



Biologia Molecular como ferramenta de detecção fúngica no sangue: auxílio diagnóstico e redução de gastos

Molecular Biology as a tool for fungal detection on blood: diagnostic aid and cost reduction

João Paulo Zen Siqueira¹ , Margarete Teresa Gottardo de Almeida¹ 

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP-Brasil

Resumo

Introdução: Os avanços médicos das últimas décadas contribuíram para aumentar a sobrevivência de pacientes críticos e com a resposta imune comprometida. Consequentemente, a população em risco de adquirir infecções de origem fúngica também cresceu. Com altas taxas de morbidade e mortalidade, o difícil diagnóstico deste tipo de infecção, em conjunto com terapias ineficazes, gera elevados custos e sobrecarga ao sistema de saúde. **Objetivos:** Padronizar um método molecular de detecção fúngica diretamente do sangue e avaliar esta técnica comparativamente com a atualmente considerada padrão-ouro (hemocultura), associando aspectos clínicos, tempo de realização das técnicas e os custos envolvidos. **Casuística e Métodos:** Neste sentido, 94 pacientes com suspeita de infecção de corrente sanguínea foram submetidos a uma técnica de *nested* PCR para detecção de DNA fúngico. **Resultados:** A técnica molecular foi positiva em 48,9% das amostras, enquanto que a hemocultura foi positiva em apenas 13,0% dos casos. Esses resultados demonstram uma alta sensibilidade do *nested* PCR e com um valor preditivo negativo de 100% em pacientes com suspeita clínica de infecção fúngica sistêmica e em situações de risco. O tempo de realização do método e os custos associados a ele, em comparação à hemocultura, também demonstraram seu potencial para uso clínico. **Conclusões:** Em comparação com a hemocultura, o método padronizado de *nested* PCR constitui um teste rápido e economicamente viável capaz de descartar uma infecção sistêmica provocada por fungo, podendo facilitar o diagnóstico e evitar terapias ineficientes e caras, diminuindo o tempo de internação e os impactos econômicos gerados por esse tipo de infecção.

Descritores: Infecções Fúngicas Invasivas; Biologia Molecular; Diagnóstico.

Abstract

Introduction: Medical advances in the past decades have contributed to the increase of survival of critically ill patients and the ones with impaired immune response. Consequently, the population at risk of acquiring a fungal infection also has increased. This type of infection generates expensive costs and heavy burden to the Health system. It also brings high morbidity and mortality rates, difficulty in diagnosing, and ineffective therapies. **Objectives:** Standardize a molecular method of fungal detection directly from blood and compare this technique with the blood culture, which is currently considered the gold standard. It associates clinical aspects, time, and costs involved. **Patients and Methods:** In this sense, 94 patients with suspected bloodstream infection were submitted to the technique of nested PCR for detection of fungal DNA. **Results:** The molecular technique was positive in 48.9% of the samples, while the blood culture was positive in only 13% of the cases. These results demonstrate high sensibility of the nested PCR and negative predictive value of 100%. The performing time and the costs associated with the method also demonstrated its value for clinical use. **Conclusions:** Therefore, the nested PCR is a quick and economically viable test, capable of ruling out a systemic infection caused by fungus, being able to facilitate the diagnosis, avoid inefficient and expensive therapies, and decrease the length of hospital stay, reducing the burden caused by this type of infection.

Descriptors: Invasive Fungal Infections; Molecular Biology; Diagnosis.

Contribuição dos autores: JPZS coleta, tabulação, discussão dos achados e redação do manuscrito. MTGA orientação do projeto, delineamento do estudo, discussão dos achados e elaboração do manuscrito.

Contato para correspondência:

João Paulo Zen Siqueira

E-mail:

joao.siqueira@famerp.br

Conflito de interesses: Não

Financiamento: CAPES

Recebido: 13/03/2018

Aprovado: 17/12/2018



Introdução

Os avanços das últimas décadas na medicina, incluindo o suporte intensivo, técnicas operatórias e estratégias profiláticas e preventivas, melhoraram a sobrevivência de pacientes críticos e com a resposta imune comprometida. No entanto, uma consequência destes avanços médicos é o aumento na incidência de infecções adquiridas em ambiente hospitalar¹⁻². Neste sentido, as infecções de origem fúngica merecem destaque, sendo a quarta maior causa de sepse, correspondendo entre 5% a 10% dos casos³. Em unidades de terapia intensiva (UTI), onde pacientes recebem múltiplos e agressivos tratamentos, este problema se agrava⁴⁻⁵. O principal agente fúngico neste ambiente é o gênero *Candida*, sendo responsável por 90 a 95% das infecções fúngicas documentadas^{1,6}.

Infecções fúngicas sistêmicas ocorrem quando é estabelecido um comprometimento nos mecanismos de defesa do hospedeiro e micro-organismos comensais ou colonizadores disseminam-se via hematogênica ou por translocação tecidual, podendo atingir diferentes órgãos⁷. O gerenciamento deste tipo de infecção continua um desafio. Os altos níveis de morbidade e de mortalidade, aliados aos gastos gerados, causam uma sobrecarga para o sistema de saúde¹.

Atualmente, o método padrão-ouro para o diagnóstico de uma infecção de corrente sanguínea por fungo (fungemia) é baseada na detecção direta do agente em cultivos sanguíneos (hemocultura)⁸. Entretanto, este método se caracteriza pela baixa sensibilidade e demora de, no mínimo, dois dias para detecção e uma semana para identificação. Aliado a isso, a falta de especificidade das apresentações clínicas, a baixa utilidade de testes sorológicos e a indisponibilidade de métodos moleculares padronizados dificultam ainda mais o diagnóstico⁹⁻¹⁰. A precisão do método, aliada ao rápido diagnóstico, são considerados elementos-chave para redução dos índices de mortalidade e dos custos gerados ao Sistema de Saúde^{3,9,11}. Métodos moleculares capazes de detectar DNA fúngico diretamente de amostras clínicas tem o potencial de melhorar o diagnóstico deste tipo de infecção de forma rápida e precisa, podendo guiar a terapêutica e reduzir tratamentos desnecessários e ineficazes, evitando custos, toxicidade e seleção de cepas resistentes¹². Apesar de promissor, o diagnóstico molecular ainda é considerado pouco factível na prática clínica; sua padronização é pré-requisito obrigatório e pesquisas ainda são necessárias neste sentido¹³.

Considerado o exposto, os objetivos do presente estudo foram padronizar um método molecular de detecção fúngica diretamente do sangue, avaliar seu limite de detecção e comparar esta técnica com a cultura, associando aspectos clínicos, tempo de realização e os custos envolvidos (para realizar as técnicas e com a internação dos pacientes).

Casística e Métodos

População do Estudo

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (parecer nº 087/2010). Somente foram incluídos pacientes cujos familiares assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando a colheita do sangue, que foi realizada entre junho e setembro de 2011. A população foi composta por 94 pacientes (sistema público de saúde, convênios e particulares) internados nas Unidades de Terapia Intensiva, sendo 72 da UTI Geral e 22 da UTI Neonatal, de um Hospital Escola do estado de São Paulo, Brasil. Todos possuíam suspeita clínica de infecção de corrente sanguínea. Os dados clínicos e microbiológicos foram correlacionados de acordo com: 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.

Amostras

Uma amostra de sangue total foi colhida por paciente. Uma alíquota deste sangue foi direcionada para o frasco de hemocultura para inclusão no 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. O volume de sangue utilizado para esta investigação foi de 4,0 ml em adultos e 0,5 ml em neonatos. Controles positivos e negativos foram incluídos no processo como controle de qualidade. Como controles negativos, utilizou-se o sangue de seis doadores saudáveis. O controle positivo constituiu de 4,0 ml de sangue, de um voluntário saudável, inoculado com 100 µl de uma suspensão de *Candida albicans*, em concentração de 0,5 na escala de MacFarland (1 x 10⁶ a 5 x 10⁶ células/ml). Para testar o limite de detecção do teste, amostras de sangue de um voluntário saudável foram inoculadas com diluições decrescentes da suspensão de *Candida albicans* e submetidas à extração até que a reação não fosse mais positiva.

Extração de DNA

Seguiu-se o protocolo descrito por LÖFFLER *et al.* (1997)¹⁴, com modificações conforme descrição a seguir: o sangue total foi transferido para tubos estéreis de 15 ml, onde o volume do tubo foi completado adicionando-se tampão PBS estéril (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM). Centrifugou-se a 900 G, por 10 min. Para ruptura das células vermelhas, retirou-se o sobrenadante e foi adicionado 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 foi 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 foi 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 foi suspenso com 200 µl de PBS. A partir desta etapa, a amostra foi 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 foi então eluído com água Milli-Q e armazenado a -20°C até o momento do uso. A quantificação e análise de pureza foram estabelecidas pelo espectrofotômetro BioPhotometer da Eppendorf®.

Amplificação do DNA e Reação de *Nested* PCR

Seguiu-se o protocolo descrito por HENRY *et al.* (2000)¹⁵. 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 ITS do DNA ribossomal, incluindo as regiões ITS1, 5.8S e ITS2¹⁶. 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, um segundo ciclo de reação de PCR era realizado utilizando o produto da primeira ciclagem como molde para a segunda (*nested* PCR). 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 ITS1 do DNA ribossomal, 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. Os produtos de amplificação foram observados por eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma®).

Análises de Custo e Estatística

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. Em acordo com o setor responsável do Hospital, os custos gerados pela internação dos pacientes também foram levantados. Sobre o diagnóstico molecular, todos os materiais e reagentes foram cotados, calculando um valor aproximado estimado para a realização do procedimento em questão.

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 dos pacientes com os resultados do *nested* PCR, foram observadas estatisticamente pelo teste exato de Fisher.

Resultados

Nested PCR

Após padronização do protocolo com amostras-controle e avaliação do limiar de detecção da técnica, observou-se que o limite de positividade ocorreu entre 5 e 25 células fúngicas por amostra de 4 ml de sangue total (avaliado pela positividade da amostra após inóculo de 100 µl de suspensão de leveduras em uma diluição de 1:20.000 da escala 0,5 de MacFarland) (Figura 1).

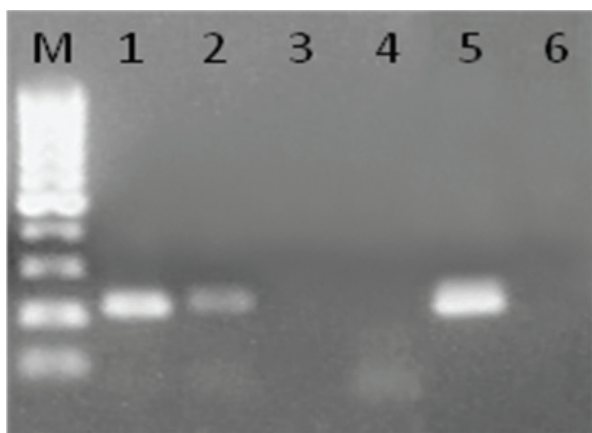


Figura 1. Gel de agarose com produtos da reação *nested* PCR. Linhas 1 e 2 são reações positivas. A linha 2 corresponde a última diluição positiva (100 µl de suspensão de leveduras, em uma diluição de 1:20.000 da escala 0,5 de MacFarland), ou seja, o limite de detecção da técnica. As linhas 3 e 4 correspondem a diluições onde o DNA não foi detectado, sendo, portanto, negativas. A linha 5 constitui o controle positivo e a 6, o controle negativo da reação; M, marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

Em seguida, as amostras de sangue dos pacientes com suspeita clínica de infecção de corrente sanguínea começaram a ser testadas. Das 94 amostras, 46 (48,9%) foram positivas pelo *nested* PCR.

Os valores percentuais de positividade foram próximos quando considerando as duas origens de internação (UTI Geral e Neonatal). Assim, em 72 amostras de pacientes da UTI Geral, 35 (48,6%) foram positivas, enquanto da UTI Neonatal, de 22 amostras, este perfil foi observado em 11 delas (50,0%).

Comparação com a Hemocultura

A positividade de infecções fúngicas pelo método convencional da hemocultura foi observada em apenas sete casos (7,4 %). Na análise comparativa dos métodos diagnósticos (*nested* PCR e hemocultura), com relação à positividade, a concordância ocorreu para estes sete casos, onde o *nested* PCR foi positivo e na cultura identificaram-se as seguintes espécies: *Candida parapsilosis* (2), *Candida lusitaniae* (2), *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Em todos os casos negativos para o *nested* PCR, também houve concordância com a hemocultura, denotando um valor preditivo negativo de 100% da técnica molecular. A discordância, entretanto, foi notada nas 88 hemoculturas negativas, onde 41 (46,6%) delas foram positivas em pelo *nested* PCR.

Correlação com Parâmetros Clínicos

A **Tabela 1** relaciona as variáveis demográficas, características clínicas e a evolução dos pacientes com os resultados do *nested* PCR. Pode-se verificar que as doenças de base observadas neste estudo e as características clínicas que classicamente podem constituir fatores de risco para fungemia, em geral, parecem ter uma relação direta com uma maior positividade para o *nested* PCR. No entanto, nenhuma das diferenças foram estatisticamente significativas. A média de dias de internação e a taxa de mortalidade também foram superiores nos pacientes positivos para o *nested* PCR, porém, também não foram estatisticamente significativas.

Tempo de Realização das Técnicas

Com relação às hemoculturas, a detecção de leveduras na amostra de sangue total aconteceu em média no terceiro dia após a coleta. Entretanto, para o reconhecimento da espécie fúngica, este tempo se estendeu até o oitavo dia, dados os parâmetros morfológicos e bioquímicos de identificação. Considerando-se as hemoculturas negativas, a liberação do resultado ocorreu no sétimo dia de análise.

Comparativamente, a detecção fúngica via *nested* PCR ocorreu no tempo máximo de 10,5 horas, sendo casos positivos ou negativos, considerando todas as etapas do processo (extração e amplificação de DNA e detecção em gel de agarose).

Custos

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. Para a realização da hemocultura, os valores médios levantados foram de R\$18,48, R\$26,00 e R\$35,00, para o SUS, convênios e particular, respectivamente.

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

Os valores gastos com os procedimentos médico-hospitalares durante o período internado dependem do tempo de internação e do convênio. A **Tabela 2** apresenta a distribuição de valores gastos com os

procedimentos médico-hospitalares durante o período de internação, e os respectivos planos de Saúde.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas e, evolução dos casos positivos (*) e negativos (†) para fungemia, utilizando a técnica nested PCR. Pacientes internados em hospital escola, estado de São Paulo, Brasil, 2011.

Variável	Total	Pos*	Neg†
Pacientes	94	46	48
Dados demográficos			
Média de idade (0-88)	41,3	42,3	40,2
Sexo masculino	64	28	36
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	18	12	6
Doença renal	15	9	6
Diabetes	12	7	5
Doença neurológica	8	5	3
Câncer	8	6	2
Doença hepática	7	5	2
Infecção por HIV	2	1	1
Características			
Cateter Venoso Central	74	39	35
Ventilação mecânica	66	30	36
Hipertensão arterial	31	14	17
Trauma (cirurgia)	18	12	6
Nutrição parenteral	11	7	4
Uso de antibiótico (antibacterianos)	74	41	33
Uso de fluconazol	10	7	3
Uso de anfotericina B	3	1	2
Uso de voriconazol	1	0	1
Uso de micafungina	1	0	1
Mortalidade geral	42	24	18

Tabela 2. Duração e custo da internação de pacientes internados em hospital escola, com suspeita clínica de infecção da corrente sanguínea. Estado de São Paulo, Brasil, 2011.

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

*, número de pacientes; †, média dos valores

Discussão

As infecções fúngicas sistêmicas, principalmente nas últimas décadas, surgiram como um problema no âmbito hospitalar, uma vez que representam elevadas taxas de mortalidade e morbidade^{1,17-18}. A inadequação técnica e demora no diagnóstico, com consequente permanência do paciente no âmbito hospitalar, contribuem para elevação de custos e piora do prognóstico^{17,19}. Este estudo mostrou que métodos moleculares podem ser alternativas viáveis para análise laboratorial de doenças fúngicas sistêmicas, tanto pelo aspecto técnico quanto pelo econômico, com rapidez e confiabilidade dos resultados. A técnica de *nested* PCR foi escolhida por sua maior especificidade

e sensibilidade quando comparada aos métodos convencionais, já comprovadas em casos de candidemia²⁰⁻²¹. Conforme descrito anteriormente, e aqui observado, sua alta sensibilidade se deve ao poder de detecção de mínimas quantidades de DNA em amostras de sangue total ou soro²²⁻²³. Ademais, a porção do DNA que é alvo da reação (região ITS) é altamente conservada nos fungos, capacitando a técnica a detectar a mais ampla variedade de espécies de fungos¹⁶.

Diante disso, e pelo caráter das infecções no ambiente estudado, a discrepância entre as técnicas pode ser explicada. Infecções sistêmicas, fúngicas ou bacterianas, podem ocorrer mesmo em vigência de exames microbiológicos (hemocultura) negativos^{20,24-25}. Fatores intrínsecos do hospedeiro (febre, resposta imune etc.), vigência de terapia antifúngica e a disseminação de quantidade variável de micro-organismos no momento da coleta, viáveis ou não, podem explicar a baixa sensibilidade da cultura e, portanto, a variação na taxa de detecção dos métodos²⁶. Métodos moleculares, como o *nested* PCR, revelam índices de positividade maiores, já que frações mínimas de DNA fúngico circulante no momento da coleta de sangue podem ser amplificadas e, portanto, detectados com maior sensibilidade²⁷⁻³².

Avaliando os fatores de risco para aquisição de infecção fúngica oportunista, pôde-se observar a presença maciça destas características na população estudada, já que os pacientes estavam internados em unidades de tratamento intensivo e possuíam suspeita clínica de infecção^{3,33-34}. Assim, mesmo que não estatisticamente significativa, a presença dos fatores de risco clássicos como acometimento pulmonar, cardíaco ou renal e uso de cateter venoso central, parecem colaborar para uma maior probabilidade de infecção de origem fúngica e, conseqüentemente, de positividade pelo *nested* PCR. No entanto, um estudo com um número maior de pacientes e grupos controle se torna necessário a fim de estabelecer essa relação epidemiológica.

A demora na administração da terapia antimicrobiana correta é outro fator determinante na evolução dos pacientes em choque séptico. A ineficiência deste processo prejudica a evolução do paciente e gera um fardo econômico para o hospital, já que o tempo de internação se prolonga³⁵. 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 e dificulta a tomada de decisões³⁶. Além disso, os pacientes de UTIs são acometidos por diversas situações clínicas que agravam e potencializam a ocorrência de doenças fúngicas oportunistas³⁷. Como foi demonstrado neste estudo, com apenas 10,5 h de trabalho foi possível obter os resultados da biologia molecular. Este resultado, além de rápido, possui um valor preditivo negativo muito alto (100% para este trabalho), mostrando que o *nested* PCR é capaz de excluir a possibilidade de fungemia no indivíduo. O fato de a candidemia representar a *causa mortis* em torno de 30-40% dos pacientes em Unidades de Terapia Intensiva^{25,31,38}, sendo a principal causa de infecção fúngica invasiva nessas unidades³⁹, corrobora a importância deste método molecular para tratamento e gerenciamento da infecção, seja para exclusão da suspeita de fungemia ou como informação para um tratamento preemptivo.

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 infecção⁴⁰. Os custos de internação obtidos no presente estudo comprovaram o aumento significativo dos valores a cada dia. Além disso, quanto maior o tempo de estadia em ambiente hospitalar, particularmente em UTIs, maior o risco de aquisição de doença fúngica sistêmica³³. 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 comorbidades⁴⁰. Pelos dados apresentados neste trabalho, expõe-se que uma rotina de diagnóstico molecular deve ser levada em consideração, não somente pelo avanço diagnóstico, mas como uma estratégia para minimizar gastos, diminuindo o tempo de internação dos pacientes e possibilitando a adoção de tratamentos mais eficientes.

As perspectivas futuras para este trabalho incluem a adoção de uma técnica molecular que não somente detecte como também identifique a espécie fúngica causadora da doença sistêmica, sem que haja aumento significativo no valor da técnica. 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 de um hospital terciário.

Conclusão

O método molecular *nested* PCR permite detectar DNA fúngico, direto do sangue, de forma rápida e economicamente viável. A técnica é capaz de descartar uma infecção sistêmica provocada por fungo, por apresentar um alto valor preditivo negativo. Considerando a baixa sensibilidade da cultura, o *nested* PCR pode melhorar o gerenciamento deste tipo de infecção, evitando terapias ineficientes e caras, diminuindo o tempo de internação do paciente e as sobrecargas geradas ao sistema de saúde.

Referências

- Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Alexander B, Brumble L, Freifeld A, et al. The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Transpl Infect Dis*. 2016;18(6):921-31. doi: 10.1111/tid.12613;
- Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 2014;10:95-105. doi: 10.2147/TCRM.S40160.
- Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(1):78-81. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.09.005.
- Bajwa S, Kulshrestha A. Fungal infections in intensive care unit: challenges in diagnosis and management. *Ann Med Health Sci Res*. 2013;3(2):238-44. doi: 10.4103/2141-9248.113669.
- Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoëu-Ndam L, Wolff M, et al. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002–2010). *Intensive Care Med*. 2014;40(9):1303-12. doi: 10.1007/s00134-014-3408-3;
- Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(Supl6):5-10. doi: 10.1111/1469-0691.12539.
- Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(1):42-8. doi: 10.1016/j.riam.2013.10.001.
- Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive candidiasis. *N Engl J Med*. 2015;373:1445-56. DOI: 10.1056/NEJMr1315399.
- Dark PM, Dean P, Warhurst G. Bench-to bedside review: the promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction-based pathogen detection. *Crit Care*. 2009;13(4):217. doi: 10.1186/cc7886.
- Silva R, Silva Neto J, Santos C, Frickmann H, Poppert S, Cruz K, et al. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. BioMed Central. 2015;14:6. doi: 10.1186/s12941-015-0065-5.
- Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis*. 2013;56(9):1284-92. doi: 10.1093/cid/cit006.
- Bailly S, Maubon D, Fournier P, Pelloux H, Schwebel C, Chapuis C, et al. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. – Trends over 10 years. *J Infect*. 2016;72(1):103-11. doi: 10.1016/j.jinf.2015.09.041.
- Klutts JS, Robinson-Dunn B. A critical appraisal of the role of the Clinical Microbiology Laboratory in diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9Supl):S39-42. doi: 10.1128/JCM.00468-11.
- Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol*. 1997;35(12):3311-2.
- Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol*. 2000;38(4):1510-5.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR protocols: a guide to methods and applications. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor. *Titulo do capítulo*. New York: Academic Press; 1990. p. 315-22.
- Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules*. 2014;19(1):1085-119. doi: 10.3390/molecules19011085.
- Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T, et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection*. 2013;41(3):645-53. doi: 10.1007/s15010-013-0432-0.
- Ramana KV, Kandi S, Bharatkumar V, Sharada CV, Rao R, Mani R, et al. Invasive fungal infections: a comprehensive review. *Am J Infect Dis Microbiol*. 2013;1(4):64-9.
- Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol*. 2002;40(7):2483-9. doi: 10.1128/JCM.40.7.2483-2489.2002.
- Del Negro GMB. Identificação de cinco espécies de *Candida* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com risco de candidemia [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
- Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, et al. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol*. 1999;37(4):925-30.
- Khilif M, Mary C, Sellami H, Sellami A, Dumon H, Ayadi A, et al. Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(7):656-61. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02762.x.
- Opota O, Jatón K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(4):323-31. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.005.
- Ma C, Li F, Shi L, Hu Y, Wang Y, Huang M, et al. Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. *BMC Infect Dis*. 2013;13:337. doi: 10.1186/1471-2334-13-337.
- Lamoth F, Jatón K, Prod'homme G, Senn L, Bille J, Calandra T, et al. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3510-6. DOI: 10.1128/JCM.00147-10.
- Loonen AJM, Jager CPC, Tosserams J, Kusters R, Hilbink M, Wever PC, et al. Biomarkers and molecular analysis to improve bloodstream infection diagnostics in an emergency care unit. *PLoS One*. 2014;9:e87315. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087315.
- Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):490-526. doi: 10.1128/CMR.00091-13.
- Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res*. 2014;139(2):195-204.
- León C, Ostrosky-Zeichner L, Schuster M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2014;40(6):808-19. doi: 10.1007/s00134-014-3281-0.
- Hegazi M, Abdelkader A, Zaki M, El-Deek B. Characteristics and risk factors of candidemia in pediatric intensive care unit of a tertiary care children's hospital in Egypt. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(5):624-34. doi: 10.3855/jidc.4186.
- Dzierzanowska-Fangrat K, Romanowska E, Gryniewicz-Kwiatkowska O, Migdał M, Witulska K, Ryżko J, et al. Candidaemia in a Polish tertiary paediatric hospital, 2000 to 2010. *Mycoses*. 2014;57(2):105-9. doi: 10.1111/myc.12107.
- Berdal JE, Haagensen R, Ranheim T, Bjørnholt J V. Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a Norwegian secondary hospital. *PLoS One*. 2014;9:e103916. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103916.
- Vogiatzi L, Iliá S, Sideri G, Vagelakoudi E, Vassilopoulou M, Sdoukka M, et al. Invasive candidiasis in pediatric intensive care in Greece: a nationwide study. *Intensive Care Med*. 2013;39(12):2188-95. doi: 10.1007/s00134-013-3057-y.
- Kollef M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A. Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis*. 2012;54(12):1739-46. doi: 10.1093/cid/cis305.
- Oeser C, Lamagni T, Heath PT, Sharland M, Ladhani S. The epidemiology of neonatal and pediatric candidemia in England and Wales, 2000–2009. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(11):23-6. doi: 10.1097/INF.0b013e318275612e.
- Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol*. 2013;51:4167-72. DOI: 10.1128/JCM.01998-13.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059373
- Ylipalosaari P, Ala-Kokko TI, Karhu J, Koskela M, Laurila J, Ohtonen P, et al. Comparison of the epidemiology, risk factors, outcome and degree of organ failures of patients with candidemia acquired before or during ICU treatment. *Crit Care*. 2012;16(2):R62. doi: 10.1186/cc11307.
- Tinoco-Araujo JE, Araújo DFG, Barbosa PG, Santos PSS, Medeiros AMC. Candidíase invasiva e alterações bucais em recém-nascidos prematuros. *Einstein (São Paulo)*. 2013;11(1):71-5. http://dx.doi.org/10.1590/S1679-45082013000100013.