

João Paulo Zen Siqueira

BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DE
FUNGEMIAS: PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS E COMPARAÇÃO COM
MÉTODOS CONVENCIONAIS

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Microbiologia junto ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus São José do Rio Preto.

Orientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto

2012

Siqueira, João Paulo Zen.

Biologia molecular como ferramenta para o diagnóstico de fungemias: padronização de protocolos e comparação com métodos convencionais / João Paulo Zen Siqueira. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

67 f. : 5 il. ; 30 cm.

Orientador: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Biologia molecular. 2. Fungos patogênicos. 3. Micologia médica. 4. Microbiologia. I. Almeida, Margarete Teresa Gottardo de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 582.28

JOÃO PAULO ZEN SIQUEIRA

BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DE
FUNGEMIAS: PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS E COMPARAÇÃO COM
MÉTODOS CONVENCIONAIS

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Microbiologia junto ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
FAMERP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro
Instituto de Medicina Tropical, USP – São Paulo

Prof. Dr. Fernando Góngora Rubio
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 25 de Junho de 2012

Agradecimentos

Primeiramente à Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida pela oportunidade, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo tempo despendido comigo, aceitando ter sido minha orientadora. Espero poder retribuir.

Ao Dr. Fernando G. Rubio e à Dra. Gilda M. B. Del Negro, não somente por terem aceitado fazer parte da banca examinadora, mas pelos conselhos e solicitude, sempre dispostos a ajudar.

À Dra. Mara C. L. Nogueira e Dra. Elza M. Castilho, por terem participado da banca de qualificação e pelas sugestões de melhora do trabalho; além da amizade;

À Carolina C. Pacca por ter sido sempre muito solícita comigo, me ajudou muito com meu projeto. Obrigado pelas dicas e pelas coletas de sangue!

Ao “irmão” Tiago Casella pela ajuda dentro do laboratório e pela amizade fora dele;

À Tatiana Colombo e Keith Cunha pelos ensinamentos e disponibilidade para ajudar;

A todo o pessoal do Laboratório de Microbiologia, mesmo aqueles que já não estão mais lá, mas que me aguentaram pelo menos durante uma parte do meu projeto: Juliana, Natália Fiorilli, Natália Brizzotti, Ariane, Gislaíne, Eduardo, Mayara, Máira, Vanessa, Flávia, Leandro, Luana, Milena, e todos os outros. E, claro, à Luceli. Ela não é tão querida por todos à toa;

Ao Dr. Maurício L. Nogueira e todos do Laboratório de Pesquisa em Virologia da FAMERP, por abrirem as portas do laboratório, permitindo que eu realizasse grande parte do meu projeto lá;

A todos os pacientes e profissionais do Hospital e funcionários da FAMERP e Ibilce/UNESP que me ajudaram realizar este projeto. Não cito nomes por temer esquecer alguém, mas sem eles, o projeto não teria saído do papel;

A minha família e amigos, novamente sem citar nomes para não cometer injustiças, mas que estão sempre comigo me apoiando.

Resumo

As Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) estão entre as principais causas de morbidade e de mortalidade em ambiente hospitalar. Neste panorama, destacam-se as fungemias, que são estabelecidas quando há um comprometimento da resposta da resposta imune do hospedeiro. Os avanços médicos nas últimas duas décadas melhoraram a sobrevivência dos pacientes críticos, o que levou a um aumento de infecções em UTI. O método diagnóstico atualmente utilizado para este tipo de infecção (hemocultura) é lento e apresenta baixa sensibilidade. Demais alternativas de diagnóstico rápido são essenciais por permitir a adoção da terapia antimicrobiana correta e diminuir o tempo de internação, evitando gastos e sobrecarga ao sistema de saúde. Deste modo, métodos moleculares são promissores por serem mais rápidos, precisos e sensíveis. Sendo assim, o objetivo geral deste estudo foi avaliar comparativamente técnicas laboratoriais diagnósticas para fungemia – método molecular (*nested* PCR) *versus* cultura – e associar aos aspectos clínicos dos pacientes, tempo de realização e custos. A população foi composta por 89 pacientes, sendo 67 provenientes de UTI Geral e 22 de UTI Neonatal, todos com suspeita de infecção sistêmica. Foram colhidas 118 amostras de sangue no total. Parte deste sangue era enviada ao Hospital, seguindo a rotina de hemocultura. Outra parte era destinada a realização da metodologia molecular. Após padronização, foi obtido como limiar de detecção da técnica, 10 células fúngicas por 4 ml de amostra. Em 46 (51,7%) foi detectada fungemia pelo *nested* PCR. Correlacionando com os fatores de risco, as doenças de caráter pulmonar, cardíaco e renal foram as doenças de base prevalentes; enquanto que o uso de cateter venoso central, ventilação mecânica e terapia antimicrobiana prévia foram os fatores de risco relevantes. Comparativamente, ambos os métodos revelaram concordância para apenas um caso positivo, de onde se obteve *Candida parapsilosis* na hemocultura, e em 36 casos negativos. No entanto, das 77 hemoculturas negativas, a discordância foi notada em 41 (53,3%) casos, positivos pós *nested* PCR. Em 14,4% das hemoculturas caracterizou-se pelo achado de grupos bacterianos. Nas amostras de sangue seriadas (22 pacientes) houve discordâncias pelo método molecular e cultura. No entanto, a concordância ocorreu em 11 casos para o *nested* PCR e em 12 para hemocultura. A Biologia Molecular mostrou ser um método mais rápido que hemocultura, sendo necessárias 10,5 h para emissão do resultado, comparados os 7 dias para hemocultura. Além disso, a metodologia molecular também se mostrou factível economicamente, possuindo um valor aproximado de R\$16,80, frente à hemocultura, onde foram observados valores de R\$18,48,

R\$26,00 e R\$35,00, de acordo com o plano de saúde (SUS, convênio, particular, respectivamente). Diante do exposto, conclui-se que o *nested* PCR é uma ferramenta diagnóstica importante por ser mais rápida e sensível que a cultura, podendo evitar gastos desnecessários e melhorar a evolução dos pacientes.

Palavras-chave: fungemia; diagnóstico molecular; *nested* PCR; hemocultura.

Abstract

Health-care associated infections (HAI) are among the leading causes of morbidity and mortality in a hospital environment. Medical advances over the past two decades have improved the survival of critically ill patients, which led to an increase of infections in ICU. In this scenario, stand out the fungemias, which are established when there is an impairment of host immune response. The diagnostic method currently used for this type of infection (blood cultures) is slow and has low sensitivity. A rapid diagnosis is essential to allow the adoption of the correct antimicrobial therapy and reduce hospitalization time, avoiding expenses and a burden the health-care system. Therefore, molecular methods for diagnosis are promising because they are faster, more accurate and more sensitive than conventional methods. Thus, the main objective of this study was to comparatively evaluate laboratory diagnostic techniques for fungemia – molecular method (nested PCR) versus culture – in association with clinical features of patients, performance time and its costs. The population consisted of 89 patients, 67 from General ICU and 22 from Neonatal ICU, all with suspicion of systemic infection. Were collected a total of 118 blood samples. A portion of this blood was sent to hospital, following the normal routine. Another part was destined to realization of the molecular method. After standardization, the detection threshold found was 10 fungal cells per 4 ml of sample. Considering the patients, in 46 (51.7%) fungemia was detected by nested PCR. Correlating with risk factors, pulmonary, cardiac and renal diseases were the most relevant underlying diseases; whereas, the use of central venous catheters, mechanical ventilation and prior antimicrobial therapy were the most important clinical features. In comparison, both methods revealed agreement for only one positive case, where the blood culture identified *Candida parapsilosis*, and 36 negative cases. However, of the 77 negative blood cultures, the discrepancy was observed in 41 (53.3%) cases, were positive after nested PCR. The remaining blood cultures (14.4%) were characterized by the finding of bacterial groups. From patients who had more than one blood sample (22), there were disagreement by both methods, molecular and culture. Nevertheless, the agreement occurred in 11 cases by nested PCR, whereas in 12 cases by the blood culture. Molecular Biology has proved to be much faster, requiring 10.5 h to release the result, against an average of 7 days for the release of the blood culture result. The molecular methodology also proved to be economically feasible, costing approximately R\$ 16.80, compared with blood culture, which was R\$ 18.48 R\$ 26.00 and R\$ 35.00, according to the health plan (SUS, health insurance, and private,

respectively). Given the above, the conclusion is that the nested PCR is an important diagnostic tool, because it is faster and more sensitive than culture, and can avoid unnecessary costs and improve patient outcomes.

Key-words: fungemia; molecular diagnoses; nested PCR; blood culture.

Lista de Ilustrações

- Figura 1:** Organização genômica do rDNA 18S, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2, e 26S rDNA.....28
- Figura 2:** Gel de agarose com produtos da reação *nested* PCR. As linhas de 1 e 2 correspondem reações positivas de diluições decrescentes de células fúngicas. As linhas 3 e 4 correspondem às diluições onde o DNA não foi detectado; linha 5, o controle positivo e a 6, o controle negativo da reação; M, marcador de peso molecular 100pb.....31
- Figura 3:** Gel de agarose com produtos da reação *nested* PCR. As reações positivas são apresentadas nas linhas 1, 3, 4, 5 e 7; as negativas, 2, 6, 8, 9, 10, 11 e 12. Linha 13 corresponde ao controle positivo (*C. albicans*) e a linha 14 ao controle negativo de reação. M, Marcador de peso molecular de 50pb.....32
- Figura 4:** Distribuições dos pacientes do SUS de acordo com os valores dos procedimentos médico-hospitalares e os respectivos tempos totais de internação. As retas correspondem às tendências lineares. (nPCR+ = *nested* PCR positivo; nPCR- = *nested* PCR negativo).....38
- Figura 5:** Distribuições dos pacientes de convênios de acordo com os valores dos procedimentos médico-hospitalares e os respectivos tempos totais de internação. As retas correspondem às tendências lineares. (nPCR+ = *nested* PCR positivo; nPCR- = *nested* PCR negativo).....39

Lista de Tabelas

Tabela 1: Distribuição dos pacientes segundo Unidade de Terapia Intensiva de origem e correspondente resultado da reação de <i>nested</i> PCR.....	32
Tabela 2: Dados demográficos, características clínicas e evolução dos pacientes.....	34
Tabela 3: Distribuição de espécies bacterianas obtidas de hemoculturas, aspectos demográficos, origem hospitalar, terapia antimicrobiana e evolução dos pacientes, em associação com <i>nested</i> PCR.....	35
Tabela 4: Distribuição de amostras seriadas, correspondentes resultados de provas laboratoriais (<i>nested</i> PCR e hemocultura), e intervalo entre as coletas (com relação à primeira).....	36
Tabela 5: Distribuição de pacientes segundo planos de saúde para atendimento hospitalar e gastos financeiros por dias de internação (Média dos valores em Reais R\$).....	38

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CVC	Cateter Venoso Central
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desorribonucleotídeo Trifosfatado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDSA	Sociedade Americana de Doenças Infecciosas
IPCS	Indicadores de Infecção de Corrente Sanguínea
IRAS	Infecções relacionadas à Assistência à Saúde
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaçador Interno Transcrito)
KCl	Cloreto de Potássio
KH_2PO_4	Hidrogenofosfato de Potássio
KHCO_3	Bicarbonato De Potássio
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
Na_2HPO_4	Hidrogênio Fosfato Dissódico
NH_4Cl	Cloreto de Amônio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
rDNA	DNA ribossomal
SUS	Sistema Único de Saúde
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

Lista de Símbolos

μl	Microlitro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Célsius
d	Dias
G	Força Gravitacional
h	Horas
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
v	Volts

Sumário

1. Introdução.....	15
1.1. Infecções em âmbito hospitalar.....	16
1.2. Fungemias.....	16
1.2.1. Candidemias.....	17
1.3. Fatores de Risco.....	17
1.4. Epidemiologia.....	18
1.5. Diagnóstico.....	19
1.6. Tratamento e Evolução.....	21
2. Relevância e Justificativa.....	22
3. Objetivos.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	25
3.2. Objetivos Específicos.....	26
4. Material e Métodos.....	26
4.1. População do Estudo.....	27
4.2. Amostras.....	27
4.3. Diagnóstico Molecular por <i>nested</i> PCR.....	28
4.3.1. Extração de DNA.....	28
4.3.2. Controles da Extração do DNA.....	28
4.3.3. Reação de <i>nested</i> PCR.....	29
4.3.4. Eletroforese em gel de agarose.....	30
4.4. Análise de valores de custo.....	30
4.5. Análise Estatística.....	30
5. Resultados.....	31
5.1. Coleta de sangue e quantificação do DNA.....	32
5.2. <i>Nested</i> PCR – Limiar de detecção e resultados dos pacientes.....	32
5.3. <i>Nested</i> PCR – Associação dos Resultados com dados clínicos.....	34
5.4. Hemocultura – Comparação com o <i>nested</i> PCR.....	36
5.5. Amostras seriadas.....	37
5.6. <i>Nested</i> PCR – tempo de realização do diagnóstico <i>versus</i> hemocultura.....	38
5.7. Custos envolvidos com diagnóstico e internação prolongada.....	38
6. Discussão.....	41

7. Conclusões.....	47
8. Referências Bibliográficas.....	49
Apêndice.....	65

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Infecções em âmbito hospitalar

De acordo com o Ministério da Saúde, as Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), ou seja, as infecções adquiridas em ambiente hospitalar, estão entre as principais causas de morbidade e de mortalidade e, conseqüentemente, da elevação de custo para o tratamento dos pacientes (ANVISA, 2006).

Desde 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) delibera que indicadores de infecção de corrente sanguínea (IPCS), sejam notificados, particularmente em pacientes em uso de cateter venoso central (CVC), em unidades de terapia intensiva (UTI) (ANVISA, 2010). Este ambiente representa a interface entre os pacientes graves, que recebem terapias múltiplas e agressivas, e os patógenos resistentes, que são selecionados pelo uso de terapia antimicrobiana prolongada (MEERSSEMAN *et al.*, 2007). Dado este panorama, seguem-se elevados os gastos, com sobrecarga para o sistema de saúde. De fato, a dimensão do problema das IRAS provocadas por fungos vem sendo investigada, considerando-se vários levantamentos que estudam fatores de risco, frequência dos agentes e o grau de susceptibilidade aos antimicrobianos, com a finalidade de monitorar as mudanças epidemiológicas e os impactos na saúde pública (PERMÁN *et al.*, 2011; RYAN *et al.*, 2010).

Os avanços nas últimas duas décadas no suporte intensivo, nas técnicas operatórias e nas estratégias profiláticas e pré-emptivas, melhoraram a sobrevida dos pacientes críticos e comprometidos com a resposta imune. Como consequência destes avanços médicos, a incidência das infecções de origem fúngica no ambiente hospitalar vem aumentando exponencialmente (ALANGADEN, 2011; ALP-MESE *et al.*, 2011).

1.2. Fungemias

A frequência de infecção da corrente sanguínea causada por fungos aumentou significativamente, sendo considerada a quarta causa de sepse, correspondendo entre 5% a 10% dos casos (ALMIRANTE *et al.*, 2005; HORN *et al.*, 2009; KAUFFMAN, 2006; RODRIGUES, 2009; SHOHAM & MARWAHA, 2010), sendo também muito relevante entre os neonatos (BLYTH *et al.*, 2009; SPILIOPOULOUS *et al.*, 2011). Em unidades de terapia intensiva (UTI), a infecção pelo gênero *Candida* pode ser ainda mais frequente, sendo

responsável por 90 a 95% das infecções fúngicas documentadas (ALANGADEN, 2011; BORGES *et al.*, 2009; EGGIMANN *et al.*, 2011). No entanto, outros fungos emergentes são capazes de se disseminar pela corrente sanguínea. Os gêneros *Histoplasma* e *Cryptococcus*, conhecidos por provocarem doenças fúngicas muito severas, podem ser agentes de fungemias. Ainda, o gênero *Trichosporon* e fungos filamentosos como *Aspergillus spp.*, podem se aproveitar de um estado susceptível do hospedeiro para provocar uma infecção sistêmica (COUTO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2010).

A infecção fúngica sistêmica ocorre quando é estabelecido um comprometimento nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Micro-organismos comensais ou colonizantes disseminam-se via hematogênica ou por translocação tecidual, originando assim diversos tipos de infecções em diferentes órgãos: cardíacos, digestórios, respiratórios, hepáticos, renais, oculares e sistema nervoso central, observados de forma isolada ou associada, de caráter transitório e auto-limitado (COLOMBO *et al.*, 2003; SIDRIM & ROCHA, 2004). O gerenciamento deste tipo de infecção continua um desafio e os gastos gerados são elevadíssimos (ALANGADEN, 2011; MOTTA *et al.*, 2010; PAGANO & LUMB, 2011).

1.2.1. Candidemias

Atualmente, a candidemia (fungemia causada pelo gênero *Candida*) é reconhecida como grave problema de saúde pública nas regiões em desenvolvimento, mas também é preocupante nos países desenvolvidos. A gravidade da doença, associada a condições debilitantes do paciente, leva a um aumento do tempo de internação hospitalar, acarretando uma sobrecarga ao sistema de saúde. (ALANGADEN, 2011; MORGAN *et al.*, 2005, VINCENT *et al.*, 2009; ZILBERBERG *et al.*, 2011).

1.3. Fatores de Risco

A caracterização da fonte de infecção sistêmica por *Candida* tem sido considerada tema para debate, uma vez que sua origem exógena ou endógena vem sendo demonstrada (ALANGADEN, 2011; ZAOUTIS *et al.*, 2010). Porém, para o estabelecimento da infecção, estão envolvidos os fatores de risco, que aumentam consideravelmente a probabilidade de aquisição de uma fungemia. A saber, os principais: pacientes neutropênicos; transplantados; queimados; oncológicos; diabéticos; idosos; em uso de antibióticos de amplo espectro; de

quimioterápicos; de corticosteróides; submetidos à ventilação mecânica; cateteres intravenosos e internação hospitalar prolongada (ALMIRANTE *et al.*, 2005; ÀSMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2002; DOTIS & ROILIDES, 2011; HACHEM *et al.*, 2008; HORN *et al.*, 2009; KAVANAGH, 2005; MOTTA *et al.*, 2010; MIKULSKA *et al.*, 2011; PERES-BOTA *et al.*, 2004; SHOHAM & MARWAHA, 2010; TORTORANO *et al.*, 2004; WATSON *et al.*, 2003; ZAOUTIS *et al.*, 2010). Já, em se tratando de pacientes pediátricos, além desses existem fatores específicos que prolongam o tempo de internação e aumentam as chances do desenvolvimento da candidemia: malformação congênita, prematuridade (idade gestacional menor que 32 semanas), baixo peso e sistema imune imaturo (SAIMAN *et al.*, 2000; BENJAMIN *et al.*, 2006; FRIDKIN, 2005).

1.4. Epidemiologia

Considerando-se a epidemiologia, importantes diferenças podem ser observadas entre hospitais, provavelmente refletindo diferenças entre as populações de pacientes e fatores de risco aos quais estão submetidas (MOTTA *et al.* 2010; NUCCI *et al.*, 2010).

Com relação ao Brasil, os padrões epidemiológicos são complexos, dadas as dimensões continentais e diferenças socioeconômicas presentes no país.

Estudos epidemiológicos brasileiros sobre candidemia revelam índices de ocorrência significativos, de 1,87 a 2,49 casos por 1.000 admissões (COLOMBO *et al.*, 2006; MOTTA *et al.*, 2010). Entre países europeus, a incidência de candidemia é em geral menor, mas a variação é grande, sendo de 0,17 (Finlândia e França) a 20 (Alemanha) casos por 1.000 admissões, sendo que a Dinamarca possui taxas ainda maiores (os fatores que ocasionam essa taxa elevada ainda estão sendo investigados) (ARENDROP *et al.*, 2008; LASS-FLÖRL, 2009). Já nos Estados Unidos, a taxa varia de 0,3 a 0,42 casos por 1.000 admissões, dependendo da população estudada (ZAOUTIS *et al.*, 2005), números bem mais baixos do que os encontrados no Brasil.

Com relação à etiologia das fungemias, como dito anteriormente, mais de 90% são causadas por espécies de leveduras do gênero *Candida* (EGGIMANN *et al.*, 2011; BORGES *et al.*, 2009; MORACE e BORGUI, 2010), sendo *C. albicans* a espécie mais comum (45-65%). Paralelamente, o grupo denominado não-albicans vem merecendo destaque, uma vez que índices maiores de frequência estão sendo observados para *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* (AWASTHI *et al.*, 2011; ORTEGA

et al., 2011; PÉRMAN, *et al.*, 2011; TORTORANO *et al.*, 2004). Em pacientes com doenças malignas hematológicas, *Candida* não-albicans (como *C. glabrata* e *C. krusei*) são muito comumente observadas (ORTEGA *et al.*, 2011). Já *C. parapsilosis* é prevalente na população pediátrica, especialmente em associação com cateteres intravenosos (TORTORANO *et al.*, 2004). No entanto, dado este mesmo grupo, na Índia, *C. tropicalis* é a espécie prevalente (AWASTHI *et al.*, 2011).

Considerando-se diferenças geográficas entre países do continente americano, observa-se que, ao Norte, *C. glabrata* como espécie prevalente nas fungemias (BODEY *et al.*, 2002). Já ao Sul, estudos demonstram um predomínio de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (BRILHANTE *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2003; ELLIS *et al.*, 2003; MARCHETTI *et al.*, 2004). Especificamente, o Brasil é considerado o país com prevalência para espécie *C. albicans* para os quadros clínicos de acometimento sistêmico e, dentro das espécies não-albicans, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* se destacam (ANTUNES *et al.*, 2004; COLOMBO *et al.*, 2006; GODOY *et al.*, 2003; GOLDANI & MARIO, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2002; RESENDE *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2001).

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico de fungemia é limitado pela falta de especificidade das apresentações clínicas, baixa sensibilidade de cultivo, pela falta de utilidade dos testes sorológicos e pela indisponibilidade de métodos moleculares padronizados (DARK *et al.*, 2009; SAN-BLAS E BURGER, 2011).

Historicamente, o diagnóstico de uma infecção fúngica era feito pela correlação entre sinais clínicos e sintomas da doença, (ATKINS & CLARK, 2004; ALEXANDER & PFALLER, 2006) ou então por técnicas de microscopia (histopatologia e corantes fluorescentes) e de cultura (WENGENACK & BINNICKER, 2009). Tais métodos adjuntos aos testes bioquímicos para detecção e identificação de *Candida* apresentam baixa sensibilidade e especificidade. Dado que a precisão, aliada ao rápido diagnóstico, são considerados como elementos-chave para redução dos índices de mortalidade e dos custos gerados ao Sistema de Saúde (DARK *et al.*, 2009; MOTTA *et al.*, 2010; SHOHAM & MARWAHA, 2010).

Dentre todos os recursos utilizáveis para detecção e controle de IRAS, o laboratório de microbiologia clínica é preponderante. Classicamente, a maioria dos isolados é de origem

bacteriana, mas impulsionados por diversos fatores de risco, os fungos passaram a uma posição de destaque no contexto das infecções hospitalares. Com isso, há a demanda para o avanço da tecnologia diagnóstica das infecções fúngicas, que acompanhe os desafios impostos pelos agentes infecciosos (PFALLER et al., 2001). Assim, uma série de métodos que não são baseados na cultura do micro-organismo está sendo extensivamente estudada. Estes métodos são principalmente baseados na detecção de moléculas específicas dos agentes fúngicos, e na Biologia Molecular, que tem como alvo, sequencias específicas do DNA destes agentes (MAYR & LASS-FLÖRL, 2011). Antígenos, anticorpos e metabólitos funcionam como marcadores de infecção por serem específicos de espécies de fungos clinicamente relevantes. Entre eles: antígenos como a manana, metabólitos como o arabinitol-L/D, componentes da parede celular fúngica como a β -glucana e a galactomanana (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Por parte dos métodos moleculares, eles vêm sendo adotados, por análise de regiões do genoma fúngico e diretamente de amostras clínicas, com uma perspectiva factível para aplicação em laboratórios clínicos e com maior poder de detecção que a cultura (DEL NEGRO, 2008; SIDRIM *et al.*, 2010), no entanto, ainda são usados basicamente somente na pesquisa. A técnica molecular mais comum é a reação em cadeia da polimerase (PCR), poderosa ferramenta capaz de amplificar segmentos de DNA *in vitro*, por ação enzimática da DNA polimerase (WHITE *et al.*, 2009). Caracteristicamente, tem o potencial de melhorar o diagnóstico de infecção fúngica de modo específico, sensível e rápido. Além disso, dados preliminares indicam que testes diagnósticos baseados em PCR guiam a terapêutica antifúngica, o que leva à redução de mortalidade e diminuição de tratamentos desnecessários, evitando custos e toxicidade (KOURKOUMPETIS *et al.*, 2012). Este procedimento, quando padronizado, é rápido, seguro, sensível, e dispensa a realização de cultura (ATKINS & CLARK, 2004; DEAN & DARK, 2010; WENGENACK & BINNICKER, 2009). Existem muitas variações da reação de PCR, cada uma com uma característica diferente, que responde melhor à necessidade imposta pela amostra clínica. WHITE et al. (2009) acreditam que, para o teste direto de espécimes clínicos, com limitados alvos de DNA, o *nested* ou *semi-nested* PCR (variações do PCR convencional onde são realizadas duas rodadas de amplificação, e o produto da primeira reação serve de molde para a segunda) são mais indicados, pois aumentam em muito a sensibilidade do método (WHITE *et al.*, 2009).

Apesar de promissor, o diagnóstico molecular ainda é considerado elaborado e sua padronização é pré-requisito obrigatório: a escolha da amostra biológica e o volume a serem

testados, o método de extração do DNA, e os parâmetros de ciclagem da reação são essenciais para o sucesso da técnica, e devem ser amplamente estudados (KLUTTS & ROBINSON-DUNN, 2011) para que possa haver aumento da sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos.

1.6. Tratamento e Evolução

Segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA), a escolha da droga a ser usada em casos de candidemia depende das manifestações clínicas do paciente, da espécie de *Candida* isolada e do resultado dos testes de sensibilidade a antifúngicos (REX *et al.*, 2000).

Em populações de pacientes onde os fatores de risco são muito elevados, muitos autores defendem o tratamento antifúngico profilático (ALANGADEN, 2011). É possível observar também a adoção empírica de drogas de amplo-espectro. Este modelo terapêutico pode levar à seleção de organismos resistentes aos fármacos, favorecendo sua disseminação no ambiente hospitalar (LASS-FLÖRL, 2009).

Apesar dos fatores de risco para fungemias terem sido extensamente reportados, atualmente há ampla disponibilidade de drogas antifúngicas, e o gerenciamento de forma ótima da candidemia continua um desafio (MIKULSKA *et al.*, 2011). Esse gerenciamento das infecções fúngicas sistêmicas é complexo pela dificuldade no diagnóstico, que pode resultar no atraso do tratamento adequado e, subsequentemente, levar a resultados adversos (morbidade e mortalidade).

A emergência de novas ferramentas diagnósticas facilita o desenvolvimento de novas estratégias para a profilaxia e o tratamento precoce da terapia antifúngica (SHOHAM & MARWAHA, 2010; MIKULSKA *et al.*, 2011).

De acordo com ANUNNATSIRI *et al.* (2009), para que se tenha uma melhora na evolução clínica dos pacientes com fungemia, os grandes desafios são: a obtenção de um diagnóstico rápido, a redução da severidade da infecção e o tratamento antifúngico empírico precoce em grupos de alto risco. No que concerne ao diagnóstico, um consenso de padronização das técnicas de PCR, com validação estabelecida por vários estudos, é necessário para permitir a sua adoção como método diagnóstico seguro e confiável.

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

2. Relevância e Justificativa

Não somente o número de casos de micoses sistêmicas e oportunistas vem aumentando no país, como também a epidemiologia e a etiologia das micoses estão mudando. Isso resulta em importantes implicações diagnósticas e de gerenciamento desses patógenos. Sendo assim, diante do exposto anteriormente, as justificativas para a realização deste projeto baseiam-se na possibilidade de desenvolvimento de técnicas mais rápidas e precisas para o diagnóstico molecular de infecções provocadas por fungos e seu potencial para adoção na prática clínica.

As limitações das técnicas histológicas, sorológicas e de cultura levam a procura por métodos mais eficientes. Por sua vez, o levantamento de custos diretos e indiretos – arrecada informações, auxiliando nos processos de decisão sobre a incorporação de tecnologias e a alocação de recursos em saúde. Essas análises podem auxiliar na seleção das intervenções mais efetivas e agregar elementos para alterações e aprimoramento das políticas de saúde, aumentando a eficiência dos serviços e a qualidade dos cuidados prestados em saúde.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar comparativamente técnicas laboratoriais diagnósticas para fungemia – método molecular *versus* cultura – em associação aos aspectos clínicos, tempo de realização e custos financeiros.

3.2. Objetivos Específicos

- Padronizar o método de extração de DNA fúngico a partir da amostra clínica (sangue total);
- Padronizar a reação de *nested* PCR;
- Comparar os resultados de ambos os métodos diagnósticos: hemocultura e *nested* PCR;
- Avaliar comparativamente o tempo de realização para o diagnóstico laboratorial pelos métodos observados neste estudo;
- Realizar uma avaliação de custos pelos dois métodos diagnósticos;
- Correlacionar os dados clínicos com os resultados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1. População do Estudo

O presente estudo teve seu início após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (parecer n.º 087/2010).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice 1), assinado pelos familiares de cada paciente, precedeu a colheita das amostras de sangue, realizada entre os meses de junho e setembro de 2011.

A população do estudo foi composta por 89 pacientes (SUS, convênios e particulares) internados nas Unidades de Terapia Intensiva, Geral (67) e Neonatal (22), de um Hospital Escola do estado de São Paulo, com suspeita clínica de infecção de corrente sanguínea. Vários parâmetros ajudaram a correlacionar os dados clínicos e microbiológicos observados no presente estudo: doenças de base com acometimento pulmonar, cardíaco, neurológico, renal ou hepático; câncer; diabetes; infecção por HIV; e fatores de risco como, uso de cateter venoso central, ventilação mecânica, antibioticoterapia prévia, hipertensão arterial, nutrição parenteral, cirurgia e trauma.

4.2. Amostras

Foram coletadas 118 amostras de sangue total, incluindo as amostras seriadas. Uma alíquota deste sangue, colhida e direcionada para o frasco de hemocultura, era encaminhada ao Laboratório Central do Hospital para inclusão ao equipamento automatizado (BACTEC 9240 Becton Dickinson®); outra parte, em tubos com EDTA, foi encaminhada ao Laboratório de Microbiologia da FAMERP, onde a investigação molecular transcorreu. Com raras variações, em adultos, 4,0 ml de sangue e em neonatos, 0,5 ml, foram considerados os volumes para iniciar o processo diagnóstico laboratorial. Após a extração, a quantificação do DNA e análise de pureza foram estabelecidas pelo espectrofotômetro BioPhotometer da Eppendorf®.

4.3. Diagnóstico Molecular por *nested* PCR

4.3.1. Extração de DNA

Todas as amostras de sangue foram submetidas aos procedimentos diagnósticos no mesmo dia de sua coleta. Para tanto, seguiu-se o protocolo descrito por LÖFFLER *et al.*, 1997, com modificações conforme descrição a seguir: o sangue total era transferido para tubos de 15,0 ml estéreis, adicionado tampão PBS estéril (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM), centrifugado a 900 G, por 10 min. Para ruptura das células vermelhas, retirava-se o sobrenadante e adicionava-se sobre a porção de hemácias cerca de 3 vezes o seu volume de tampão ACK (NH₄Cl 0,15 M; KHCO₃ 1 mM; EDTA 0,1 mM). Após agitação lenta por 10 min e uma centrifugação a 1.400 G por 10 min, o sobrenadante era descartado e adicionado 1,0 ml do tampão de lise de núcleos (Tris-HCl 100 mM pH 8.0; NaCl 4 M; EDTA 20 mM pH 8.2). A amostra era homogeneizada em agitadores do tipo *vortex* e transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, com subsequente centrifugação de 16.000 G, por 21 min. O *pellet* resultante era suspenso com 200 µl de PBS. A partir desta etapa, a amostra era então submetida ao kit de extração de DNA da Qiagen®, *DNA Blood Mini*, segundo as especificações do fabricante, com apenas uma modificação. Adotou-se como procedimento padrão, o tempo de 1 h para lise da célula fúngica com proteinase K e tampão de lise. O DNA assim obtido era então eluído com água Milli-Q e armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.3.2. Controles da Extração do DNA

Como estágio preliminar de análise, controles positivos e negativos foram incluídos no processo de extração. Como controle positivo, 4,0 ml de sangue de um voluntário saudável foi inoculado com 200 µl de uma suspensão de *Candida albicans* na escala 1 de MacFarland, sendo então procedida a extração. O mesmo sangue, sem inóculo fúngico, foi utilizado como controle negativo.

Para testar o limite de detecção do teste, amostras de sangue de um voluntário saudável foram inoculadas com concentrações decrescentes da suspensão de levedura e submetidas à extração e sua contagem estabelecida por Câmara de Neubauer.

4.3.3. Reação de *nested* PCR

Seguiu-se o protocolo descrito por HENRY *et al.* (2000). Assim, para o primeiro ciclo de reação, utilizou-se o *primer forward* ITS5 (5'– GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G – 3'; Sigma®) e o *primer reverse* ITS4 (5'– TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'; Sigma®) para amplificar a região do DNA ribossomal 5.8S, que inclui as regiões ITS 1 e ITS 2 (WHITE *et al.*, 1990) (**Figura 1**). A reação de amplificação seguiu conforme descrito: 2,5 µl do DNA extraído para um volume total de 25,0 µl, tampão de 2,5 µl de *Taq Buffer* 10X, 2,0 µl de cada base (dNTP – 2,5 mM), 0,5 µl cada *primer* a 15 µM, 1,0 µl de MgCl₂ a 50 mM e 0,1 µl de *Taq* polimerase (Fermentas®) a 50 U/µl; sendo o restante completado com água pura, livre de DNase. Posteriormente, no segundo ciclo de reação, o *primer forward* ITS1 (5'– TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3'; Sigma®) e o *primer reverse* ITS2 (5'– GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC – 3'; Sigma®) foram escolhidos objetivando amplificar somente a região ITS 1 do DNA, presente no produto da primeira rodada, gerando um fragmento de aproximadamente 220 pb. Para tal, 1,0 µl do produto de PCR da primeira reação foi utilizado para um volume total de 25,0 µl, mais 2,5 µl de tampão *Taq Buffer* 10X, 2,0 µl de cada base (dNTP – 2,5 mM), 0,5 µl cada *primer* a 15 µM, 1,0 µl de MgCl₂ a 50 mM e 0,1 µl de *Taq* polimerase (Fermentas®) a 50 U/µl, sendo volume completado com água pura, livre de DNase. Os parâmetros da ciclagem foram os mesmos para as duas reações: desnaturação inicial a 95°C por 4,5 min; 40 ciclos, sendo cada um consistindo de um passo de desnaturação à 95°C por 30 s, um passo de anelamento à 55°C por 30s e um passo de extensão à 72°C por 1 min; mais uma extensão final de 3 min à 72°C.

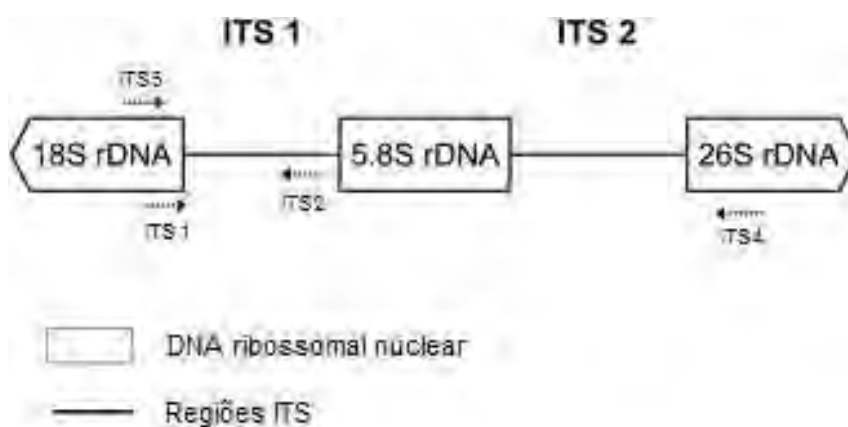


Figura 1: Organização genômica do rDNA 18S, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2, e 26S rDNA; e *primers* utilizados na reação de amplificação.

4.3.4. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação do *nested* PCR e correspondentes marcadores (*DNA ladders* - Promega®) foram observados por eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma®), corado com Brometo de Etídio, com voltagem de 150 v, durante 30 min. Posteriormente, o gel era foto-documentado com câmera digital acoplada a um transiluminador (Kodak®).

4.4. Análise de valores de custo

Para o levantamento dos valores gastos pelos procedimentos médicos e demais parâmetros foram consultados o Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS (SIGTAP), assim como programas de gerenciamento de empresas privadas.

4.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa InStat, versão 3.0 (GraphPad, Inc®). Para comparação entre médias, quando os dados obedeciam à distribuição normal, o teste paramétrico “t” não pareado foi o escolhido: tempo de internação até a realização do exame, média de dias entre as coletas seriadas, e médias de idade. Considerado o tempo total de internação, quando às médias e desvios padrões não ocorriam conforme esperados (distribuição normal), o teste não paramétrico de Mann-Witney era utilizado.

As correlações entre as doenças de base, as características e as taxas de mortalidade do pacientes com os resultados do *nested* PCR, foram observadas estatisticamente pelo teste exato de Fisher.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Coleta de sangue e quantificação do DNA

A análise associativa entre o volume de sangue (0,3 a 0,5 ml em neonatos e 3 a 4,5 ml em adultos) e a correspondente quantidade de DNA obtidos por amostra, revelou conforme esperado, relação direta mediante tais parâmetros, isto é, volumes de sangue maiores mostraram quantidade de DNA superior (média de 270 µg/ml para adultos e 70 µg/ml para neonatos). Ainda, o grau de pureza do DNA foi satisfatório, com média de valores próximos (média de 1,78 para os dois grupos). A adoção de procedimentos adicionais (tempo de lise de 10 minutos para 1h) aos protocolos de extração de DNA foi crucial para obtenção de melhores resultados da reação de *nested* PCR, evento observado pelo baixo limiar de detecção.

Além disso, a quantidade de DNA utilizada na reação de PCR não mostrou ser um fator limitante. Testes com diversas concentrações do mesmo DNA foram realizados e os mesmos resultados obtidos. Por isso, foi padronizada a utilização de 2,5 µl de DNA para a primeira rodada de amplificação e 1,0 µl para a segunda.

5.2. *Nested* PCR - Limiar de detecção e resultados dos pacientes

Com o objetivo de se avaliar o limiar de detecção de células fúngicas em amostras clínicas, estabeleceu-se uma inoculação de concentração decrescente de leveduras em sangue total de doador saudável. Identifica-se na linha 2, que o valor de 10 células fúngicas por 4 ml de sangue total, constituiu-se como limiar de detecção (200 µl de suspensão de leveduras, em uma diluição de 1:40.000 da escala 1 de MacFarland) (**Figura 2**).

Após padronização, seguiram-se às reações com amostras de sangue de pacientes com clínica de infecção de corrente sanguínea, mais os controles (**Figura 3**). Pode-se observar que de 89 amostras, 46 (51,7%) foram positivas pós *nested* PCR.

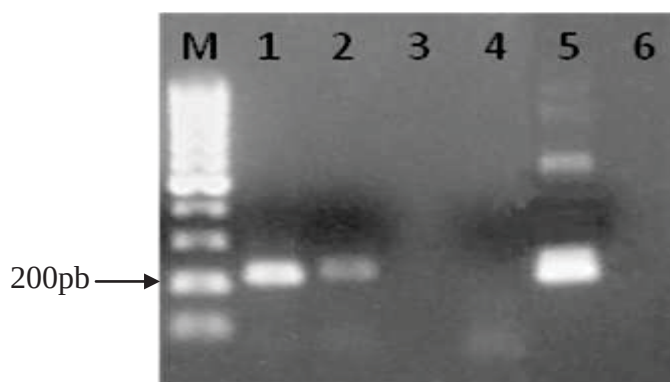


Figura 2: Gel de agarose com produtos da reação *nested* PCR. As linhas de 1 e 2 correspondem reações positivas de diluições decrescentes de células fúngicas. As linhas 3 e 4 correspondem às diluições onde o DNA não foi detectado; linha 5, o controle positivo e a 6, o controle negativo da reação; M, marcador de peso molecular 100pb.

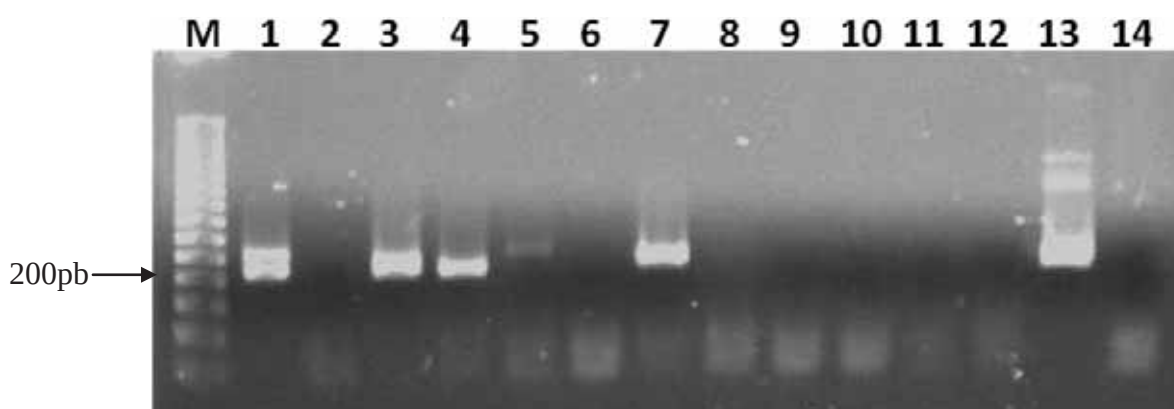


Figura 3: Gel de agarose com produtos da reação *nested* PCR. As reações positivas são apresentadas nas linhas 1, 3, 4, 5 e 7; as negativas, 2, 6, 8, 9, 10, 11 e 12. Linha 13 corresponde ao controle positivo (*C. albicans*) e a linha 14 ao controle negativo de reação. M, Marcador de peso molecular de 50pb.

Os valores percentuais de positividade foram próximos, quando se consideram as duas origens de internação (UTI Geral e Neonatal). Assim, em 67 amostras de pacientes da UTI Geral, 35 (52,2%) foram positivas, enquanto da UTI Neonatal, de 22 amostras, este perfil foi observado em 11 (50,0%) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Distribuição dos pacientes segundo Unidade de Terapia Intensiva de origem e correspondente resultado da reação de *nested* PCR.

	Nº de pacientes	Positivas	Negativas
UTI Geral	67	35	32
UTI Neonatal	22	11	11
Total	89	46	43

5.3. *Nested* PCR – Associação dos Resultados com dados clínicos

Dados os aspectos clínicos, doenças de base e adoção de terapêutica antimicrobiana, a **Tabela 2**, identifica a sua associação com os resultados laboratoriais do *nested* PCR.

Fazendo a distinção para os pacientes provenientes somente da UTI Geral, a média de idade foi de 54,9 anos, sendo de 50,8 anos para homens e 65,2 anos para mulheres. Apesar da população geral do estudo, ter como representação maior o gênero masculino, em termos percentuais, o resultado positivo por *nested* PCR foi observada conforme descrito: feminino, 63,2% (12/19) e masculino, 47,9% (23/48). Já na Unidade Neonatal, a média de idade foi de 10,1 dias.

Consideraram-se como tempo de internação dois períodos diferentes, o período entre a admissão do paciente na Unidade de Terapia Intensiva até a colheita de sangue para a realização do exame, e o tempo total de permanência em ambiente hospitalar.

Na **Tabela 2**, apresentam-se os dados referentes ao maior tempo de permanência na Unidade de Terapia Intensiva, até coleta (13,0 dias), com casos de *nested* PCR positivos, em relação aos negativos (10,7 dias) ($p>0,05$); estes mesmos parâmetros foram observados se considerados o tempo total de internação (período até óbito ou alta hospitalar).

A referência de resultados positivos (*nested* PCR) frente às doenças de base mostrou que os acometimentos pulmonar, cardíaco e renal foram prevalentes. Interessantemente, a infecção por HIV, ocorreu em apenas dois casos, e destes, somente um como reação positiva pelo *nested* PCR.

Pacientes com cateter venoso central (81%) e concomitante terapia antibacteriana (78%) constituíram o grupo como maior fator de risco, a maioria com *nested* PCR positivo. Frente ao pacientes submetidos à ventilação mecânica, este dado concorreu com menor percentual, uma vez que de 65, 29 foram positivos (44,6%).

Na presente investigação, 10 pacientes estavam em vigência de antifungoterapia e destes seis apresentaram *nested* PCR positivo (60%). Este mesmo percentual se deveu aos pacientes com nutrição parenteral ou trauma.

O índice de mortalidade geral foi de 46,1% (41/89). Comparativamente, frente aos pacientes com *nested* PCR positivos e negativos, este parâmetro foi diferente: 50,0% (23/46) e 41,9% (18/43), respectivamente, porém não estatisticamente significativo ($P>0,05$).

Tabela 2: Dados demográficos, características clínicas e evolução dos pacientes.

Variável	Total	POS	NEG
Pacientes	89	46	43
Média de idade (0-88)	41,3	42,3	40,2
Sexo masculino	59	28	31
Sexo feminino	30	18	12
Idade <1 ano (UTI Neonatal)	22	11	11
Média de dias internados (até colheita do sangue)	11,9	13,0	10,7
Média internação total	35,5	36,7	34,2
Doenças de base			
Doença pulmonar ou dificuldade respiratória	39	22	17
Doença cardíaca	16	10	6
Doença renal	15	9	6
Diabetes	12	7	5
Câncer	7	5	2
Doença neurológica	7	4	3
Doença hepática	6	4	2
Infecção por HIV	2	1	1
Características			
Cateter Venoso Central	72	37	35
Ventilação mecânica	65	29	36
Hipertensão arterial	31	14	17
Trauma (cirurgia)	17	11	6
Nutrição parenteral	11	7	4
Uso de antibiótico (antibacterianos)	70	37	33
Uso de fluconazol	8	5	3
Uso de anfotericina B	2	1	1
Uso de ambisome	1	0	1
Uso de voriconazol	1	0	1
Uso de micafungina	1	0	1
Mortalidade geral	41	23	18

“POS” = pacientes com *nested* PCR positivo para fungos; “NEG” = pacientes com *nested* PCR negativo para fungos.

5.4. Hemocultura – Comparação com o *nested* PCR

A análise comparativa dos métodos diagnósticos (*nested* PCR e hemocultura) para a mesma coleta de sangue revelou concordância para apenas um caso positivo, de onde se obteve *Candida parapsilosis*, e 36 casos negativos (40,4%). Entretanto, a discordância foi notada, onde, de 77 hemoculturas negativas, 41 (53,3%) foram positivas pós *nested* PCR. O único caso positivo (*nested* PCR e Hemocultura positivos) originou-se de um paciente cujo tempo de internação foi maior (23) que média (13).

Uma observação adicional caracterizou-se pelo achado de grupos bacterianos nas hemoculturas em 16 casos (14,4%), prevalentes na população masculina (UTI Geral): *Staphylococcus aureus* (5), *Staphylococcus coagulase negativa* (5), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Acinetobacter baumannii* (1), *Acinetobacter calcoaceticus* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (1) e *Escherichia coli* (1). Em cinco (31%), positivos para bactérias, ocorreu concomitante reação positiva pós *nested* PCR, nenhum submetido à antifungoterapia prévia (**Tabela 3**).

Tabela 3: Distribuição de espécies bacterianas obtidas de hemoculturas, aspectos demográficos, origem hospitalar, terapia antimicrobiana e evolução dos pacientes, em associação com *nested* PCR.

UTI	Idade	Gênero	Hemocultura	<i>nested</i>	Terapia antimicrobiana	Evolução
Geral	74	MAS	<i>Acinetobacter baumannii</i>	POS	Bacteriana	Óbito
Geral	37	MAS	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	POS	Bacteriana e viral	Óbito
Geral	57	MAS	<i>Staphylococcus aureus</i>	POS	Bacteriana	Óbito
Geral	69	MAS	<i>Staphylococcus aureus</i>	POS	Bacteriana	Óbito
Geral	82	FEM	<i>Staphylococcus coag. negativa</i>	POS	Bacteriana	Óbito
Geral	44	MAS	<i>Escherichia coli</i>	NEG	Bacteriana e fúngica	Melhora
Geral	22	MAS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEG	Bacteriana	Melhora
Geral	70	MAS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEG	Bacteriana e fúngica	Melhora
Geral	31	MAS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NEG	Sem vigência	Óbito
Geral	75	MAS	<i>Staphylococcus aureus</i>	NEG	Bacteriana e fúngica	Melhora
Geral	43	MAS	<i>Staphylococcus aureus</i>	NEG	Bacteriana	Óbito
Geral	67	MAS	<i>Staphylococcus aureus</i>	NEG	Sem vigência	Óbito
Neo	1d	MAS	<i>Staphylococcus coag. negativa</i>	NEG	Sem vigência	Melhora
Geral	37	MAS	<i>Staphylococcus coag. negativa</i>	NEG	Bacteriana	Melhora
Geral	33	MAS	<i>Staphylococcus coag. negativa</i>	NEG	Bacteriana	Melhora
Geral	61	FEM	<i>Staphylococcus coag. negativa</i>	NEG	Bacteriana	Óbito

“*Nested*” = *nested* PCR; “Neo” = Unidade de Terapia Intensiva Neonatal; “Geral” = Unidade de Terapia Intensiva Geral; “d” = dia; “FEM” = feminino; “MAS” = masculino; “POS” = positivo; “NEG” = negativo.

5.5. Amostras seriadas

De 22 pacientes (A-V) foram obtidas amostras de sangue seriadas (até quatro coletas), conforme demonstrado na **Tabela 4**. Em 50 % dos pacientes (A-K), os resultados do *nested* PCR foram concordantes (positivos ou negativos), com coletas efetuadas em intervalo médio de 6,5 dias. Quando discordantes (L-V), em 11 casos, este intervalo temporal, apesar de não ser estatisticamente significativo, foi em média maior (9 dias), sendo a primeira coleta positiva em 3 casos (L, M, e N) e negativa em 5 casos (O, P, Q, R, e S).

Tabela 4: Distribuição de amostras seriadas, correspondentes resultados de provas laboratoriais (*nested* PCR e hemocultura), e intervalo entre as coletas (com relação à primeira).

Paciente		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
Método/coleta	1ª	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
	2ª	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	3ª	-												-							+	+	-
	4ª																					-	+
HC (fungo)	1ª	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2ª	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3ª	-												-							-	-	-
	4ª																					-	-
HC (bactéria)	1ª	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SA	KP	-	-	-	-	SN	SN	-	-	-	SA	-
	2ª	-	AC	-	-	-	PA	AB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SN	-	-	-	-
	3ª	-												-							-	-	SN
	4ª																					-	-
Intervalo de coleta em dias	1ª	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2ª	6	3	11	10	6	5	15	5	5	7	3	2	0	7	2	11	6	2	7	3	4	15
	3ª	8												16							14	31	19
	4ª																					36	35

“HC” = hemocultura; “+” = positivo; “-” = negativo; “AC” = *Acinetobacter calcoaceticus*; “PA” = *Pseudomonas aeruginosa*; “AB” = *Acinetobacter baumannii*; “SA” = *Staphylococcus aureus*; “KP” = *Klebsiella pneumoniae*; “SN” = *Staphylococcus coagulase negativa*.

A análise individual de hemocultura, também revelou discrepâncias de resultados para 10 casos de isolamento bacteriano, evento não observado para isolamento fúngico (todos negativos).

A análise comparativa dos resultados (*nested* e hemocultura para fungo) mostrou identidade para apenas cinco casos (A, F, I, J, e K), todos negativos.

5.6. *Nested* PCR – tempo de realização do diagnóstico versus hemocultura

A positividade da hemocultura para detecção de leveduras em amostra de sangue total foi revelada no terceiro dia após a coleta. Entretanto, para o reconhecimento da espécie fúngica, *Candida parapsilosis*, este tempo se estendeu para o oitavo dia, dados os parâmetros morfológicos e bioquímicos de identificação.

Considerando-se as hemoculturas negativas, a liberação do resultado ocorria no sétimo dia de análise.

Comparativamente, o diagnóstico molecular pelo *nested* PCR ocorreu no tempo máximo de 10,5 horas, período coincidente para emissão do laudo, positivos ou negativos.

5.7. Custos envolvidos com diagnóstico e internação prolongada

Para a análise dos custos envolvidos segundo cada metodologia adotada na presente investigação, valores de referência foram obtidos pelas tabelas de procedimentos diagnósticos do SUS, convênios e particulares: nesse sentido, observou-se que o valor médio para realização de hemocultura foi de R\$18,48, R\$26,00 e R\$35,00, respectivamente.

Para os procedimentos diagnósticos moleculares, o custo médio do exame laboratorial foi de R\$16,80 por amostra. Incluem nesta avaliação, despesas com recursos materiais desde a extração do DNA, até a eletroforese.

A **Tabela 5** apresenta a distribuição de valores gastos com os procedimentos médico-hospitalares durante o período de internação, e os respectivos planos de Saúde. Nas **Figuras 4** e **5**, pode-se observar a distribuição dos pacientes de acordo com o plano de saúde, os gastos totais e o tempo total de internação. Os pacientes particulares não foram incluídos no gráfico por serem apenas dois. Pelo mesmo motivo (baixo número amostral), no gráfico referente aos convênios, não é mostrada a linha de tendência.

Tabela 5: Distribuição de pacientes segundo planos de saúde para atendimento hospitalar e gastos financeiros por dias de internação (Média dos valores em Reais R\$).

Plano/Pacientes	Médias de valores		
	Total R\$	Dias internados	Diária R\$
Convênio A (n = 9)	39394,54	33,55	1340,35
Convênio B (n = 8)	28811,44	21,37	1559,82
Particular (n = 2)	18180,41	7,5	3640,03
SUS (n = 70)	2124,21	39,38	68,11

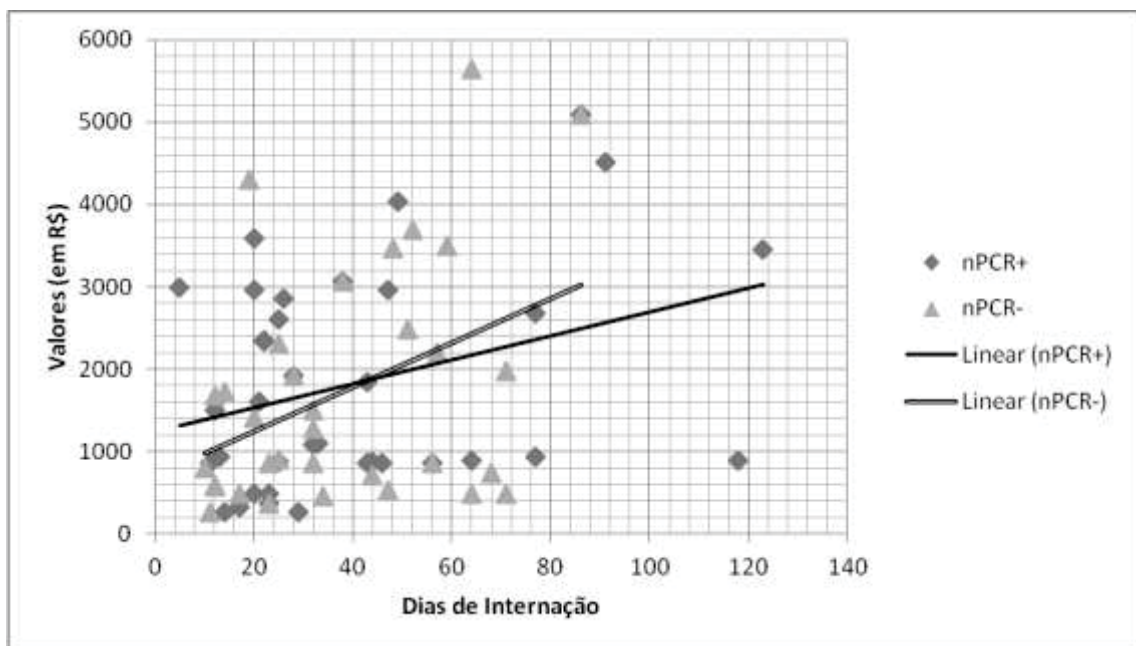


Figura 4: Distribuições dos pacientes do SUS de acordo com os valores dos procedimentos médico-hospitalares e os respectivos tempos totais de internação. As retas correspondem às tendências lineares. (nPCR+ = *nested* PCR positivo; nPCR- = *nested* PCR negativo).

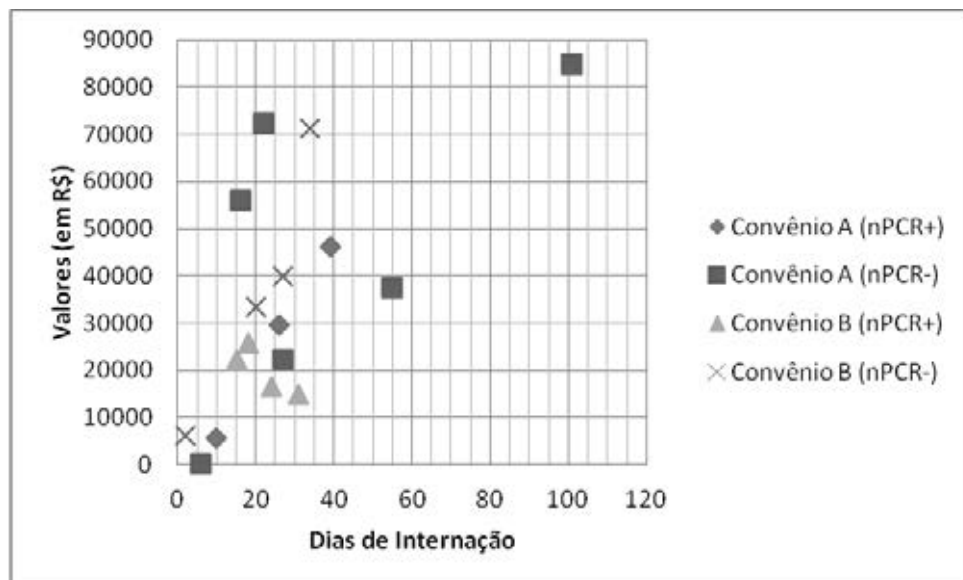


Figura 5: Distribuições dos pacientes de convênios de acordo com os valores dos procedimentos médico-hospitalares e os respectivos tempos totais de internação. As retas correspondem às tendências lineares. (nPCR+ = *nested* PCR positivo; nPCR- = *nested* PCR negativo).

DISCUSSÃO

6. Discussão

As infecções fúngicas sistêmicas, principalmente nas últimas décadas, surgiram como um problema no âmbito hospitalar, uma vez que representa elevadas taxas de mortalidade e morbidade (ALANGADEN, 2011; MORACE & BORGUI, 2010; OPAL & CALANDRA, 2009). A inadequação técnica e demora no diagnóstico, com consequente permanência do paciente no âmbito hospitalar, contribuem para elevação de custos observados tão comumente em diversos centros de saúde (GOULD, 2011; MORACE & BORGUI, 2010; OPAL & CALANDRA, 2009). Corroborando com tais afirmativas, a presente investigação mostrou que a hemocultura não é o melhor método diagnóstico e que os métodos moleculares são uma alternativa factível para análise laboratorial de doenças fúngicas sistêmicas, dada a rapidez com que os resultados são obtidos.

A divergência observada no desenvolvimento de padronizações, bem como a falta de controle de qualidade de protocolos diagnósticos são considerados os elementos chave que dificultam a adoção de métodos moleculares como rotina diagnóstica (BRETAGNE, 2010; WHITE *et al.*, 2010).

No que se refere à padronização do método, a etapa de extração de DNA é uma das fundamentais para o êxito de qualquer procedimento diagnóstico molecular, particularmente quando a extração é realizada a partir de espécimes clínicos (FREDRICKS *et al.*, 2005; METWALLY *et al.*; 2008). De fato, na presente investigação, a adoção de mínimas variações no protocolo de extração nos primeiros planos de execução, foi crucial para maior sensibilidade diagnóstica (baixo limiar de detecção).

A técnica de *nested* PCR vem sendo utilizada nos estudos de diagnóstico para candidemia, considerada a sua maior especificidade e sensibilidade quando comparada aos métodos convencionais (AHMAD *et al.*, 2002; DEL NEGRO, 2008; WHITE *et al.*, 2009). Conforme descrito anteriormente, e aqui observado, sua alta sensibilidade se deve ao poder de detecção de mínimas quantidades de genoma em amostras de sangue total ou soro (BOUGNOUX *et al.*, 1999; KHLIF *et al.*, 2009). Um ponto que merece consideração é que o método molecular também é menos agressivo ao paciente em comparação à hemocultura. Isso porque é necessário apenas um tubo de sangue de 4,0 ml para adultos e um tubo de 0,5 ml para neonatos. Em comparação, por exemplo, no Reino Unido, atualmente, recomenda-se que seja colhido no mínimo entre 20-30 ml de sangue de adultos, e realizar duas hemoculturas seriadas, para que maximize o rendimento e ajude a identificar contaminação (DEAN &

DARK, 2010); o que torna o procedimento mais penoso para o paciente, que já se encontra debilitado. Para os pacientes neonatos, o volume disponível para a hemocultura, que geralmente é entre 0,5 e 1,0 ml, é muito baixo, fazendo com que a sensibilidade do método seja ainda menor para esse grupo de pacientes (DOWNEY *et al.*, 2010).

A *Candida sp.* é a principal causa de infecção fúngica invasiva em Unidade de Terapia Intensiva (YLIPALOSAARI *et al.*, 2012). Neste ambiente, os pacientes são acometidos por diversas situações clínicas que agravam e potencializam a ocorrência de doenças fúngicas oportunistas (PÉRMAN *et al.*, 2011). Realmente, a distribuição de infecção sistêmica no presente foi equivalente, independentemente de sua origem, neonatal ou geral.

Segundo ZAOUTIS *et al.* (2010), o maior tempo de estadia em ambiente hospitalar, particularmente em UTIs, eleva o risco de aquisição de doença fúngica sistêmica (média de 21 dias). De fato, embora com diferenças estatisticamente não significativas, o diagnóstico positivo de infecção fúngica por *nested* PCR foi aqui observado em pacientes com permanência hospitalar maior.

Corroborando aos dados da literatura científica, a descrição de várias doenças de base, como predisponentes às infecções fúngicas, é fato aqui observado (ALMIRANTE *et al.*, 2005; HINRICHSSEN *et al.*, 2008). Nesse sentido, em ordem decrescente, o acometimento pulmonar, cardíaco, renal, neurológico e hepático, foram as apresentações clínicas prevalentes, apesar de não haver diferenças estatisticamente ($P > 0,05$) significativas entre esses parâmetros e *nested* PCR positivo. Espécies de *Candida* são comensais comuns de diversos sítios anatômicos, especialmente orofaringe, e sua associação, em pacientes debilitados, explica maior ocorrência com doença pulmonar (ODDS, 1994; POUND *et al.*, 2002).

Reiterando os dados da literatura, os resultados obtidos neste estudo indicam que os procedimentos invasivos, especialmente ventilação mecânica, o cateterismo venoso, e a maior utilização de antibióticos proporcionam elevados índices de positividade pelo *nested* PCR. A observação adicional de positividade do *nested* PCR nos pacientes sem estes fatores de risco traduz o aspecto multifatorial característico desta doença (DOTIS & ROILIDES, 2011; FEFERBAUM *et al.*, 2000; HORN *et al.*, 2009; SHOHAM & MARWAHA, 2010; ZAOUTIS *et al.*, 2010). Além do mais, pacientes que estão internados em UTIs estão mais sujeitos a desenvolverem uma infecção da corrente sanguínea, especialmente por fungos, elevando os índices de mortalidade (AMRUTKAR *et al.*, 2006; PROWLE *et al.*, 2011).

Discute-se nas Unidades de Terapia Intensiva, que candidemia representa a causa mortis em torno de 30-40% dos pacientes (DIEKEMA *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2010; MUSKETT *et al.*, 2011). Considerando-se que a infecção fúngica agrava o quadro clínico, esse evento aqui detectado, reitera a afirmativa, uma vez que a taxa de mortalidade maior ocorreu frente aos pacientes com *nested* PCR positivo.

Infecções sistêmicas, fúngicas ou bacterianas, podem ocorrer mesmo em vigência de exames microbiológicos negativos (hemocultura) (AHMAD *et al.*, 2002; BORST *et al.*, 2001; DEAN & DARK, 2010; HAN *et al.*, 2010; WHITE *et al.*, 2009). Aliada aos fatores intrínsecos do hospedeiro (febre, resposta imune etc.), a disseminação de quantidade variável de micro-organismos, viáveis no momento da coleta, pode explicar a variação na taxa de detecção, especialmente por hemocultura (LAMOTH *et al.*, 2010). Na presente análise este fato foi surpreendente, visto que os fatores de risco eram elevados e muitas hemoculturas foram negativas. Comparativamente, os métodos moleculares, aqui eleito o *nested* PCR, revelaram índices de positividade maiores. Justifica-se que frações mínimas de genoma fúngico circulante no momento da coleta de sangue são amplificados e, portanto, detectados com maior sensibilidade (BADIEE *et al.*, 2011; BRETAGNE, 2010; MASSONET *et al.*, 2004; MAYR & LASS-FLORL, 2011; MUSKETT *et al.*, 2011; TRAGIANNIDIS *et al.*, 2011; WENGENACK & BINNICKER, 2009).

A existência de uma interface entre os aspectos clínicos observados para doenças infecciosas de origem fúngica e bacteriana, muitas vezes, confunde o profissional de saúde (KAUFMAN & FAIRCHILD, 2004). De fato, embora em minoria, aqui, comprova-se esse episódio em 16 pacientes, onde a infecção sistêmica se deveu a grupos bacterianos, embora houvesse suspeita clínica para fungemia. Interessantemente, em 31%, o *nested* PCR foi positivo. Sugere-se primeiramente, a ocorrência concomitante de elementos fúngicos, apenas revelado pela biologia molecular, uma vez que metabólitos bacterianos e ação antibiótica podem exercer ação inibitória sobre fungos (hemocultura negativa) (**Tabela 3**) (COTTEN *et al.*, 2006; MCCOOL *et al.*, 2008; PELEG *et al.*, 2010).

Ponderando-se sobre a ocorrência concordante de resultados positivos (hemocultura e *nested* PCR) é possível considerar que, somente amostras biológicas ricas em carga microbiana apresentam menor margem de erro diagnóstico, fato descrito anteriormente por PÉRMAN & ZARAGOZA (2009). Em adição, este caso ocorreu para o paciente com permanência hospitalar elevada, ou seja, um fator e risco adicional. No entanto, isto explicita a necessidade de estudos futuros, com número amostral maior, que enriqueçam o

conhecimento acerca da associação de agentes patogênicos e infecções. Os dados concordantes enquanto negatividade (apenas 40% dos casos) estão em conformidade com os parâmetros descritos na literatura (VALLÉS & FERRER, 2009), demonstrando que a taxa de infecções de corrente sanguínea em pacientes de UTI é muito alta.

As infecções da corrente sanguínea são multifatoriais e apresentam fisiopatologia, critérios diagnósticos, implicações terapêuticas, prognósticas e preventivas distintas. Diversos fatores contribuem com diagnósticos laboratoriais divergentes, tais como: variação dos sinais sistêmicos de infecção, presença ou ausência de foco primário de origem, presença ou ausência de acesso vascular, tipo do acesso, envolvimento e possibilidade de remoção do mesmo, sinais locais de infecção de cateter, etc. (ANVISA, 2009). A subjetividade de resultados discrepantes frente à hemocultura de isolados seriados, na presente investigação, ilustra a afirmativa acima.

A demora na administração da terapia antifúngica correta é um fator determinante na evolução dos pacientes em choque séptico. Nesse caso, o desenvolvimento de técnicas para um diagnóstico rápido e preciso é necessário para que o paciente possa evoluir para a cura em menor tempo evitando assim um tempo de internação prolongado (KOLLEF *et al.*, 2012). Neste estudo, durante o tempo entre a realização da hemocultura e a liberação do resultado, nenhuma estratégia de tratamento contundente poderia ser levada em consideração, já que o médico não possuía o resultado em mãos. No entanto, como já foi demonstrado, com apenas 10,5 h de trabalho foi possível obter os resultados da biologia molecular para o mesmo fim, o que significaria pressupor, que cinco diárias hospitalares poderiam ter sido evitadas. Esse tempo menor, não somente evitaria custos desnecessários, como também levaria a melhora do paciente, pós-adoção da terapia correta e precoce. Assim, demonstrou-se a importância de se eleger o método molecular como factível para diagnóstico de infecção de corrente sanguínea, dado acatado previamente por vários estudos (AHMAD *et al.*, 2002; BADIEE *et al.*, 2011; KHLIF *et al.*, 2009).

Estudos realizados em pacientes com candidemia revelaram que a estadia hospitalar é a variável de maior impacto no aumento dos custos relativos a este tipo de infecção (GRAU-CERRATO & FERRÁNDEZ-QUIRANTE, 2009). Por isso, novas práticas e estratégias devem ser adotadas para que o paciente fique o mínimo possível internado, sendo exposto aos diversos fatores de risco. De fato, as fungemias, geram um aumento de custo não somente de caráter individual ao paciente, como ao sistema de saúde, se comparadas a outras comorbidades (MUSKETT *et al.*, 2011; ZAOUTIS *et al.*, 2005). Pelos dados apresentados

neste trabalho, expõe-se que uma rotina de diagnóstico molecular deve ser, no mínimo, estudada e adotada como técnica futura.

Após este primeiro passo, as perspectivas para este trabalho incluem a adoção de uma técnica molecular que não somente detecte como também identifique a espécie fúngica causadora da doença sistêmica. Esta etapa inicial, no entanto, foi fundamental para analisar as dificuldades e para traçar as diretrizes futuras com relação ao diagnóstico molecular de fungemias e sua aplicabilidade na rotina laboratorial.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

- A padronização da técnica de extração de DNA fúngico diretamente do sangue total se mostra eficiente em termos de quantidade e qualidade do DNA extraído;
- O *nested* PCR revela ser uma ferramenta diagnóstica importante para a detecção de fungemias, sendo mais sensível que a cultura;
- Não há correlação de resultados com as seguintes variáveis: área geográfica de unidade de internação;
- Acometimento pulmonar, cardíaco e renal são considerados aspectos clínicos comuns em associação com doenças fúngicas;
- O uso de cateter venoso central, ventilação mecânica e terapia antimicrobiana prévia são fatores de risco evidentes em associação com doença fúngica;
- O baixo nível de concordância revela a diferença de sensibilidade entre as técnicas diagnósticas, a interface da clínica, e/ou as infecções fúngicas e bacterianas concomitantes;
- Tempo de internação prolongado gera elevados custos para o paciente e para o sistema de saúde. O *nested* PCR é considerada uma técnica mais rápida que a cultura e economicamente factível para rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Infecção relacionada à assistência à saúde. 2006. Disponível em: <<http://www.iras.org.br/index.htm>>. Acesso em 28/05/2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Corrente Sanguínea: Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, 2009.** Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Efeitos Adversos – UIPEA; Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGTES. 8p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Orientações para Prevenção de Infecção Primária de Corrente Sanguínea, 2010.** Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Efeitos Adversos – UIPEA; Gerência Geral de Tecnologia em Serviços. 53p.

AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, A. S.; KHAN, Z. U. Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: Comparison with Culture, Antigen Detection, and Biochemical Methods for Species Identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(7):2483-2489, 2002.

ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*. 25(1):201-225, 2011.

ALEXANDER, B. D.; PFALLER, M. A. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clinical Infectious Diseases*. 43 (1): 515-527, 2006.

ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M. et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4): 1829-1835, 2005.

ALP-MESE, E.; AGKUS, Ç.; COSKUN, R.; METAN, G.; KOÇ, A. N.; SUNGUR, M.; DOGANAY, M. Nosocomial candidemia: A threat beyond nosocomial bacterial infections in intensive care units. *Turkish Journal of Medical Science*, 41(6): 1115-1118, 2011.

AMRUTKAR, P. P.; REGE, M. D.; CHEN, H.; LAROCCO, M. T.; GENTRY, L. O.; GAREY, K. W. Comparison of Risk Factors for Candidemia Versus Bacteremia in Hospitalized Patients. *Journal of Infection*, 34(6): 322-327, 2006.

ANTUNES, A.G.; PASQUALATO, A.C.; DIAZ, M.C.; D'AZEVEDO, P.A.; SEVERO, L.C. Candidemia In A Brazilian Tertiary Care Hospital: Species Distribution And Antifungal Susceptibility Patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 46(5):239-241, 2004.

ARENDRUP, M. C.; FUURSTED, K.; GAHRN-HANSEN, B.; SCHØNHEYDER, H. C.; KNUDSEN, J. D.; JENSEN, I. M.; BRUUN, B.; CHRISTENSEN, J. J.; JOHANSEN, H. K. Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004–2006: increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *Clinical Microbiology and Infection Journal*, 14(5): 487-494, 2008.

ÁSMUNDSDÓTTIR, L. R.; ERLENDSDÓTTIR, H.; GOTTFREDSSON, M. Increasing Incidence of Candidemia: Results from a 20-Year Nationwide Study in Iceland. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9): 3489-3492, 2002.

ATKINS, S. D.; CLARK, I. M. Fungal Molecular Diagnostics: a Mini Review. *Journal of Applied Genetics*. 45 (1): 3-15, 2004.

AWASTHI, A. K.; JAIN, A.; AWASTHI, S.; AMBAST, A.; SINGH, K.; MISHRA, V. Epidemiology and Microbiology of Nosocomial Pediatric Candidemia at a Northern Indian Tertiary Care Hospital. *Mycopathology*, 172: 269-277, 2011.

BADIEE, P.; ALBORZI, A.; JOUKAR, M. Molecular assay to detect nosocomial fungal infections in intensive care units. *European Journal of Internal Medicine*, 22: 611-615, 2011.

BENJAMIN, D. K. J. DRISCOLL, T.; SEIBEL, N. L.; GONZALEZ, C. E.; RODEN, M. M.; KILARU, R.; CLARK, K.; DOWELL, J. A.; SCHRANZ, J.; WALSH, T. J. Safety and Pharmacokinetics of Intravenous Anidulafungin in Children with Neutropenia at High Risk

for Invasive Fungal Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(2):632-638, 2006.

BENJAMIN, J. D.; GARGES, H.; STEINBACH, W. J. Candida bloodstream infection in neonates. *Seminars in Perinatology*. 27:375–383, 2003.

BLYTH, C. C.; CHEN, S. C. A.; SLAVIN, M. A.; SERENA, C.; NGUYEN, Q.; MARRIOTT, D.; ELLIS, D.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. Not Just Little Adults: Candidemia Epidemiology, Molecular Characterization, and Antifungal Susceptibility in Neonatal and Pediatric Patients. *Pediatrics Journal*. 123(5): 1360-1368, 2009.

BODEY, G. P.; MARDANI, M.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; ABBAS, J.; GIRGAWY, E.; HACHEM, R. Y.; KONTOYIANNIS, D. P.; RAAD, I. I. The Epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* Fungemia in Immunocompromised Patients with Cancer. *The American Journal of Medicine*. 112: 380-385, 2002.

BORGES, R. M.; SOARES, L. R.; BRITO, C. S.; BRITO, D. V. D.; ABDALLAH, V. O. S.; GONTIJO-FILHO, P. P. Fatores de risco associados à colonização por *Candida spp* em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42 (4): 431-435, 2009.

BRILHANTE, R.S.; COREDIRO, R.A.; MEDRANO, D.J. Onychomycosis in Ceara (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100:131-135, 2005.

BORST, A.; LEVERSTEIN-VAN GALL, M.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Detection of *Candida spp.* in blood cultures using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 39: 155-160, 2001.

BOUGNOUX, M. E.; DUPONT, C.; MATEO, J.; SAULNIER, P.; FAIVRE, V.; PAYEN, D.; NICOLAS-CHANOINE, M. H. Serum Is More Suitable than Whole Blood for Diagnosis of Systemic Candidiasis by Nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(4): 925-930, 1999.

BOUGNOUX, M. E.; KAC, G.; AEGERTER, P.; ENFERT, C.; FAGON, J. Y. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Medicine Journal*. 34(2): 292-299, 2008.

BRETAGNE, S. Advances and Prospects for Molecular Diagnostics of Fungal Infections. *Current Infectious Disease Reports*. 12:430–436, 2010.

COLOMBO, A.L.; PERFECT, J.; DINUBILE, M.; BARTIZAL, K.; MOTYL, M.; HICKS, P.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22:470-474, 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUER, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:2816-2823, 2006.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; PINA-VAZ, C.; MENDONÇA, D.; RODRIGUES, A. G. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *European Journal of Microbiology & Infectious Diseases*. 27: 365-374, 2008.

COTTEN, C. M.; MCDONALD, S.; STOLL, B.; GOLDBERG, R. N.; POOLE, K.; BENJAMIN, D. K. The Association of Third-Generation Cephalosporin Use and Invasive Candidiasis in Extremely Low Birth-Weight Infants. *Pediatrics Journal*. 118(2): 717-722, 2006.

COUTO, F. M. M.; MACEDO, D. P. C.; NEVES, R. P. Fungemia in a university hospital: an epidemiological approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44(6):745-748, 2011.

DARK, P. M.; DEAN, P.; WARHURST, G. Bench-To-Bedside Review: The Promise of Rapid Infection Diagnosis during Sepsis Using Polymerase Chain Reaction-Based Pathogen Detection. *Critical Care*, 13:217-222, 2009.

DEAN, P. P.; DARK, P. The Diagnostic Future for Bloodstream Infections? *Intensive Care Medicine*, 37:355-356, 2011.

DEL NEGRO, G. M. B. Identificação de cinco espécies de *Candida* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com risco de candidemia. Tese – Faculdade de Medicina de São Paulo; São Paulo, 2008. 95p.

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Journal*. 73: 45-48, 2012.

DOTIS, J.; ROILIDES, E. Candidemia in the Pediatric Intensive Care Unit: What's Different from Candidemia in Adults? *Current Fungal Infections Reports*, 5:49-55, 2011.

DOWNEY, L. C.; SMITH, P. B.; BENJAMIN, D. K.; COHEN-WOLKOWIEZ, M. Recent Advances in the Detection of Neonatal Candidiasis. *Current Fungal Infections Reports*. 4: 17-22, 2010.

EGGIMANN, P.; BILLE, J.; MARCHETTI, O. Diagnosis of Invasive Candidiasis in the ICU. *Annals of Intensive Care*. 1:37-46, 2011.

ELLIS, M.; HEDSTROM, U.; JUMAA, A.; BENER, A. Epidemiology, presentation, management and outcome of candidemia in a tertiary care teaching hospital in the United Arab Emirates, 1995-2001. *Medical Mycology*, 41:521-528, 2003.

FEFERBAUM, R.; PICCHI, M.; DINIZ, E. M. A.; CECCON, M. E. J. R.; KREBS, V. L. I.; TAKIGUTI, C.; RAMOS, J. L. A.; VAZ, F. A. C. Fatores associados à candidíase sistêmica em recém-nascidos na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. *Revista Paulista de Medicina*. 18(3): 121-124, 2000.

FREDRICKS, D.N.; SMITH, C.; MEIER, A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5122–5128, 2005.

FRIDKIN, S. K. The Changing Face of Fungal Infections in Health Care Settings. *Clinical Infectious Diseases*. 41:455-460, 2005.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I. N.; SEVERO, L. C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida* spp. Bloodstream Isolates from Latin American Hospitals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98(3):401-405, 2003.

GOLDANI, L. Z.; MÁRIO, P. S. S.; *Candida tropicalis* Fungemia in a Tertiary Care Hospital. *Journal of Infection*. 46(3):155-160, 2003.

GOULD, D. Diagnosis, prevention and treatment of fungal infections. *Nursing Standard*. 25(33): 38-47, 2011.

GRAU-CERRATO, S.; FERRÁNDEZ-QUIRANTE, O. Farmacoeconomía del tratamiento de las candidiasis invasoras. *Revista Iberoamericana de Micología*. 26(1): 90-93, 2009.

HACHEM, R.; HANNA, H.; KONTOYIANNIS, D.; JIANG, Y.; RAAD, I. The Changing Epidemiology of Invasive Candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the Leading Causes of Candidemia in Hematologic Malignancy. *American Cancer Society*, 112(11): 2493-2499, 2008.

HAN, S. S.; YIM, J. J.; YOO, C. G.; KIM, Y. W.; HAN, S. K.; SHIM, Y. S.; LEE, S. M. Clinical Characteristics and Risk Factors for Nosocomial Candidemia in Medical Intensive Care Units: Experience in a Single Hospital in Korea for 6.6 Years. *Journal of Korean Medicine Science*. 25: 671-676, 2010.

HENRY, T.; IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(4):1510-1515, 2000.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(4): 394-398, 2008.

HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, J. E.; FISHMAN, J. A., STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C. H.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clinical Infectious Diseases*, 48:1695-1703, 2009.

KAUFFMAN, C. A. Fungal Infections. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 3: 35-40, 2006.

KAUFMAN, D.; FAIRCHILD, K. D. Clinical Microbiology of Bacterial and Fungal Sepsis in Very-Low-Birth-Weight Infants. *Clinical Microbiology Reviews*. 17(3):638-680, 2004.

KAVANAGH, K. Fungi: Biology and Applications. London: Publisher Wiley. 267 pp. 2005.

KHLIF, M.; MARY, C.; SELLAMI, H.; SELLAMI, A.; DUMON, H.; AYADI, A.; RANQUE, S. Evaluation Of Nested And Real-Time PCR Assays In The Diagnosis Of Candidaemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 15:656-661, 2009.

KLUTTS, J. S.; ROBINSON-DUNN, B. A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology Laboratory in Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(9): S39-S42, 2011.

KOLLEF, M.; MICEK, S.; HAMPTON, N.; DOHERTY, J. A.; KUMAR, A. Septic shock attributed to Candida infection: importance of empiric therapy and source control. *Clinical Infectious Diseases Advance Access*. 1-27, 2012.

KOURKOUMPETIS, T. K.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; DESALEMOS, A.; MYLONAKIS, E. Polymerase Chain Reaction–Based Assays for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clinical Infectious Diseases Advance Access*. 1-10, 2012.

LAMOTH, F.; JATON, K.; PROD'HOM, G.; SENN, L.; BILLE, J.; CALANDRA, T.; MARCHETTI, O. Multiplex Blood PCR in Combination with Blood Cultures for Improvement of Microbiological Documentation of Infection in Febrile Neutropenia. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(10): 3510-35016, 2010.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, 52:197-205, 2009.

LÖFFLER, J.; HEBART, H.; SCHUMACHER, U.; REITZE, H.; EINSELE, H. Comparison of Different Methods for Extraction of DNA of Fungal Pathogens from Cultures and Blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(12): 3311-3312, 1997.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U. EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA, T.; GLAUSER, M.P.; TAUBER, M.G.; PITTET, D. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clinical Infectious Diseases*, 38:311-320, 2004.

MASSONET, C.; ELDERE, J. V.; VANEECHOUTTE, M.; DE BAERE, T.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Yeast Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(5):2209-2211, 2004.

MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F.; RUIZ, L.S.; AULER, M.E.; MARQUES, S.A.; PIRES, M.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia*. 154(2):63-69, 2002.

MAYR, A.; LASS-FLÖRL, C. Non–Culture-Based Methods for the Diagnosis of Invasive Candidiasis. *Current Fungal Infection Reports*. 5: 151-156, 2011.

MCCOOL, L.; MAI, H.; ESSMANN, M.; LARSEN, B. Tetracycline Effects on *Candida albicans* Virulence Factors. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 1-7, 2008.

MEERSSEMAN, W.; LAGROU, K.; MAERTENS, J.; VAN WIJNGAERDEN, E. Invasive Aspergillosis in the Intensive Care Unit. *Clinical Infectious Diseases*. 45: 205-216, 2007.

METWALLY, L.; FAIRLEY, D. J.; COYLE, P. V.; HAY, R. J.; HEDDERWICK, S.; MCCLOSKEY, B.; O'NEILL, H. J.; WEBB, C. H.; ELBAZ, W.; MCMULLAN, R. Improving molecular detection of *Candida* DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 57: 295-303, 2008.

MIKULSKA, M.; BASSETTI, M.; RATTO, S.; VISCOLI, C. Invasive Candidiasis in Non-Hematological Patients. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 3:e2011007, 2011.

MORACE, G.; BORGHI, E. Fungal Infections in ICU patients: Epidemiology, and the Role of Diagnostics. *Minerva Anestesiologica*. 76:950-956, 2010.

MORGAN, J.; MELTZER, M.I.; PLIKAYTIS, B.D.; SOFAIR, A.N.; HUIE-WHITE, S.; WILCOX, S.; HARRISON, L.H.; SEABERG, E.C.; HAJJEH, R.A.; TEUTSCH, S.M. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 26(6):540-547, 2005.

MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. M. D.; ALMEIDA-JÚNIOR, J. N.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Candidemia Epidemiology And Susceptibility Profile In The Largest Brazilian Teaching Hospital Complex. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(5):441-448, 2010.

MUSKETT, H.; SHAHIN, J.; EYRES, G.; HARVEY, S.; ROWAN, K.; HARRISON, D. Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. *Critical Care Journal*. 15: R287, 1-15, 2011.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5):561-570, 2010.

ODDS, F. C. Presidential address. *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. *Medical Mycology*. 32(1): 1-8, 1994.

OPAL, S. M.; CALANDRA, T. Antibiotic Usage and Resistance: Gaining or Losing Ground on Infections in Critically Ill Patients? *Journal of American Medical Association*. 302(21): 2367-2368, 2009.

ORTEGA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; LÓPEZ, J.; PITART, C.; MENSA, J. *Candida* Species Bloodstream Infection: Epidemiology And Outcome In A Single Institution From 1991 to 2008. *Journal of Hospital Infection*. 77:157-161, 2011.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive Mycoses: Diagnostic Challenges. *The American Journal of Medicine*. 125(1):S14-S24, 2012.

PAGANO, L.; LUMB, J. Update on Invasive Fungal Disease. *Future Microbiology*, 6(9):985-989, 2011.

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nature Reviews*. 8: 340-349, 2010.

PERES-BOTA, D.; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H.; DIMOPOULOS, G.; MELOT, C.; VINCENT, J. L. Potential Risk Factors For Infection With *Candida* spp. in Critically Ill Patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 10:550-555, 2004.

PERMÁN, J.; CANTÓN, E.; MIÑANA, J. J. C.; FLOREZ, J. A.; ECHEVERRIA, J.; ORTEGA, D. N.; ALARCÓN, J. M.; FONTANALS, D.; SARD, B. G.; MORENO, B. B.; TORROBA, L.; AYATS, J.; PÉREZ, M. A. B.; FÉRNANDEZ, M. A.; REUS, F. S.; NATAL, I. F.; GARCÍA, G. R.; EZPELETA, G.; MARTÍN-MANUELOS, E.; IGLESIAS, I.

REZUSTA, A.; OCARIZ, I. R.; NIETO, A. G. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad al fluconazol de los aislamientos de hemocultivos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28(2):91-99, 2011.

PERMÁN, J.; ZARAGOZA, R. Current Diagnostic Approaches to Invasive Candidiasis in Critical Care Settings. *Mycoses*. 53:424-433, 2009.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(9):3254-3259, 2001.

POUND, M. W.; DREW, R.; PERFECT, J. R. Recent advances in the epidemiology, prevention, diagnosis, and treatment of fungal pneumonia. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 15(2): 183-194, 2002.

PROWLE, J. R.; ESCHEVERRI, J. E. LIGABO, E. V.; SHERRY, N.; TAORI, G. T.; CROZIER, T. M.; HART, G. K.; KORMAN, T. M.; MAYALL, B. C.; JOHNSON, P. D. R.; BELLOMO, R. Acquired bloodstream infection in the intensive care unit: incidence and attributable mortality. *Critical Care Journal*. 15:R100, 1-11, 2011.

RESENDE, J. C. P.; RESENDE, M. A.; SALIBA, J. L. Prevalence of *Candida* spp. in hospitalized patients and their risk factors. *Mycoses*. 45: 306-312, 2002.

REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBEL, J.D.; FILLER, S.G.; PAPPAS, P.G.; DISMUKES, W.E.; EDWARDS, J.E. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 30:662-678, 2000.

RODRIGUES, M. T.; SIMÕES, L. Z.; DINIZ, C. G. Clinical, microbiological and therapeutic aspects of vulvovaginal candidiasis and recurrent vulvovaginal candidiasis: importance of regional surveys. *HU Revista*. 35 (3): 175-181, 2009.

RYAN, K. J.; RAY C. G.; AHMAD, N.; DREW W. L.; PLORDE, J. J. Sherris Medical Microbiology. 5th Edition. Atlanta: The McGraw-Hill Medical. 1040 pp. 2010.

SAN-BLASS, G.; BURGER, E. Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28(1):1–25, 2011.

SAN-BLAS, G.; BURGER, E. Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28(1): 1-25, 2011.

SAIMAN, L.; LUDINGTON, ELIZABETH; B. A.; PFALLER, M.; RANGEL-FRAUSTO, S.; WIBLIN, R. T.; DAWSON, J.; BLUMBERG, H. M.; PATTERSON, J. E.; RINALDI, M.; EDWARDS, JACK, E.; WENZEL, R. P.; JARVIS, W. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 19(4): 319-324, 2000.

SHOHAM, S.; MARWAHA, S. Invasive Fungal Infections in the ICU. *Journal of Intensive Care Medicine*, 25(2): 78-92, 2010.

SIDRIM, J. J. C.; COSTA, A. K. F.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; MOURA, F. E. A.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; NETO, M. P. A.; ROCHA, M. F. G. Molecular Methods for the Diagnosis and Characterization of *Cryptococcus*: a Review. *Canadian Journal of Microbiology*, 56:445-458, 2010.

SILVA, C.L.P.; SANTOS, R.M.R.; COLOMBO, A.L. Cluster of *Candida parapsilosis* primary bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. *The Brazilian Journal Infectious Diseases*, 5:32-36, 2001.

SILVA, R. L.; RIBEIRO, P.; ABREU, N.; FERREIRA, T.; FERNANDES, T.; MONTEIRO, A.; COSTA, F.; CALDAS, J.; SILVA, M.; CARANDE, L.; FERREIRA, G.; CONDUTO, A.; CRUZ, E.; SOUSA, M. H.; RODRIGUES, A. S.; COSTA, I.; VEIGA, J.; SOUSA, A. B.

Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Neutropenic Patients. Comparison between Serum Galactomannan and Polymerase Chain Reaction. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 4:81-88, 2010.

SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F.G. Candidíase. In *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Eds, J.J.C. Sidrim and M.F.G. Rocha. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 265-274, 2004.

SPILIOPOULOU, A.; DIMITRIOU, G.; JELASTOPULU, E.; GIANNAKOPOULOS, I.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. Neonatal Intensive Care Unit Candidemia: Epidemiology, Risk Factors, Outcome, and Critical Review of Published Case Series. *Mycopathologia*. 9498-3: 1-10, 2011.

TORTORANO, A.M.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C.C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R.; ECMM WORKING GROUP ON CANDIDAEMIA. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 23:317-322, 2004.

TRAGIANNIDIS, A.; FEGELER, W.; RELLENSMANN, G.; DEBUS, V.; MÜLLER, V.; HOERNIG-FRANZ, I.; SIAM, K.; PANA, Z. D.; JÜRGENS, H.; GROLL, A. H. Candidaemia in a European Paediatric University Hospital: a 10-year observational study. *Clinical Microbiology and Infection Journal*. 18: E27-E30, 2011.

VALLÉS, J.; FERRER, R. Bloodstream Infection in the ICU. *Infectious Disease Clinics of North America*. 23: 557-569, 2009.

VELASCO, E.; BIGNI, R. A prospective cohort study evaluating the prognostic impact of clinical characteristics and comorbid conditions of hospitalized adult and pediatric cancer patients with candidemia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 27: 1071-1078. 2008.

VINCENT, J. L.; RELLO, J.; MARSHALL, J.; SILVA, E.; ANZUETO, A.; MARTIN, C. D.; MORENO, R.; LIPMAN, J.; GOMERSALL, C.; SAKR, Y.; REINHART, K. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *Journal of the American Medical Association*. 302(21):2323-2329, 2009.

WATSON, R. S.; CARCILLO, J. A.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; CLERMONT, G. LIDICKER, J.; ANGUS, D. C. The Epidemiology of Severe Sepsis in Children in the United States. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167:695-701, 2003.

WENGENACK, N. L.; BINNICKER, M. J. Fungal Molecular Diagnostics. *Clinics In Chest Medicine*. 30: 391-408, 2009.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*, 315–322, 1990.

WHITE, P. L.; PERRY, M.; BARNES, R. A. Polymerase Chain Reaction Diagnosis of Fungal Disease: Finally Coming of Age. *Advances in Diagnosis and Early Therapy*. 3: 207-215, 2009.

WHITE, P. L.; BRETAGNE, S.; KLINGSPOR, L.; MELCHERS, W. J. G.; MCCULLOCH, E.; SCHULZ, B.; FINNSTROM, N.; MENGOLI, C.; BARNES, R. A.; DONNELLY, J. P.; LOEFFLER, J. Aspergillus PCR: One Step Closer to Standardization. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(4): 1231-1240, 2010.

YLIPALOSAARI, P.; ALA-KOKKO, T. I.; KARHU, J.; KOSKELA, M.; LAURILA, J.; OHTONEN, P.; SYRJÄLÄ, H. Comparison of the epidemiology, risk factors, outcome and degree of organ failures of patients with candidemia acquired before or during ICU treatment. *Critical Care Journal*. 16:R62, 1-28, 2012.

ZAOUTIS, T. E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J. A.; WALSH, T. J.; FEUDTNER, C. The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in Adults and Children Hospitalized

in the United States: A Propensity Analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 41: 1232:1239, 2005.

ZAOUTIS, T. E.; PRASAD, P. A.; LOCALIO, A. R.; COFFIN, S. E.; BELL, L. M.; WALSH, T. J.; GROSS, R. Risk Factors and Predictors for Candidemia in Pediatric Intensive Care Unit Patients: Implications for Prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5):e38-e45, 2010.

ZILBERBERG, M. D.; KOLLER, M. H.; ARNOLD, H.; LABELLE, A.; MICEK, S.; KOTHARI, S.; SHORR, A. F. Inappropriate empiric antifungal therapy for candidemia in the ICU and hospital resource utilization: a retrospective cohort study. *BioMed Central Infectious Diseases*. 10:150-156, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO TERMO DE PARTICIPAÇÃO E CONSENTIMENTO

Você é convidado a participar da pesquisa “BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DE FUNGEMIAS: PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS E COMPARAÇÃO COM MÉTODOS CONVENCIONAIS”. Este projeto, coordenado pela pesquisadora Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida, irá analisar novos métodos de diagnóstico de micoses sistêmicas, comparando-os com os métodos atualmente utilizados. Caso concorde, faremos a coleta de uma alíquota de sangue. A coleta de sangue será realizada com a introdução de uma agulha estéril na veia e, de acordo com a sensibilidade, você poderá sentir uma leve ardência no local. O risco da coleta de sangue poderá incluir vermelhidão e raramente deixar o local de introdução da agulha inchado e com manchas roxas.

As informações serão mantidas em sigilo e o seu nome nunca será divulgado. Você não terá nenhuma despesa com a pesquisa. Durante a pesquisa você poderá tirar qualquer dúvida a respeito do trabalho, e se necessário entrar em contato conosco pelo telefone (17) 3201-5700 (ramal 5843).

Caso tenha questões sobre esse acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (17) 3201-5813.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Nome do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Pesquisador responsável:

Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Laboratório de Microbiologia - FAMERP - Fone: (17) 3201-5700 ramal 5843

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 Vila São Pedro – CEP 15090-000

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 03/07/2012

Assinatura