e outros fungos patogênicos envolvidos em episódios de sepse. Em alguns relatos, como os de Carvalho et. al. (2007) e Lau et al. (2008), também foram realizados testes para avaliação de possíveis reações cruzadas com micro-organismos não relacionados à *Candida* que, como neste estudo, não foram observadas, sugerindo boa fidelidade dos *primers* aos alvos e especificidade dos sistemas de amplificação.

Por outro lado, devido à elevada sensibilidade da técnica de PCR com dupla amplificação na detecção de patógenos em amostras clínicas, os riscos de ocorrer reações falso-positivas são elevados (Colom et al., 2006). Com o objetivo de evitar o aparecimento dessas reações, especialmente pela possibilidade de contaminação entre amostras (*carryover*), foram utilizados

todos os procedimentos que minimizam esses riscos durante a realização das amplificações, bem como a inclusão de controles negativos em todas as reações (Wahyuningsih et al., 2000; Ahmad et al., 2002).

Por essa mesma razão, foi avaliada a possibilidade de amplificações inespecíficas em amostras de sangue de indivíduos sem risco para infecções fúngicas. Para tanto, foram incluídas neste estudo amostras de DNA extraídas de sangue de 28 crianças sem infecção, não se observando o aparecimento de tais reações nas amostras desta população.

Os resultados deste estudo demonstraram que a PCR apresentou positividade maior que as hemoculturas (23,6% contra 14,5%), dados também encontrados por outros autores (Ahmad et al., 2002, Del Negro, 2008). Entretanto, as duas metodologias não apresentaram discordância estatísticamente significante (p=0,063), situação provavelmente ocasionada pelo pequeno número de amostras analisadas (n=55). Entretanto, observa-se uma tendência à discordância entre as técnicas, pois o valor de *p* ficou muito próximo do nível de significância (0,05). É muito provável que se o número de pacientes do estudo fosse maior, a diferença seria significante, com vantagem para a técnica molecular.

Del Negro (2008) também observou positividade maior da PCR em relação às hemoculturas (25,9% contra 15,5%, p= 0,031) em estudo realizado no Instituto da Criança do HC-FMUSP, em pacientes pediátricos com risco elevado de desenvolver candidemias. O estudo empregou uma *nested* PCR do tipo uniplex, que apresentou concordância de 88,9% com as hemoculturas na identificação das espécies de *Candida*, mas somente a técnica molecular detectou dois casos de dupla candidemia.

Ahmad et al. (2002), demonstraram positividade de 56% em pacientes com suspeita de candidemia e com hemoculturas negativas, quando foram avaliados pela metodologia de semi-*nested* PCR para a identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. A técnica identificou dupla candidemia em cinco desses pacientes. Do mesmo modo, no presente estudo, foram observados três casos de dupla candidemia (**Figuras 7** e **8**), os quais tiveram resultados de hemocultura negativos. Os amplificados, nesses casos, foram confirmados por sequenciamento, observando-se similaridade de 99 a 100% quando comparados às sequências de cepas de referência de *Candida*, disponíveis no *GenBank* (**Tabela 4** e **Anexo E**).

Esses amplificados apresentaram elevados índices de similaridade com sequências do *GenBank*, confirmando que as amplificações pela PCR foram específicas; entretanto, não se descarta a possível contaminação das amostras de sangue nas quais foram detectadas mais de uma espécie de *Candida*. Como nos três casos de dupla candidemia, uma das espécies era *C. parapsilosis*; esta levedura está frequentemente presente na microbiota da pele dos pacientes, podendo ter ocorrido contaminação das amostras de sangue no momento das coletas, se as assepsias do local não foram adequadas.

Por outro lado, a técnica de PCR tem possibilitado a identificação de casos de candidemia com mais de uma espécie de *Candida*, nos quais as hemoculturas só isolam uma espécie, como demonstrado por outros autores (Ahmad et al., 2002; Alam et al., 2007; Del Negro et al., 2010).

Em estudo retrospectivo realizado por Pulimood et al. (2002), com o objetivo de demonstrar a frequência de isolamento de mais de uma espécie de *Candida* da corrente sanguínea, analisou-se os registros laboratoriais de um

hospital terciário nos EUA. Em 303 pacientes com candidemia, foram identificadas, por hemoculturas, duas ou mais espécies de *Candida* em 5,2% de casos. Klotz et al. (2007) também observaram que infecção polimicrobiana em pacientes com candidemia é relativamente comum, verificando em análise de 8000 episódios, que cerca de 23% das infecções eram polimicrobianas, e destas, 4% eram casos com mais de uma espécie de *Candida*.

Em meta-análise sobre o diagnóstico de candidíase invasiva por PCR realizada por Avni et al. (2011), foram incluídos 54 estudos totalizando 4.694 pacientes; observou-se que a técnica molecular apresentou 100% de sensibilidade e especificidade quando analisados pacientes com candidemia confirmada (hemoculturas positivas). Entre os pacientes com suspeita clínica de candidemia provável ou possível, foi encontrada positividade mais elevada quando comparada às hemoculturas (85% contra 38%, e 67% contra 29%, respectivamente). Os autores concluíram que a PCR realizada diretamente em amostras clínicas para a detecção de *Candida* spp., é metodologia aceitável para a prática clínica.

Pletz et al. (2011), em artigo de revisão, discutem se a PCR é capaz de melhorar o diagnóstico em pacientes com sepse, observando as limitações e vantagens da metodologia. Entre as principais limitações estão o custo, devendo ser bem avaliados quais os patógenos a serem identificados, para minimizar o número de amplificações; e a possibilidade de resultados falso-positivos por contaminação do tipo *carryover*. Para estes autores, a principal vantagem da PCR é a viabilização mais rápida dos resultados, de 6-8 horas contra 2-4 dias, possibilitando o início precoce da terapêutica.

Em 2006, foi publicada uma avaliação do emprego da PCR para diagnóstico de infecções fúngicas invasivas pelo "*UK-Irish Fungal PCR Consensus Group*", sendo analisadas amostras de sangue "batizadas" com quantidades conhecidas de conídios de *Aspergillus fumigatus* e leveduras de *C. albicans* (0 a 10^5); essas amostras foram enviadas a sete centros de pesquisa, para se avaliar o método de extração de DNA, a sensibilidade e a especificidade das PCRs (*real time* PCR) em cada laboratório. Para *C. albicans*, o método de extração publicado por Löefler et al. (1997; 2002) foi satisfatório, entretanto concluiu-se que técnicas de extração automatizadas são preferíveis para diminuir a possibilidade de contaminação das amostras; em relação aos ensaios de PCR para *Candida*, dois métodos [*Light-Cycler* (Roche) e o sistema *TaqMan* (Applied Biosystems)] atingiram bons limites de detecção (10 UFC/ml de sangue) e de especificidade, demonstrando serem métodos consistentes (White et al., 2006). Os limites de detecção, bem como a metodologia de extração de DNA, considerados pelos autores como adequados ao diagnóstico molecular de candidemias, foram semelhantes aos do presente trabalho, além de sugerir a utilização de dois *rounds* de amplificação para aumentar a sensibilidade da PCR.

No presente estudo, o tempo para a detecção de *Candida* nas amostras sanguíneas dos pacientes foi de aproximadamente 24 horas, tempo menor quando comparado ao tempo exigido pelas hemoculturas, levando-se em conta a necessidade da identificação fenotípica da espécie (72-96 horas). A possibilidade de fornecer resultados em tempo relativamente curto é promissora, visto que o diagnóstico precoce é de extrema importância para a terapêutica correta do paciente.

Alam et al. (2007) compararam resultados encontrados por marcadores sorológicos (pesquisa de manana, anticorpos anti-manana e 1,3-β-D-glucana) e pela semi-*nested* PCR, utilizando amostras de soros de pacientes com hemoculturas positivas para *Candida,* e de pacientes com suspeita clínica de candidemia sem culturas positivas. Os autores encontraram sensibilidade de 88% pela semi-*nested* PCR, e de 41%, 47% e 47%, respectivamente para os três marcadores, no primeiro grupo de pacientes. Naqueles com suspeita clínica e hemoculturas negativas, a positividade foi de 53% pela PCR, e 16%, 29% e 29%, respectivamente para os marcadores sorológicos. Esses resultados reforçam o valor da PCR empregada no diagnóstico de candidemias.

O teste molecular apresentou menor custo quando comparado ao método de hemocultura, que necessita de duas plataformas automatizadas (Bactec e Vitek™ 2), além de meios de cultura cromogênicos, fatores que elevam o valor de seu custo direto (R$ 60,00).

Em relação ao método molecular, o custo direto foi mais baixo do que o da hemocultura mesmo quando o cálculo foi aplicado para o processamento de apenas uma amostra (R$ 42,40). E este custo diminuiu cerca de 40% com a realização da técnica de PCR multiplex para 10 amostras simultaneamente (**Anexo F**). Considerando-se que em uma rotina laboratorial de diagnóstico molecular esta seria a situação mais próxima da realidade, verifica-se que a técnica molecular apresenta vantagem em relação ao custo. Enquanto para a PCR o processamento de várias amostras contribui para diminuir os custos, o mesmo não ocorre para as hemoculturas.

A busca por ferramentas para o diagnóstico precoce de infecções hematogênicas por *Candida* tem como objetivo melhorar o prognóstico dos pacientes, visto que a demora no início do tratamento empírico pode aumentar os índices de mortalidade. Em estudo realizado por Zilberberg et al. (2010), foram analisados os tratamentos aplicados a 90 pacientes com candidemia, internados em UCIs, observando que terapia antifúngica inadequada (demora no início do tratamento e/ou dose incorreta) foi utilizada em 88,9% dos pacientes. A mortalidade foi maior nesses pacientes quando comparados àqueles com terapia fúngica precoce (28,8% contra 0%), e os custos decorrentes foram maiores, pelos dias a mais de hospitalização.

Pelos resultados obtidos nesse estudo, a PCR multiplex do tipo *nested* demonstra bom potencial para ser aplicada ao diagnóstico de candidemias. A técnica apresentou maior capacidade de detecção do agente patogênico do que as hemoculturas, permitiu a liberação dos resultados em menor tempo, e ainda possibilitou a identificação de dupla candidemia, com menor custo.

Alguns aspectos da técnica de *nested* PCR multiplex ainda podem ser melhorados, tais como o tempo de extração do DNA das amostras clínicas, podendo empregar-se métodos automatizados e diminuindo ainda mais o tempo de realização da técnica. Em relação ao emprego de sistemas fechados para as amplificações, como a PCR em tempo real, os resultados poderiam ser liberados mais rapidamente ainda, além de diminuir os riscos de contaminação das amostras.

7. CONCLUSÕES

- A técnica de *nested* PCR multiplex apresentou limiar de detecção adequado para o diagnóstico de candidemias, atingindo cerca de quatro genomas de *Candida* por ml de sangue.

- A técnica apresentou especificidade de 100%, não demonstrando reatividade cruzada com material genômico de outros micro-organismos ou reações falso-positivas quando avaliada com amostras de crianças sem infecção.

- Em relação à identificação das espécies de *Candida*, a técnica molecular foi 100% concordante com as hemoculturas.

- A *nested* PCR multiplex demonstrou ser uma alternativa promissora ao método convencional de cultura, pois foi mais sensível na detecção do patógeno, e disponibilizou os resultados em menor tempo e com menor custo.

8. ANEXOS

Anexo A

HC

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/08/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0426/10**, intitulado: "**VALIDAÇÃO DA PCR MULTIPLEX NA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDA SPP. EM INFECÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS GRAVEMENTE DOENTES**" apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Glida Maria Barbaro Del Negro**
Pesquisador (a) Executante: **Cleison Ledesma Taira**

CAPPesq, 12 de Agosto de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6447 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a), como já lhe foi falado seu filho(a) tem uma infecção que nós acreditamos seja causada por um fungo. A pesquisa que queremos realizar vai testar se os pacientes realmente estão com um fungo no sangue. Estes testes são feitos com análise de DNA que é separado das células do sangue.

É por este motivo que estamos solicitando a sua autorização para coletar 1 mililitro de sangue de uma veia do braço do seu (sua) filho (a). O sangue será colhido de uma única vez com seringas e agulhas que usamos e jogamos fora (descartáveis), de uma veia do braço. Vamos aproveitar um dia em que o seu filho tiver que colher outros exames de sangue para não termos que picar o braço dele só para a pesquisa. No local da picada da agulha o seu (sua) filho (a) poderá sentir um pouco de dor e, às vezes poderá ficar uma pequena mancha roxa que depois de alguns dias sumirá sozinha.

É preciso ficar claro que o (a) senhor (a) poderá desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo para o atendimento médico do seu (sua) filho (a) na Instituição. Os resultados dos exames serão enviados para o prontuário médico do seu filho e também serão fornecidos ao senhor (a) a qualquer momento que forem solicitados, sempre obedecendo às regras de sigilo profissional, para resguardar seu filho (a), evitando constrangimentos.

No caso de eventuais danos à saúde causados pela pesquisa, o ICr-HC-FMUSP fornecerá a assistência necessária. Nesta pesquisa, os eventuais danos seriam apenas àqueles referentes à coleta de sangue de veia do braço para a pesquisa. Em caso de qualquer dúvida ou problema, favor contatar a Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon ou o Dr. Artur Figueiredo Delgado, que são os médicos responsáveis pela pesquisa no ICr, nos telefones (011) 2661-8589 ou 2661-8590.

São Paulo, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do participante:_____

Assinatura do pesquisador responsável:

Anexo C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a),

A equipe médica do Instituto da Criança está iniciando uma pesquisa que vai testar se os pacientes internados na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal (UCINE) e na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTI) estão com um fungo no sangue, que pode representar uma doença grave e deve ser diagnosticada rapidamente para iniciar o tratamento médico. Estes testes são feitos com análise de DNA que é separado das células do sangue.

O(A) seu(sua) filho(a) vai realizar uma cirurgia de pequeno porte, não tem nenhuma doença infecciosa e o projeto também precisa testar o sangue de crianças sem infecção como grupo controle.

É por este motivo que estamos solicitando a sua autorização para coletar de 1 a 2 mililitros de sangue de uma veia do braço do seu (sua) filho (a). O sangue será colhido de uma única vez com seringas e agulhas que usamos e jogamos fora (descartáveis), de uma veia do braço. Vamos aproveitar o dia em que o seu filho tiver que colher outros exames de sangue para não termos que picar o braço dele só para a pesquisa. No local da picada da agulha o seu (sua) filho (a) poderá sentir um pouco de dor e, às vezes poderá ficar uma pequena mancha roxa que depois de alguns dias sumirá sozinha.

É preciso ficar claro que o (a) senhor (a) poderá desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo para o atendimento médico do seu (sua) filho (a) na Instituição. Os resultados dos exames serão enviados para o prontuário médico do seu filho e também serão fornecidos ao senhor (a) a qualquer momento que forem solicitados, sempre obedecendo às regras de sigilo profissional, para resguardar seu filho (a), evitando constrangimentos.

No caso de eventuais danos à saúde causados pela pesquisa, o ICr-HC-FMUSP fornecerá a assistência necessária. Nesta pesquisa, os eventuais danos seriam apenas àqueles referentes à coleta de sangue de veia do braço para a pesquisa. Em caso de qualquer dúvida ou problema, favor contatar o Dr. Antonio José Gonçalves e Leal, preceptor da Cirurgia Pediátrica do Instituto da Criança (ICr) pelo telefone 2661.8616.

São Paulo, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do participante:_____

Assinatura do pesquisador responsável:

Anexo D1: Tabela com dados demográficos e condições clínicas dos pacientes do estudo

	Pacientes	Idade	Gênero	Doença de base	A.A.E.	C.V.C.
1	I.H.S.N	58 dias	M	Má formação congênita	Sim	Sim
2	P.R.B.S	19 dias	M	Ictiose, prematuridade	Sim	Sim
3	L.A.G.D	14 dias	F	Prematuridade	Sim	Sim
4	R.V.L.G.S	9 dias	M	Hérnia de diafragma congênita	Sim	Sim
5	D.M.G.S	35 dias	M	Hérnia diafragma congênita, prematuridade	Sim	Sim
6	G.L.T	55 dias	M	Enterocolite necrosante	Sim	Sim
7	S.M.B	27 dias	F	Doença das membranas hialinas	Sim	Sim
8	S.M.B	27 dias	M	Doença das membranas hialinas	Sim	Sim
9	A.J.F.L	33 dias	M	Gastroesquize, prematuridade	Sim	Sim
10	E.V.G.S.S	55 dias	M	Osteogênese Imperfecta, cirurgia intestinal	Sim	Não
11	M.C.G	14 dias	M	Prematuridade	Sim	Sim
12	I.J.S	44 dias	F	Atresia de esôfago	Sim	Sim
13	V.O.L	3 meses	F	Cardiopatia	Sim	Não
14	C.S.S	35 dias	M	Faceíte, sepse	Sim	Sim
15	D.S.G	33 dias	M	Infecção bacteriana	Sim	Sim
16	E.M.G	22 dias	F	Síndrome da insuficiência respiratória	Sim	Sim
17	F.S.T	14 dias	M	Infecção bacteriana	Sim	Sim
18	J.V.S.S	14 dias	F	Recém-nascido pré-termo	Sim	Sim
19	J.A.D.G	17 dias	M	Recém-nascido pré-termo	Sim	Sim
20	L.G.T	6 dias	F	Desconforto respiratório não especificado	Sim	Sim
21	M.K.T.R	9 dias	M	Síndrome da insuficiência respiratória	Sim	Sim
22	N.F.S	40 dias	F	Síndrome da insuficiência respiratória	Sim	Sim
23	S.A.C	6 dias	F	Síndrome da insuficiência respiratória	Sim	Sim
24	Y.G.S.C	7 dias	F	Transtornos cardiovasculares	Sim	Sim
25	Y.V.C.R.	20 meses	F	Leucemia linfóide aguda	Sim	Sim
26	F.H.R.A	38 meses	M	Transplante medula óssea, neuroblastoma	Sim	Sim
27	A.O.R	182 meses	F	Osteossarcoma, choque séptico refratário	Sim	Não
28	A.V.M.R.G	12 meses	F	insuficiência respiratória, sepse	Sim	Sim
29	L.S.S	41 meses	M	Choque séptico, disfunção renal	Sim	Sim
30	C.C.S.O	30 dias	M	Hepatite aguda grave, laringite	Sim	Não
31	L.C.S.	20 meses	M	Linfoma não Hodgkin	Sim	Sim
32	P.O.C.S	136 meses	M	Malformação de vértebra torácica	Sim	Sim
33	L.C.S	7 meses	M	Síndrome imunodeficiência combinada, transplante MO, rejeição pós-transplante	Sim	Sim
34	L.F.A	181 meses	F	Lupus eritematoso sistêmico	Sim	Sim
35	C.S.A.	11 meses	F	Hidrocefalia com derivação	Sim	Sim

	Pacientes	Idade	Gênero	Doença de base	A.A.E.	C.V.C.
36	F.W.E	165 meses	M	Imunodeficiência Imunoglobulina D	Sim	Sim
37	W.S.C	144 meses	M	Hepatite grave	Sim	Sim
38	J.V.R.O	120 meses	M	Púrpura febril	Sim	Não
39	M.E.F.Q	16 meses	F	Pneumonia intersticial, linfopenia	Sim	Sim
40	M.E.A.S.	-----	F	Síndrome Cri-Du-Chat, pneumonia	Sim	Sim
41	W.S.M.	-----	F	Choque séptico, transplante hepático	Sim	Sim
42	M.E.F.Q	16 meses	F	Pneumonia intersticial, linfopenia	Sim	Sim
43	C.H.N.L	192 meses	M	Leucemia linfática aguda, encefalopatia	Sim	Não
44	N.S.S.	22 meses	M	Cirrose hepática	Sim	Sim
45	N.A.S.C.	151 meses	F	Hepatite auto-imune	Sim	Sim
46	R.P.B.R	25 meses	M	Transplante hepático	Sim	Sim
47	L.G.A.R.	4 meses	M	Síndrome de Alagille	Sim	Sim
48	D.N.P.	59 meses	M	Meduloblastoma disseminado	Sim	Sim
49	C.G.D.A.	33 meses	M	Insuficiência renal aguda	Sim	Sim
50	J.P.S.S.	30 meses	M	Desnutrição crônica grave	Sim	Sim
51	N.T.D.	16 meses	F	Hidrocefalia com derivação	Sim	Sim
52	H.S.R.	10 meses	F	Síndrome genética a/e	Sim	Sim
53	J.S.R.	101 meses	F	Neuroblastoma	Sim	Sim
54	S.R.B.S.	62 meses	F	Glioma de tronco cerebral	Sim	Sim

A.A.E=antibioticoterapia de amplo espectro C.V.C.=cateter venoso central

Anexo D2. Tabela com os resultados das hemoculturas e da *nested* PCR multiplex, terapêutica antifúngica e evolução dos pacientes do estudo

	Pacientes	Hemoculturas	PCR	A.F.	Evolução
1	I.H.S.N	Negativa	Negativa	Sim	Alta
1	I.H.S.N	Negativa	Negativa	Sim	Alta
2	P.R.B.S	***C. parapsilosis***	***C. parapsilosis***	Sim	Óbito
3	L.A.G.D	Negativa	Negativa	Sim	Alta
4	R.V.L.G.S	*S. epidermidis*	***C. parapsilosis + C. tropicalis***	Sim	Alta
5	D.M.G.S	**Negativa**	***C. tropicalis***	Sim	Alta
6	G.L.T	**Negativa**	***C. parapsilosis + C. tropicalis***	Sim	Óbito
7	S.M.B	*S. epidermidis*	Negativa	Sim	Alta
8	S.M.B	Negativa	Negativa	Sim	Alta
9	A.J.F.L	Negativa	Negativa	Sim	Alta
10	E.V.G.S.S	Negativa	Negativa	Sim	Alta
11	M.C.G	***C. albicans***	***C. albicans***	Sim	Alta
12	I.J.S	***C. albicans***	***C. albicans***	Sim	Alta

	Pacientes	Hemoculturas	PCR	A.F.	Evolução
13	V.O.L	Negativa	Negativa	Sim	Alta
14	C.S.S	Negativa	Negativa	Sim	Óbito
15	D.S.G	Negativa	Negativa	Sim	Óbito
16	E.M.G	Negativa	Negativa	Sim	Alta
17	F.S.T	Negativa	Negativa	Não	Óbito
18	J.V.S.S	Negativa	Negativa	Não	Alta
19	J.A.D.G	Negativa	Negativa	Não	Alta
20	L.G.T	Negativa	Negativa	Não	Alta
21	M.K.T.R	Negativa	Negativa	Não	Alta
22	N.F.S	Negativa	Negativa	Não	Alta
23	S.A.C	Negativa	Negativa	Não	Alta
24	Y.G.S.C	Negativa	Negativa	Não	Alta
25	Y.V.C.R.	***C. tropicalis***	***C. tropicalis***	Sim	Óbito
26	F.H.R.A	**Negativa**	***C. parapsilosis***	Sim	Óbito
27	A.O.R	**Negativa**	***C. tropicalis + C. parapsilosis***	Sim	Óbito
28	A.V.M.R.G	Negativa	Negativa	Sim	Alta
29	L.S.S	Negativa	Negativa	Não	Alta
30	C.C.S.O	*S. aureus*	Negativa	Não	Alta
31	L.C.S.	***C. albicans***	***C. albicans***	Sim	Alta
32	P.O.C.S	Negativa	Negativa	Não	Alta
33	L.C.S	Negativa	Negativa	Sim	Alta
34	L.F.A	Negativa	Negativa	Sim	Óbito
35	C.S.A.	***C. albicans***	***C. albicans***	Sim	Alta
36	F.W.E	Negativa	Negativa	Não	Alta
37	W.S.C	Negativa	Negativa	Sim	Óbito
38	J.V.R.O	Negativa	Negativa	Sim	Alta
39	M.E.F.Q	Negativa	Negativa	Não	Alta
40	M.E.A.S.	Negativa	Negativa	Não	Alta
41	W.S.M.	Negativa	Negativa	Sim	Óbito
42	M.E.F.Q	Negativa	Negativa	Não	Alta
43	C.H.N.L	Negativa	Negativa	Não	Óbito
44	N.S.S.	Negativa	Negativa	Não	Alta
45	N.A.S.C.	Negativa	Negativa	Sim	Alta
46	R.P.B.R	*Rhodotorula sp.*	Negativa	Sim	Alta
47	L.G.A.R.	Negativa	Negativa	Sim	Óbito
48	D.N.P.	***C. krusei***	***C. krusei***	Sim	Óbito
49	C.G.D.A.	*P.aeruginosa*	Negativa	Não	Alta
50	J.P.S.S.	Negativa	Negativa	Sim	Alta

	Pacientes	Hemoculturas	PCR	A.F.	Evolução
51	N.T.D.	***C. albicans***	***C. albicans***	Sim	Óbito
52	H.S.R.	Negativa	Negativa	Sim	Alta
53	J.S.R.	Negativa	Negativa	Sim	Alta
54	S.R.B.S.	Negativa	Negativa	Sim	Óbito

A.F.= terapia antifúngica após suspeita de infecção fúngica

Anexo E. Alinhamento entre as sequências gênicas dos amplificados obtidos pela PCR multiplex das amostras dos pacientes e sequências de cepas de *Candida* disponíveis no *GenBank*

***Candida parapsilosis* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: LEMI7662 (gb JN997459.1) x sequenciamento do DNA amplificado do paciente F.H.R.A.**

```
Length=593
Score =  551 bits (298),  Expect = 1e-153
Identities = 298/298 (100%), Gaps = 0/298 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1   TGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAAA 60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 205 TGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAAA 264
```

***Candida tropicalis* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: ATCC 66029 (gb EU266571.1) x sequenciamento do DNA amplificado do paciente F.H.R.A.**

```
Length=521
Score =  665 bits (360),  Expect = 0.0
Identities = 360/360 (100%), Gaps = 0/360 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 2  CAATCCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACTTTTTATTTACAGTCAAACTTGATT  61
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 89 CAATCCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACTTTTTATTTACAGTCAAACTTGATT  148
```

***Candida metapsilosis* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: CBS 10907 (gb FJ872019.1) x sequenciamento do DNA amplificado do paciente A.O.R.**

```
Length=555
Score =  544 bits (294),  Expect = 2e-151
Identities = 298/300 (99%), Gaps = 0/300 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  GCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTTTATTAATTGTCAACTTGATTAACTAATAGTCA  60
         ||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct151 GCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTTATTTAATTGTCAACTTGATTAACTAATAGTCA  210
```

***Candida tropicalis* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: ATCC 66029 (gb EU266571.1) x sequenciamento do DNA amplificado do paciente R.V.L.G.**

```
Length=521
```

```
Score =  647 bits (350),  Expect = 0.0
Identities = 355/357 (99%), Gaps = 2/357 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 2  CAATCCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACTTTTTATTTACAGTC-AACTTGATT 60
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct 89 CAATCCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACTTTTTATTTACAGTCAAACTTGATT 148
```

***Candida parapsilosis* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: ATCC MYA-4646 (gb HQ263346.1) x sequenciamento do DNA amplificado do paciente R.V.L.G.**

```
Length=502
Score =  538 bits (291),  Expect = 9e-150
Identities = 296/298 (99%), Gaps = 2/298 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 1   TGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTC-AA 59
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct 113 TGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAAA 172
```

***Candida tropicalis* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: ATCC 750 (gb AY939810.1) x sequenciamento do DNA amplificado do paciente D.M.G.S.**

```
Length=526
Score =  658 bits (356),  Expect = 0.0
Identities = 356/356 (100%), Gaps = 0/356 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 3  AATCCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACTTTTTATTTACAGTCAAACTTGATTT 62
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 93 AATCCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACTTTTTATTTACAGTCAAACTTGATTT 152
```

***Candida parapsilosis* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: LEMI 7662 (gb JN997459.1) x sequenciamento do DNA amplificado do paciente G.L.T.**

```
Length=593
Score =  525 bits (284),  Expect = 7e-146
Identities = 294/298 (99%), Gaps = 3/298 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  TGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTTATAGTC--A 58
         |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||  |
Sbjct205 TGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAAA 264
```

***Candida tropicalis* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain:** ATCC 66029 **(gb EU266571.1) x sequenciamento do DNA amplificado do paciente G.L.T.**

```
Length=521
Score =  643 bits (348),  Expect = 0.0
Identities = 354/357 (99%), Gaps = 0/357 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 2  CAATCCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACTTTTTATTTACAGTCAAACTTGATT 61
         |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 89 CAATCCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACTTTTTATTTACAGTCAAACTTGATT 148
```

Anexo F. Cálculo dos custos da *nested* PCR multiplex

Custo obtido para a extração de DNA das amostras sanguíneas

Descrição do material para as extrações	Quantidade utilizada por extração	Valor por extração	Valor para 10 extrações
Tubo tipo Falcon de 15ml	01	R$ 0,78	R$ 7,80
Pipeta plástica graduada	01	R$ 0,09	R$ 0,90
Microtubo de 1,5ml	03	R$ 0,15	R$ 1,50
Sais tampão lise	0,01 g	R$ 0,004	R$ 0,04
Proteinase K	4,39 mg	R$ 1,75	R$ 17,50
EDTA	0,1g	R$ 0,29	R$ 2,90
Liticase	0,02 mg	R$ 3,00	R$ 30,0
Tris	0,1g	R$ 0,034	R$ 0,34
Luva descartável	02	R$ 0,28	R$ 2,80
*Ponteira 1.000 µl	05	R$ 0,11	R$ 1,10
*Ponteira 100 µl	05	R$ 0,75	R$ 7,50
Kit de extração de DNA	01	R$ 10,93	R$ 109,30
Total		**R$ 18,17**	**R$ 181,70**

* ponteiras com filtro

Custo do "mix" de reagentes da *nested* PCR multiplex para uma amostra sanguínea

Descrição do material para o preparo do mix	Quantidade utilizada por amostra	Valor unitário dos materiais	Valor para a PCR de 1 amostra
Tubos de 1,5 ml	06	R$ 0,05	R$ 0,30
Tubos de 0,2 ml	16	R$ 0,11	R$ 1,72
*Ponteira 1000 µl	02	R$ 0,10	R$ 0,20
*Ponteira 100 µl	04	R$ 0,20	R$ 0,80
*Ponteira 10 µl	31	R$ 0,15	R$ 4,65
Taq polimerase	20 U	R$ 0,63/U	R$ 12,60
dNTP	9 µl	R$ 0,13	R$ 1,14
Primers	18 µl	R$ 0,004	R$ 0,072
Total			**R$ 21,48**

* ponteiras com filtro; U = unidade

Custo do "mix" de reagentes da *nested* PCR multiplex para 10 amostras sanguíneas

Descrição do material para o preparo do mix	Quantidade utilizada	Valor unitário do material	Valor de 10 amostras
Tubos de 1,5 ml	30	R$ 0,05	R$ 1,50
Tubos de 0,2 ml	53	R$ 0,11	R$ 5,83
*Ponteira 1000 µl	02	R$ 0,10	R$ 0,20
*Ponteira 100 µl	04	R$ 0,20	R$ 0,80
*Ponteira 10 µl	49	R$ 0,15	R$ 7,35
Taq polimerase	66,25 U	R$ 0,63/U	R$ 41,80
dNTP	26,5 µl	R$ 0,13	R$ 3,40
Primers	58,5 µl	R$ 0,004	R$ 0,24
Total			**R$61,12**

***** ponteiras com filtro

Custo para a detecção dos amplificados em géis de agarose

Material utilizado para a detecção	Quantidade utilizada	Valor para uma amostra (1 gel)	Valor para 10 amostras (2 géis)
Gel de agarose	0,1g	R$ 0,28	R$ 0,56
Marcador peso molecular 100 pb	5 µl	R$ 1,09	R$ 2,18
*Ponteira 10 ul	06	R$ 0,18	R$ 0,81
Corante *GelRed*	20ul	R$ 0,38	R$ 0,38
Tampão TAE	300 ml	R$ 0,54	R$ 1,08
Luva descartável	02	R$ 0,28	R$ 0,28
Total		**R$ 2,75**	**R$ 5,29**

pb = pares de base; * ponteiras sem filtro

Custo final do teste molecular para 1 e para 10 amostras simultâneas

No. amostras	Extração de DNA	"Mix" de reagentes	Detecção dos amplificados	Total	Por amostra	Adicional de 20%
1	R$ 18,17	R$ 21,48	R$ 2,75	R$ 42,40	**R$ 42,40**	**R$ 50,88**
10	R$ 181,70	R$ 61,12	R$ 5,29	R$ 248,11	**R$ 24,81**	**R$ 29,77**

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis*. 2006; 43: s15-27.

Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005; 411-418.

Aragão PA, Oshiro ICV, Manrique EI, Gomes CC, Matsuo LL, Leone C, et al. *Pichia anomala* outbreak in a nursery: exogenous source? *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20(9):843-8.

Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J Virol*. 2000;74(19):8913-21.

Arendrup MC, Bergmann OJ, Larsson L, Nielsen HV, Jarløv JO, Christensson B. Detection of candidaemia in patients with and without underlying haematological disease. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):855-62.

Assis DB, Madalosso G, Ferreira AS, Yassuda, YY. Análise dos dados do sistema de vigilância de infecção hospitalar do Estado de São Paulo – ano 2009. *Boletim Epidemiológico Paulista*. Agosto 2010; 7(80).

Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):665-70.

Awasthi AK, Jain A, Awasthi S, Ambast A, Singh K, Mishra V. Epidemiology and microbiology of nosocomial pediatric candidemia at a northern indian tertiary care hospital. *Mycopathologia*. 2011;172(4):269-77.

Barchiesi F, Tortorano AM, Falconi Di Francesco L, Rigoni A, Giacometti A, Spreghini E, et al. Genotypic variation and antifungal susceptibilities of *Candida pelliculosa* clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2005;54(3):279-85.

Blinkhorn RJ, Adelstein D, Spagnuolo PJ. Emergence of a new opportunistic pathogen, *Candida lusitaniae*. *J Clin Microbiol*. 1989;27(2):236-40.

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

Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, D'Enfert C, Fagon J, Amrein C, et al. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med*. 2008;34(2):292-9.

Buttery JP. Blood cultures in newborns and children: optimising an everyday test. *Arch Dis Childhood Fetal Neonatal Ed*. 2002;87(1):F25-8.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(7):327-35.

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

Celebi S, Hacimustafaoglu M, Koksal N, Ozkan H, Cetinkaya M, Ener B. Neonatal candidiasis: results of an 8 year study. *Pediatr Int*. 2012;54(3):341-9

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

Chakrabarti A, Singh K, Narang A, Singhi S, Batra R, Rao KLN, et al. Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a tertiary-care center in northern India. *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1702-6.

Chapman, RL. *Candida* infections in the neonate. *Curr Opin Pediatr*. 2003;15(1):97-102

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

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

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

Colombo AL, Nucci M, Benjamin JP, Nouér AS, Arthington-Skaggs B, Matta DA, Warnock D, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006: 2816-33.

Cortés JA, Reyes P, Gómez C, Buitrago G, Leal AL. Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. *Rev Iberoam Micol*. 2011;28(2):74-8.

Cuenca-Estrella M. Laboratory diagnosis of fungal infection diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(5):257-64.

Del Negro GMB. Identificação de cinco espécies de *Candida* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com

risco para candidemia [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2008.

Del Negro GMB, Delgado AF, Manuli ER, Yamamoto L, Okay TS. Dual candidemia detected by nested polymerase chain reaction in two critically ill children. *Med Mycol*. 2010;48(8):1116-20.

Diaz Granados CA, Martinez A, Deaza C, Valderrama S. An outbreak of *Candida* spp. bloodstream infection in a tertiary care center in Bogotá, Colombia. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(5):390-4.

Drago M, Scaltrito MM, Morace G. *In vitro* activity of voriconazole and other antifungical agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 619-24.

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

Enomoto M, Morioka I, Morisawa T, Yokoyama N, Matsuo M. A novel diagnostic tool for detecting neonatal infections using multiplex polymerase chain reaction. *Neonatology.* 2009;96(2):102-8.

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

Fernandez J, Erstad BL, Petty W, Nix DE. Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64(4):402-7.

Fidel Jr. PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):80-96.

Figueiredo RMP, Naveca FG, Bastos MDS, Melo MDN, Viana SDS, Mourão MPG, et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(4):667-9.

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

Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. *Pediatrics*. 2006; 117: 1680-7.

Galván B, Mariscal F. Epidemiologia de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol*. 2006; 23: 12-5.

Girão E, Levin AS, Basso M, Gobara S, Gomes LB, Medeiros EAS, et al. Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in intensive care units at a Brazilian university hospital. *Med Mycol*. 2008;46(6):581-8.

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

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*. 1997;23(3):504-11.

Hernández-Castro R, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Álvarez-Verona E, Hernández-Delgado L, et al. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur J Pediatr*. 2010;169(7):783-7.

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

Ibelings MS, Maquelin K, Endtz HP, Bruining HA, Puppels GJ. Rapid identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by raman spectroscopy. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(5):353-8.

Innings A, Ullberg M, Johansson A, Rubin CJ, Noreus N, Isaksson M, et al. Multiplex real-time PCR targeting the RNase P RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(3): 874-880.

Isaacman DJ, Karasic RB, Reynolds EA, Kost SI. Effect of number of blood cultures and volume of blood on detection of bacteremia in children. *J Pediatr*. 1996;128(2):190-5.

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

Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent J. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med.* 2011;39(4):665-70.

Kim SH, Shin JH, Joo MY, Lee MK, Lee HS, Kim MN, et al. Genetic relationship of fluconazole non-susceptible *Candida glabrata* isolates from nine korean hospitals. *Mycoses*. 2011;54(5):e659-62.

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

Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobioal bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 59: 401-6.
Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*. 2008;3(9):1452-6.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The yeasts*: a taxonomic study. 5ed. Elsevier; 2011.

Lau A, Halliday C, Chen SCA, Playford EG, Stanley K, Sorrell TC. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 811-6.

Lau A, Sorrell TC, Chen S, Stanley K, Iredell J, Halliday C. Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):3021-7.

Li YL, Leaw SN, Chen J-, Chang HC, Chang TC. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22(11):693-6.

Liguori G, Lucariello A, Colella G, De Luca A, Marinelli P. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J Clin Pathol*. 2007;60(9):1035-9.

Linhares IM, Witkin SS, Miranda SD, Fonseca AM, Pinotti JA, Ledger WJ. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2001;9(4):221-5.

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

Löeffler J, Schmidt K, Hebart H, Schumacher U, Einsele H. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA pure LC system. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2240-3.

Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2252-8.

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

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

Maródi L, Johnston Jr RB. Invasive *Candida* species disease in infants and children: occurrence, risk factors, management, and innate host defense mechanisms. *Curr Opin Pediatr*. 2007; 19: 693-697.

Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1866-71.

McCrossan BA, McHenry E, O'Neill F, Ong G, Sweet DG. Selective fluconazole prophylaxis in high-risk babies to reduce invasive fungal infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007; 92: f454-8.

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

Méndez-Álvarez S, Pérez-Roth E. La PRC multiplex em microbiologia clínica. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2004; 22(3): 183-91.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res*. 1988; February 11, 16 (3): 1215.

Mokaddas E, Burhamah MHA, Khan ZU, Ahmad S. Levels of (1→3)-β-D-glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA in serum samples of pediatric cancer patients colonized with *Candida* species. *BMC Infect Dis*. 2010;10:292.

Molina AL, Tobo PR. Série – Biologia molecular – Atualização parte 2 – Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Einstein*. 2004; 2(2): 139-42.

Molina GFJ, León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P. Assessment of candidemia-attributable mortality in critically ill patients using propensity score matching analysis. *Critical Care*. 2012;16(3).

Motta AL, de Almeida GMD, de Almeida Jr. JN, Burattini MN, Rossi F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(5):441-8.

Mylotte JM, Tayara A. Blood cultures: clinical aspects and controversies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(3):157-63.

Negri M, Silva S, Henriques M, Azeredo J, Svidzinski T, Oliveira R. *Candida tropicalis* biofilms: artificial urine, urinary catheters and flow model. *Med Mycol*. 2011;49(7):739-47.

Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, et al. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, β-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2012;54(9):1240-8.

Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet*. 2009;55(5):497-509.

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

Pasqualini L, Mencacci A, Leli C, Montagna P, Cardaccia A, Cenci E, et al. Diagnostic performance of a multiple real-time PCR assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1285-8.

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

Paudel D, Jarman R, Limkittikul K, Klungthong C, Chamnanchanunt S, Nisalak A, et al. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time Taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. *North Am J Med Sci*. 2011;3(10):478-85.

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

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

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):515-21.

Pfeiffer CD, Samsa GP, Schell WA, Reller LB, Perfect JR, Alexander BD. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures*. J Clin Microbiol*. 2011;49(8):2879-83.

Pletz MW, Wellinghausen N, Welte T. Will polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostics improve outcome in septic patients? A clinical view. *Intensive Care Med*. 2011;37(7):1069-76.

Pontón J, Del Palacio A. Avances y limitaciones del diagnóstico precoz de lás infecciones invasoras causadas por leveduras. *Rev Iberoam Micol*. 2007; 24: 181-86.

Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47: 487-96.

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

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

Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols.* 2009;4(4):1-6.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol*. 1994;41(5):295-310.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning – A laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbour; 2001.

See LLC. Bloodstream infection in children. *Pediatr Crit Care Med*. 2005; 6: s42-4.

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

Sobel JD, Wiesenfeld HC, Martens M, Danna P, Hooton TM, Rompalo A, et al. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. *N Engl J Med*. 2004;351(9): 876-83.

Spiliopoulou A, Dimitriou G, Jelastopulu E, Giannakopoulos I, Anastassiou ED, Christofidou M. Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. *Mycopathologia.* 2012;173(4):219-28.

Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005;43(1):284-92.

Telenti A, Steckelberg JM, Stockman L, Edson RS, Roberts GD. Quantitative blood cultures in candidemia. *Mayo Clin Proc*. 1991;66(11):1120-3.

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

Trofa D, Gácser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):606-25.

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

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

Weinstein MP. Current blood culture methods and systems: clinical concepts, technology, and interpretation of results. *Clin Infect Dis*. 1996;23(1):40-6.

Weitkamp JH, Ozdas A, LaFleur B, Potts AL. Fluconazole prophylaxis for prevention of invasive fungal infections in targeted highest risk preterm infants limits drug exposure. *J Perinatol*. 2008; 28: 405-11.

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

White PL, Barton R, Guiver M, Linton CJ, Wilson S, Smith M, et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: A United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Molec Diagn*. 2006;8(3):376-84.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 309-17.

Xavier PCN, Chang MR, Nunes MO, Palhares DB, Silva RA, Bonfim GF, et al. Neonatal candidemia in a public hospital in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):459-63.

Yamamura ML, Abranmczyk ML, Carvalho ES. Fungemias em pediatria - Parte 1. *Pediatria Moderna*. 2001; 37: 286-304.

Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis*. 2005;41(9):1232-9.

Zaoutis TE, Prasad PA, Localio AR, Coffin SE, Bell LM, Walsh TJ, et al. Risk factors and predictors for candidemia in pediatric intensive care unit patients: implications for prevention. *Clin Infect Dis*. 2010;51(5):e38-45.

Zilberberg MD, Kollef MH, Arnold H, Labelle A, Micek ST, Kothari S, Shorr AF. Inappropriate empiric antifungal therapy for candidemia in the ICU and hospital resource utilization: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2010;10:150