



**Ana Constança
Pinheiro Mendes**

**Detecção de DNA microbiano em amostras clínicas e
culturas bacterianas**



**Ana Constança
Pinheiro Mendes**

**Detecção de DNA microbiano em amostras clínicas e
culturas bacterianas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor José Manuel Cabeda, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa do Porto e co-orientação da Dr.^a Maria Helena Ramos, Professora Associada Convidada do Instituto de Ciências Abel Salazar da Universidade do Porto e Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor João Carlos Sousa
Professor Catedrático da Universidade Fernando Pessoa do Porto

Prof. Dr.^a Maria Helena Santos Ramos
Professora Associada Convidada do Instituto Ciências Abel Salazar da Universidade do Porto

Prof. Doutor José Manuel Cabeda
Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa do Porto

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Prof. Doutor José Manuel Cabeda, meu orientador, por todo o apoio, confiança, disponibilidade e incentivo ao longo deste projecto. Agradeço-lhe ainda a generosidade com que sempre partilhou o saber, conhecimento e oportunidades.

À Dr.^a Maria Helena Ramos, co-orientadora deste projecto, pela ajuda preciosa em momentos cruciais e pelo rigor e atenção inestimáveis.

À Prof. Doutora Sónia Mendo, co-orientadora, pela disponibilidade e acompanhamento.

À Sandra João Fernandes agradeço por tudo. Foram dois anos de trabalho intenso, muita amizade, apoio incondicional, fé inabalável. Espero ser capaz de retribuir tanto carinho e paciência.

A toda a equipa que constitui a Unidade de Biologia Molecular do Centro Hospitalar do Porto, particularmente à Mónica Pereira e João Rodrigues, que me desvendaram os “mistérios” do sequenciador.

À minha família. À minha mãe.

Ao Nelson, que apesar da distância esteve sempre presente.

palavras-chave

Sépsis, SeptiFast™, bacterémia, fungémia, 16S rRNA, PCR em Tempo Real, Sequenciação, bactérias.

resumo

As infecções do sistema circulatório constituem um campo prioritário de intervenção, com cerca de 200000 casos de bacterémia e fungémia anualmente nos EUA, com taxas de mortalidade associadas entre 20 e 50%. Os métodos convencionais de detecção de microrganismos a partir do sangue (hemocultura) atingiram um nível de desenvolvimento difícil de melhorar. No entanto, continua a ser desejável conseguir resultados com maior sensibilidade, capazes de contornar o efeito inibitório da antibioterapia empírica muitas vezes instituída previamente à colheita, em tempo clinicamente útil. Foi testado um sistema comercial de extracção, amplificação e detecção por PCR em tempo real, SeptiFast Test, (Roche), capaz de identificar 25 espécies de bactérias e fungos directamente a partir de amostras de sangue, em cerca de 6 horas. Os resultados obtidos, quando comparados com a evidência de infecção, mostraram sensibilidade semelhante à da hemocultura (67 e 68% respectivamente) e igual valor preditivo negativo (88%), no entanto o VPN do SeptiFast é limitado aos 25 microrganismos contemplados no teste molecular. A aplicação prática do teste beneficiaria da automatização do protocolo de extracção de ácidos nucleicos, sendo importante a selecção criteriosa dos pacientes testados de forma a que este seja mais vantajoso numa relação custo-benefício. O sistema SeptiFast representa um método complementar aos métodos convencionais, podendo em fornecer informação importante em tempo clinicamente útil.

No que respeita à identificação de agentes bacterianos isolados em cultura, por vezes surgem dificuldades em chegar a uma identificação conclusiva pelos métodos fenotípicos convencionais. Foi implementada uma metodologia de sequenciação automática directa, usando o sistema MicroSeq 500 Bacterial Identification Kit (Applied Biosystems). Durante um ano foram estudadas 54 estirpes com perfis de identificação ambíguos pelos métodos tradicionais. Os resultados obtidos por sequenciação foram compatíveis com a suspeita clínica, ou confirmados pelos resultados do programa de controlo de qualidade externo NEQAS.

A identificação por sequenciação tornou-se uma ferramenta importante no apoio à identificação bacteriana, particularmente em bacilos gram positivo, bacilos gram negativo fastidiosos, *Streptococcus* do grupo viridans e bactérias anaeróbias, organismos de identificação fenotípica problemática.

keywords

Sepsis, SeptiFast™, bacteremia, fungemia, 16S rRNA, Real Time PCR, sequencing, bacteria.

abstract

Bloodstream infections remain a priority, with about 200000 cases of bacteremia and fungemia annually in the USA., with mortality rates between 20 and 50%. Blood culture systems have reached such development, that further improvements will be difficult. Molecular methods offer the possibility of higher sensitivity in turnaround time, overcoming the inhibitory effect of the empirical therapy often instituted prior to sample collection. A commercial system for microbial extraction, amplification and detection by real time PCR - SeptiFast Test, (Roche) was tested. This system detects 25 species of bacteria and fungi directly from whole blood, in about 6 hours. Compared with evidence of infection, the test showed a sensitivity value similar to blood culture (67 and 68% respectively) and the same negative predictive value (88%), however for SeptiFast the NPV is limited to the 25 microorganisms contemplated in the test. The molecular system would benefit from an automated nucleic acid extraction method, being of utmost importance the criteria for patient selection in order to improve the cost-benefit relation. SeptiFast Test seems to be a complementary method to conventional assays, able to provide reliable information in turnaround time.

Most clinical bacterial isolates are quickly and accurately identified by conventional techniques used in the microbiology laboratory. However there are several situations in which molecular identification can significantly improve both the time to and accuracy of identification. An automatic sequencing method was implemented for bacterial identification - MicroSeq 500 Bacterial Identification Kit (Applied Biosystems). During one year, 54 isolates with ambiguous identification profiles by standard methods were studied. The sequence based identification results were compatible with clinical suspicion or with the results from an external quality control program - NEQAS. Sequence based identification became an important tool in the support of bacterial identification, particularly in gram positive bacilli, fastidious gram negative bacilli, anaerobic bacteria and viridans streptococci, microorganisms for which phenotypic methods are presented with greater challenges.

ÍNDICE

Índice	<i>i</i>
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	ix
1. Introdução	1
1.1 Infecções do sistema circulatório	3
1.1.1 Tipos de Bacterémia	3
1.1.2 Definições	4
1.1.3 Dados Estatísticos	6
1.1.4 Terapia Empírica	9
1.1.5 Etiologia	10
1.1.6 Diagnóstico Laboratorial	11
1.1.7 Número de culturas	12
1.1.8 Quando colher	12
1.1.9 Contaminações	13
1.1.10 Volume de amostra	14
1.1.11 Sistemas automáticos	14
1.1.11.1 Sistema BacT/ALERT 3D, bioMérieux	15
1.1.12 Exame directo - Gram	16
1.1.13 Hemocultura - Vantagens e limitações	17
1.1.14 Métodos Moleculares	19
1.1.14.1 PCR	19
1.1.14.2 PCR em Tempo Real	20
1.1.14.2.1 Plataformas de PCR em tempo real	21
1.1.14.2.2 Formatos de detecção em tempo real	22
1.1.14.2.2.1 Sondas TaqMan	23
1.1.14.2.2.2 Sondas de Hibridação - FRET	24
1.1.14.3 PCR Universal	26
1.1.14.3.1 Limitações	28
1.1.14.4 Sequenciação	29
1.1.14.4.1 Método de Sanger	29
1.1.14.4.2 Sequenciação cíclica automática	30
1.1.14.4.3 Progressos na sequenciação de DNA	32
1.1.14.4.4 <i>Cyclic Array Sequencing</i>	33
1.1.14.4.5 Sequenciação Bacteriana	35

1.1.15	Sequenciação do Gene 16S rRNA	37
2.	Objectivos	39
3.	Material e Métodos	43
3.1	LC SeptiFast Test (Roche)	45
3.1.1	Amostras	45
3.1.2	Hemoculturas	45
3.1.3	Estudo Molecular	46
3.1.3.1	Extracção e Purificação dos Ácidos Nucleicos	46
3.1.4	Amplificação dos Ácidos Nucleicos	47
3.1.4.1	Alvo	47
3.1.4.2	Amplificação	48
3.1.4.3	Detecção do produto amplificado	49
3.1.4.4	Identificação automática das espécies	49
3.2	Amplificação de 370bp do gene 16S rRNA	50
3.2.1	Amostras	50
3.2.2	Extracção e purificação dos Ácidos Nucleicos	50
3.2.3	Amplificação 16S rRNA por PCR em Tempo Real	51
3.2.4	Controlo de contaminações	53
3.3	Sequenciação bacteriana	54
3.3.1	Estirpes bacterianas	54
3.3.2	Extracção e purificação dos Ácidos Nucleicos	54
3.3.3	Amplificação e sequenciação com o sistema MicroSeq 500	55
3.3.4	Amplificação e sequenciação de 370pb do gene 16S rRNA	56
3.3.4.1	Amostras clínicas	56
3.3.4.2	Procedimento	57
3.3.5	Análise das sequências	57
4.	Resultados	59
4.1	SeptiFast Test	61
4.1.1	Comparação entre SeptiFast e Hemocultura	62
4.1.2	Resultados discordantes	64
4.1.2.1	SeptiFast Negativo – Hemocultura Positiva	64
4.1.2.2	SeptiFast Positivo – Hemocultura Negativa	66
4.1.3	Microrganismos detectados	69

4.1.4	Tempo de resposta laboratorial	70
4.2	Optimização da PCR em tempo real para amplificação de 370bp do gene 16S rRNA	71
4.3	Sequenciação Bacteriana MicroSeq 500 16S rRNA	74
4.4	Sequenciação bacteriana de 370bp do gene 16S rRNA	77
5.	<i>Discussão</i>	81
5.1	Detecção e identificação molecular a partir de amostras biológicas	83
5.1.1	SeptiFast Test	83
5.1.2	Detecção e sequenciação de 370bp do gene 16S rRNA	88
5.2	Identificação molecular de culturas bacterianas	90
6.	<i>Conclusões e perspectivas futuras</i>	93
7.	<i>Bibliografia</i>	97

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama de venn representando os critérios básicos para a definição de infecção. As áreas a tracejado representam os pacientes com infecção identificada, de acordo com os dados obtidos por Vincent et al., 2006, destacando-se o número de pacientes sujeitos a antibioterapia nos quais não foi detectado qualquer microrganismo (824). _____	7
Figura 2. Correlação entre a taxa de mortalidade em UCIs e a frequência de sépsis nos países europeus, destacando-se Portugal com 35%. Adaptado de (Vincent et al, 2006) _____	8
Figura 3. Sistema automático de monitorização contínua Bact/ALERT 3D, bioMérieux, COM a base da garrafa de hemocultura em pormenor, sendo visível o sensor. _____	15
Figura 4. Exame directo com coloração por Gram a partir do caldo da hemocultura positiva. Em cima cocos gram positivo; em baixo bacilos gram negativo. _____	16
Figura 5. Esquema representativo da reacção de polimerase em cadeia – PCR. a) Desnaturação b) Hibridação. c) Extensão das cadeias. d) Duplicação do número de cadeias de DNA. _____	19
Figura 6. Sistema óptico de excitação e detecção de fluorescência do LightCycler 2.0, Roche. _____	22
Figura 7. Princípio TaqMan® com libertação da molécula repórter durante a fase de extensão pela actividade exonuclease da DNA polimerase. _____	23
Figura 8. Princípio FRET em ensaio multiplex, com emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda. ____	24
Figura 9. Curvas de dissociação, com os respectivos picos correspondentes à temperatura de melting (T _m), específica para diferentes alvos. _____	25
Figura 10. Mapa de variabilidade bacteriana. Sequência do gene 16S rRNA de E. coli com locais de ligação de primers universais e regiões variáveis V1 a V9 sublinhadas a verde claro. Adaptado de (Baker et al, 2003) _____	26
Figura 11. a) Auto-radiografia de um gel de acrilamida da sequência de DNA do ϕ X174 como descrito por Sanger em 1977 (Sanger et al, 1977); b) esquema da sequenciação de Sanger, com leitura dos fragmentos de baixo para cima com a respectiva sequência à direita. _____	30
Figura 12. Esquema representativo da sequenciação cíclica automática. _____	31
Figura 13. Linha temporal da análise genómica em larga escala, sendo visível a vermelho o trabalho efectuado em organismos não vertebrados. (Lander et al, 2001). _____	32
Figura 14 _____	33
Figura 15. Representação do princípio de sequenciação cíclica em matriz, usado pelo sistema 454/Roche (a) e SOLiD™/Applied Biosystems (b) Adaptado de: (Hall, 2007) _____	34
Figura 16. Número de genomas bacterianos completamente sequenciados desde 1995, ano da sequenciação do genoma de Haemophilus influenzae e Mycoplasma genitalium. Adaptado de (Fournier et al, 2007). _____	35
Figura 17. Estratégias para a escolha de primers e sondas para PCR. Adaptado de (Fournier et al, 2007) _____	36
Figura 18. Arvore filogenética universal com base na comparação das sequências do gene 16s rRNA. Adaptado de (Clarridge, 2004). _____	38
Figura 19. Representação gráfica dos picos de dissociação do controlo interno para gram-positivos (a), gram-negativos (b) e fungos (c). _____	61

Figura 20. Antibioterapia instituída previamente à colheita, por serviço. _____	62
Figura 21. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Ch 640; Tm 57,8°C _____	63
Figura 22. <i>Aspergillus fumigatus</i> Ch610; Tm 58°C _____	64
Figura 23. Amostra 4 CH 670 Tm 50.7°C, pico azul, ligeiramente abaixo da linha de base. _____	65
Figura 24. Amostra 7, CH 670 Tm 57.5°C, pico cinzento, ligeiramente abaixo da linha de base. _____	66
Figura 25. Tipo de microrganismos detectados por hemocultura e SeptiFast _____	69
Figura 26. Microrganismos detectados por hemocultura e SeptiFast _____	69
Figura 27. Curvas de amplificação do DNA de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> diluídos seriadamente resultantes da aplicação dos protocolos inicial (a) e otimizado (b). _____	73
Figura 28. Bactérias identificadas por sequenciação agrupadas por categorias _____	76
Figura 29. Secção da sequência obtida a partir da amostra 9. De referir a sobreposição de picos que impossibilita a correcta interpretação, característica da presença de sequências mistas. _____	79
Figura 30. Exemplo das sequências obtidas por sequenciação dos 370bp do gene 16s rRNA, com resolução capaz de gerar uma boa interpretação _____	79

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1. Definições de sépsis. Adaptado a partir de (Mandell et al, 2004)</i>	5
<i>Tabela 2. Microrganismos comuns isolados a partir de hemoculturas. Adaptado de: (Forbes et al, 1998)</i>	11
<i>Tabela 3. Frequência de resultados falso-positivos por organismo habitualmente representativo de contaminação. Adaptado de: (Hall & Lyman, 2006)</i>	13
<i>Tabela 4. SeptiFast Master List (SML)</i>	47
<i>Tabela 5. Condições de termociclação SeptiFast Test Light Cyclor 2.0</i>	48
<i>Tabela 6. Estirpes bacterianas usadas no processo de otimização</i>	50
<i>Tabela 7. Primers e sonda TaqMan usados no PCR em tempo real para amplificação de 370bp do gene 16S rRNA.</i>	52
<i>Tabela 8. Programa de PCR em Tempo Real para amplificação de 370bp do gene 16S rRNA no SmartCycler, Cepheid.</i>	52
<i>Tabela 9. Condições de termociclação para amplificação com MicroSeq 500.</i>	55
<i>Tabela 10. Condições da reação de sequenciação cíclica MicroSeq 500</i>	56
<i>Tabela 11. Resultados obtido por SeptiFast comparados com a Hemocultura</i>	62
<i>Tabela 12. Resultados comparativos entre SeptiFast e Hemocultura por serviço</i>	63
<i>Tabela 13. Resultados negativos por SeptiFast com isolamento cultural (hemocultura positiva)</i>	65
<i>Tabela 14. Resultados discordantes: SeptiFast positivo – Hemocultura negativa</i>	67
<i>Tabela 15. Resultados obtidos por SeptiFast relativamente à infecção confirmada</i>	68
<i>Tabela 16. Comparação dos dois métodos relativamente à confirmação da infecção</i>	68
<i>Tabela 17. Infecções mistas detectadas por SeptiFast e Hemocultura</i>	70
<i>Tabela 18. Resultados comparativos entre diferentes enzimas obtidos na PCR em tempo real</i>	71
<i>Tabela 19. Comparação entre volumes de DNA</i>	72
<i>Tabela 20. Resultados comparativos entre o protocolo inicial e o protocolo otimizado, aplicados a diluições seriadas de DNA de S. aureus e E. coli.</i>	73
<i>Tabela 21. Resultados da sequenciação usando MicroSeq 500</i>	75
<i>Tabela 22. Comparação entre sequenciação com MicroSeq 500 e 370bp 16S rRNA</i>	77
<i>Tabela 23. Comparação entre a identificação fenotípica e a sequenciação de 370bp do gene 16S rRNA</i>	78

Abreviaturas

DNA - Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

pb – pares de bases

UCI – Unidades de Cuidados Intensivos

UCIP – Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente

SU – Serviço de Urgência

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

PCR – Reacção de Polimerase em Cadeia

FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer

T_m – Temperatura de melting ou dissociação

LCR – Líquido cefalorraquidiano

E. coli – *Escherichia coli*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

CI – Controlo Interno

UV – Ultravioleta

VPP – Valor Preditivo Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

ATCC – American Type Culture Collection

SIS – Septi*Fast* Identification Software

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções do sistema circulatório

A presença de microrganismos na corrente sanguínea constitui um risco para todos os órgãos do corpo humano (Forbes et al, 1998). As suas consequências imediatas podem passar pelo choque séptico, falência multi-orgânica, coagulação intravascular disseminada e morte. Anualmente ocorrem nos Estados Unidos cerca de 200 000 casos de bacterémia e fungémia, com taxas de mortalidade associadas entre os 20 e 50 % (Forbes et al, 1998). Assim, a propagação de microrganismos no sistema circulatório constitui uma situação clínica da maior gravidade, sendo a sua detecção atempada, bem como a identificação do agente microbiano responsável, uma das mais importantes tarefas do laboratório de microbiologia clínica.

1.1.1 Tipos de Bacterémia

Existem três tipos de bacterémia: contínua, intermitente e transitória. A bacterémia transitória pode ocorrer espontaneamente, ou como efeito de procedimentos normais, como lavar os dentes ou mastigar comida, ou ter origem na manipulação de tecidos infectados ou cirurgias que envolvem locais não estéreis. Nestes casos pode ocorrer bacterémia significativa. Nos casos de disseminação transitória a partir de um local isolado como um abscesso, a libertação bacteriana para o sangue ocorre cerca de 45 minutos antes de um pico febril (Forbes et al, 1998).

No choque séptico, endocardite bacteriana e outras infecções endovasculares, os organismos são libertados na corrente sanguínea a um ritmo constante – bacterémia contínua. O mesmo acontece nos estádios iniciais de algumas infecções específicas, como a febre tifóide, brucelose e leptospirose.

Na maioria das restantes infecções, as bactérias podem estar presentes de forma intermitente em circulação. Como exemplo pode referir-se que os agentes causais de meningite, pneumonia, artrite piogénica e osteomielite são muitas vezes recuperados no sangue durante a fase inicial destas patologias.

As infecções da corrente sanguínea podem ser intravasculares – com origem no sistema cardiovascular, ou extravasculares – resultam da entrada de organismos no sistema sanguíneo através do sistema linfático, a partir de um outro local de infecção. Alguns factores potenciam o início da infecção no sistema sanguíneo. Por um lado a terapia imunossupressora, o uso generalizado de antibióticos de largo espectro que promovem uma alteração da flora normal do hospedeiro, permitindo a emergência de infecções por bactérias multi-resistentes, os procedimentos invasivos como cirurgias extensas e por outro lado a sobrevivência prolongada de pacientes debilitados e em estado crítico.

Os casos clinicamente mais significativos de bacterémia têm origem em infecções extravasculares, sendo as portas de entrada mais comuns o tracto genito-urinário (25%), o tracto respiratório (20%), abscessos (10%), feridas cirúrgicas infectadas (5%), tracto biliar (5%), não sendo possível determinar esta origem em 25% dos casos (Forbes et al, 1998).

Apesar do termo “bacterémia” ser usado para designar a presença de bactérias no sangue, este é muitas vezes usado indevidamente, em situações de presença quer de fungos, quer de vírus na corrente sanguínea. Associadas a estas situações existe uma terminologia variada, que por vezes pode originar confusão.

1.1.2 Definições

Em 1992 uma conferência consenso estabeleceu parâmetros para normalizar a terminologia até então variada, definindo sépsis como uma síndrome sistémica de resposta inflamatória à infecção presumida ou confirmada (Bone et al, 1992; O'Brien et al, 2007). Esta síndrome pode ser considerado como uma conjugação de sinais e sintomas que traduzem a resposta do hospedeiro à infecção (Vincent & Abraham, 2006).

De acordo com o American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, a *infecção*, definida pela presença de organismos patogénicos num local habitualmente estéril (sangue, abscesso, líquido cefalorraquidiano ou líquido ascítico), pode apresentar sintomatologia, mas pode também ser inaparente ou subclínica. A

bacterémia é, provavelmente, um fenómeno transitório para qualquer infecção bacteriana, excepto na endocardite ou infecção intravascular grave (Bone et al, 1992).

Tabela 1. Definições de sépsis. Adaptado a partir de: (Mandell et al, 2004)

Designação	Definição
Infecção	Presença de organismos em local habitualmente estéril, normalmente, mas não necessariamente, acompanhado de resposta inflamatória
Bacterémia	Presença de bactérias no sangue, com confirmação laboratorial, podendo ser transitória.
Septicémia	O mesmo que bacterémia, implicando maior gravidade.
Sépsis	Evidência clínica de infecção (suspeita ou confirmada), com síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS).
Síndrome séptica	Sépsis com evidência de perfusão orgânica alterada.
Sépsis grave	Sépsis associada a disfunção orgânica, hipo perfusão ou hipotensão.
Choque séptico	Sépsis com hipotensão e perfusão anormal.
SIRS	Resposta a uma variedade de agressões clínicas, podendo ter origem infecciosa, como no caso da sépsis, mas podendo ser de etiologia não infecciosa (ex. queimadura, pancreatite).

Septicémia é um termo tradicionalmente usado indiscriminadamente para designar *bacterémia*, mas ao qual está associado um maior nível de gravidade. É ainda frequente o uso da designação *sépsis* para indicar a presença de infecção, mas sem especificar a existência de hemoculturas positivas. Assim, *sépsis* designa uma situação clínica onde há evidência de infecção com resposta sistémica, manifestada através de um conjunto de sinais clínicos. Esta síndrome ocorre como resultado da libertação de citocinas e outros mediadores como resposta a um processo infeccioso. Sendo originalmente um meio de

defesa do hospedeiro contra um organismo invasor, a resposta séptica pode-se tornar rapidamente prejudicial, danificando órgãos (Vincent & Abraham, 2006).

O grau de gravidade vai aumentando quando se fala de *síndrome séptica* (perfusão orgânica evidente com hipoxemia, aumento da concentração de lactatos ou oligúria. Estas situações implicam algum grau de disfunção orgânica. A *sépsis grave* apresenta claramente comprometimento orgânico agudo e pensa-se que seja a maior causa de mortes em unidades não coronárias, com cerca de 150 000 casos anuais em países da União Europeia (Vincent & Abraham, 2006).

A pressão sanguínea é uma variável flutuante, podendo apresentar alterações num paciente ao longo de um período de algumas horas. Sendo a hipotensão normalmente corrigida através do equilíbrio de fluidos, o termo *choque séptico* deve ser reservado para os pacientes com síndrome séptica e hipotensão não reversível através da reposição de fluidos (Mandell et al, 2004).

A síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS) representa a categoria mais abrangente, incluindo uma grande variedade de situações clínicas, essencialmente de natureza infecciosa, tal como síndrome séptica, mas compreendendo também origens não infecciosas tais como a queimadura ou pancreatite, situações onde a febre e a hipo perfusão orgânica estão presentes (Mandell et al, 2004). Estas definições encontram-se sistematizadas na tabela 1.

1.1.3 Dados Estatísticos

Recentemente vários estudos permitiram reunir dados epidemiológicos importantes sobre a frequência, factores associados e custos da sépsis. Assim estima-se que ocorram anualmente 751 000 casos de sépsis grave nos Estados Unidos com uma taxa de mortalidade de 28.6% com custos médios de 22.100\$ (Angus et al, 2001). Um estudo identificou 10.319.418 casos de sépsis em 750 milhões de hospitalizações durante um período de 22 anos, com um aumento de frequência de 82.7 casos por 100 000 habitantes em 1979 para 204.4 casos por 100 000 habitantes em 2000 (Martin et al,

2003). Outro estudo que compreendeu o Canadá e seis países europeus, incluiu 14.364 pacientes com mais de 4500 episódios infecciosos documentados, e taxas de mortalidade associadas de 16.9% para pacientes sem infecção e 53.6% para pacientes que apresentavam infecções repetidas em Unidades de Cuidados Intensivos (Alberti et al, 2002). Em 2006 foram publicados os resultados de um estudo pan-europeu, designado SOAP – Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (Vincent et al, 2006).

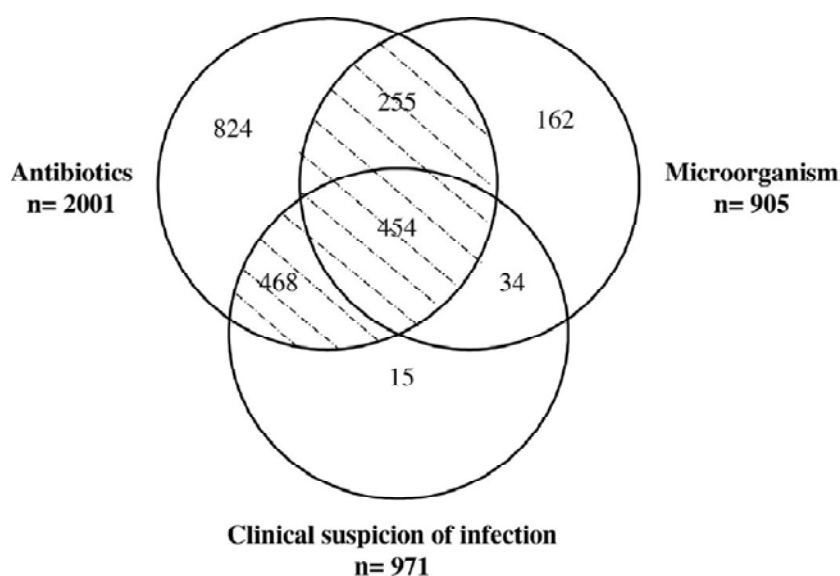


Figura 1. Diagrama de *venn* representando os critérios básicos para a definição de infecção. As áreas a tracejado representam os pacientes com infecção identificada, de acordo com os dados obtidos por Vincent *et al.*, 2006, destacando-se o número de pacientes sujeitos a antibioterapia nos quais não foi detectado qualquer microrganismo (824).

Foram estudados 3147 pacientes, com estadia média na UCI de 3 dias. Durante este tempo foi administrada antibioterapia em 64% dos casos. Dos 971 pacientes com sinais clínicos de infecção, estabeleceu-se o diagnóstico etiológico em 454 (38.6%) o que não ocorreu em 468 casos (39.8%). Em 255 pacientes (21.7%) foram isolados microrganismos, mas não existia evidência de infecção clínica (Figura 1), não sendo observada diferença na taxa de mortalidade entre estes três grupos.

Neste estudo são ainda de assinalar as diferenças consideráveis entre as taxas de sépsis – 18% na Suíça e 73% em Portugal - e sépsis grave – de 10% na Suíça a 64% em Portugal. As taxas de mortalidade em UCI variaram entre 8% na Suíça a 35% em

Portugal, que se reflectiu enquanto taxa de mortalidade a nível hospitalar com variações entre os 14% na Suíça e os 41% em Portugal. As taxas de mortalidade associadas à sépsis em UCIs nos vários países da Europa estão assinaladas na figura 2, destacando-se Portugal com 35% de mortalidade, como já referido. É de assinalar ainda que, de acordo com este estudo, Portugal ocupa posição destacada face aos restantes países da Europa nos vários parâmetros avaliados. A taxa de mortalidade em UCI nos casos de sépsis foi de 27%, nos casos de sépsis grave foi de 32.2%, subindo para 54,1% nos diagnósticos de choque séptico (Vincent et al, 2006).

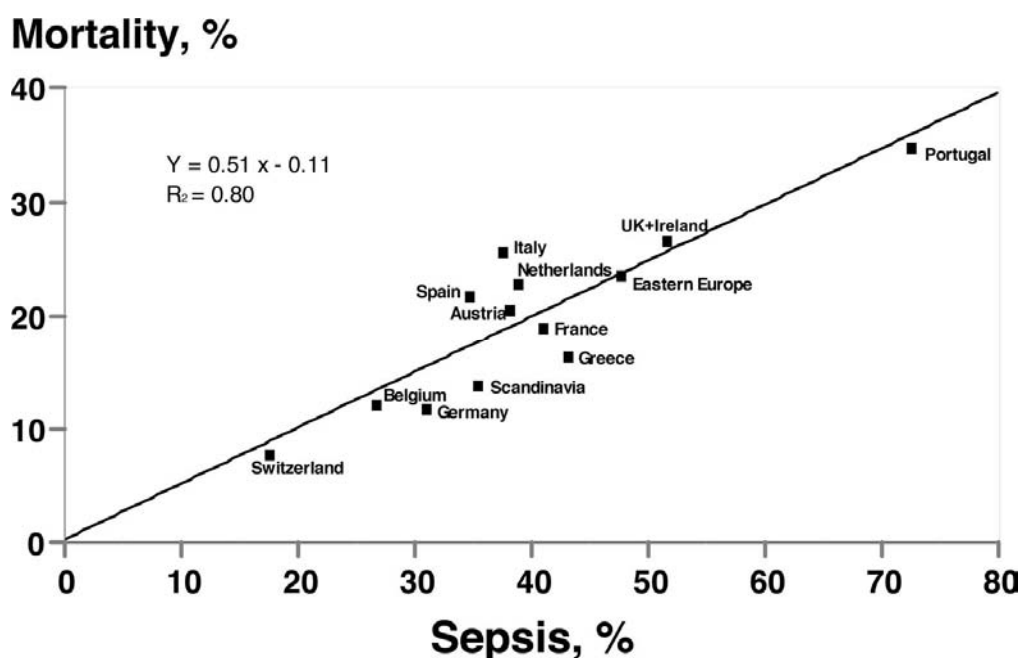


Figura 2. Correlação entre a taxa de mortalidade em UCIs e a frequência de sépsis nos países europeus, destacando-se Portugal com 35%. Adaptado de (Vincent et al, 2006)

De acordo com o National Vital Statistics Reports, a septicémia é a décima causa de morte nos Estados Unidos, estando associada a um aumento das taxas de hospitalização, bem como aumento do tempo médio de internamentos e consequente aumento de custos (Beekmann et al, 2003).

1.1.4 Terapia Empírica

Uma grande parte das prescrições antibióticas é efectuada de forma empírica, ou seja, a antibioterapia é iniciada sem se conhecer o microrganismo responsável pela infecção, muitas vezes sem se conhecer o foco infeccioso e mesmo sem a certeza da existência de infecção. Assim, não surpreende que, em avaliação retrospectiva, muitos dos doentes que receberam terapêutica antimicrobiana nunca venham a apresentar critérios de infecção documentada ou até provável e que 25 a 50% das antibioterapias empíricas se venham a revelar incorrectas (Harbarth et al, 2003; Llewelyn & Cohen, 2007; Mandell et al, 2004). O empirismo da terapêutica leva a que as terapêuticas escolhidas sejam habitualmente de largo espectro, o que vai promover uma alteração da flora bacteriana normal do hospedeiro, predispondo-o à colonização por microrganismos hospitalares (Brook, 1999).

Considerando os dados estatísticos e sabendo que a sépsis pode progredir rapidamente para sépsis grave e choque séptico, existem indicações da Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock (Dellinger et al, 2008), que recomendam o início da antibioterapia intravenosa de largo espectro, tão cedo quanto possível e sempre na primeira hora do reconhecimento de sépsis grave ou choque séptico. A perspectiva da *golden hour* e *silver day*, tradicionalmente aplicada aos pacientes traumáticos, foi adoptada para o tratamento da sépsis grave e choque séptico, sendo de primordial importância a intervenção na primeira hora de suspeita clínica e nas restantes horas do primeiro dia (Dellinger et al, 2008; Rivers et al, 2005). É ainda recomendada a reavaliação desta terapia diariamente para otimizar a eficiência da mesma e prevenir a resistência, evitar a toxicidade e minimizar custos. É também recomendada a terapia empírica combinada para doentes neutropénicos ou em caso de infecção por *Pseudomonas* spp, não mais do que 3 a 5 dias, com redução após testes de susceptibilidade. A duração da terapia empírica não deve exceder os 10 dias, devendo ser interrompida se for detectada uma origem não infecciosa (Dellinger et al, 2008).

Por outro lado, numa era de uso generalizado de antibióticos, mesmo fora do ambiente hospitalar, muitas vezes quando um paciente é internado já está sob o efeito desta medicação (Mandell et al, 2004).

Assim, a existência de resultados culturais negativos em doentes com evidência clínica de infecção bacteriana ou fúngica é muito comum em Unidades de Cuidados Intensivos, com dados estimados superiores a 50% dos casos de sépsis grave ou choque séptico.

A justificação para definir sépsis mesmo na ausência de bacterémia baseia-se em estudos prospectivos que validaram o risco de progressão e aumento de mortalidade com SIRS, sépsis, sépsis grave e choque séptico. Estas designações, podendo parecer confusas, representam situações clínicas comuns que alertam para a necessidade de medidas de diagnóstico e normalmente desencadeiam o início da terapia antimicrobiana (Mandell et al, 2004).

O estudo SOAP revelou que 64% dos doentes estudados estavam sob efeito de antibioterapia, sendo o consumo de antibióticos cerca de 10 vezes superior em UCIs quando comparado com as restantes enfermarias hospitalares (Shafazand & Weinacker, 2002).

Num estudo muito recente, Garnacho-Montero e colaboradores observaram que a taxa de infecção nosocomial em UCI era significativamente superior em pacientes com terapia empírica inadequada, estando associada a maiores taxas de mortalidade e aumento do tempo de hospitalização (Garnacho-Montero et al, 2008).

1.1.5 Etiologia

A epidemiologia microbiana da sépsis está em constante evolução, sendo possível observar diferenças de acordo com a localização geográfica. Durante os anos 80 houve uma alteração generalizada nos organismos responsáveis por sépsis, de bactérias gram-negativo para gram-positivo, e desde os anos 90 estas últimas têm sido as maiores responsáveis por esta infecção. Uma outra alteração significativa, particularmente na América do Norte, foi a emergência de fungos na etiologia da sépsis. Num estudo recente (SOAP) que envolveu vários países da Europa, as bactérias gram-positivo foram responsáveis por 40% dos casos, 38% com etiologia em gram-negativo, os fungos foram responsáveis por 17% dos casos e observaram-se infecções mistas em 18% dos casos (Vincent et al, 2006).

A etiologia da sépsis apenas é documentada em cerca de 60% dos casos (Llewelyn & Cohen, 2007). Isto pode ser explicado pela terapia empírica prévia à colheita de amostras e pouca sensibilidade dos métodos de diagnóstico instituídos. Os organismos mais comumente isolados a partir de hemoculturas estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Microrganismos comuns isolados a partir de hemoculturas. Adaptado de: (Forbes et al, 1998)

Microrganismos
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus</i> grupo Viridans
<i>Enterococcus</i> spp
<i>Streptococcus</i> β -hemolyticus
<i>Escherichia</i> spp
<i>Klebsiella</i> spp
<i>Pseudomonas</i> spp
<i>Enterobacter</i> spp
<i>Proteus</i> spp
<i>Candida</i> spp
Bacterias anaeróbias – <i>Bacteroides</i> e <i>Clostridium</i> spp

A etiologia microbiana da sépsis apresenta variações de acordo com o foco anatómico da infecção subjacente (Forbes et al, 1998).

1.1.6 Diagnóstico Laboratorial

A presença de bactérias em circulação foi reconhecida pela primeira vez há mais de um século por E. Libman, que em 1906 publicou um estudo com mais de 700 culturas de sangue indicando normas para a sua execução (Peters et al, 2004). Desde então os métodos para detecção de infecções do sangue evoluíram, com o desenvolvimento de protocolos estandardizados para a colheita de amostra,

aperfeiçoamento dos meios de cultura e a introdução de sistemas automáticos para a detecção de crescimento bacteriano e fúngico.

1.1.7 Número de culturas

Em adultos está recomendada a colheita de duas hemoculturas por episódio séptico, uma vez que mais de 95% dos episódios de bacterémia e fungémia são detectados quando é efectuada a colheita de duas ou três hemoculturas (Reimer et al, 1997). Por outro lado, este procedimento ajuda na distinção entre microrganismos patogénicos e contaminantes, uma vez que a proporção de hemoculturas positivas é crucial na interpretação dos resultados. O estudo de mais de três hemoculturas por episódio séptico não ajuda nesta interpretação e por outro lado aumenta os custos e o trabalho laboratorial, podendo contribuir para a anemia nosocomial induzida pela flebotomia (Chandrasekar & Brown, 1994).

1.1.8 Quando colher

As bactérias podem rapidamente deixar de ser detectadas em circulação. Considerando que um pico febril surge 30 a 90 minutos após um episódio de bacterémia, haverá uma maior probabilidade de recuperar microrganismos se a colheita for efectuada tão próximo quanto possível do pico febril.

A Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock recomendam a colheita antes do início da antibioterapia, desde que isto não atrase a administração da terapia (Dellinger et al, 2008).

1.1.9 Contaminações

Um resultado de hemocultura positivo pode estabelecer um diagnóstico, permitir a adequação da terapia antimicrobiana e fornecer um valor prognóstico. No entanto os resultados falso-positivos podem constituir uma limitação. Estes resultados, na hemocultura, estão normalmente associados a contaminações, que ocorrem quando existe recuperação em cultura de organismos que não estão efectivamente presentes no sangue colhido. Estes resultados representam um dilema, sendo necessário esclarecer se um organismo é responsável por uma infecção clinicamente significativa, com elevado risco de mortalidade e morbidade, ou não tem qualquer significado clínico (Hall & Lyman, 2006). As taxas de contaminação variam entre os 2 e os 6% (Souvenir et al, 1998) e os organismos normalmente associados a contaminações estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Frequência de resultados falso-positivos por organismo habitualmente representativo de contaminação. Adaptado de: (Hall & Lyman, 2006)

Organisms	1,585 blood culture-positive episodes from 3 U.S. hospitals		497,134 blood cultures from 640 U.S. institutions	
	% of all positive cultures	Contamination rate (%)	% of all positive cultures	Contamination rate (%)
	Coagulase-negative staphylococci	44.3	82	Not reported
<i>Corynebacterium</i> spp.	33.4	96	Not reported	68-78
<i>Bacillus</i> spp.	0.8	91.7	Not reported	68-70
<i>Propionibacterium acnes</i>	3.0	100	Not reported	84-85
Viridans group streptococci	4.5	49.3	Not reported	32-33
<i>Clostridium perfringens</i>	0.8	76.9	Not reported	Not reported

Um cuidado essencial durante a colheita prende-se com a necessidade de assepsia durante a venopunção para impedir a contaminação com a flora normal da pele do paciente (Hall & Lyman, 2006; Reimer et al, 1997).

1.1.10 Volume de amostra

O volume de sangue é possivelmente a variável mais importante no sucesso da recuperação de microrganismos, principalmente em pacientes adultos, uma vez que nesta população o número de microrganismos presentes no sangue é em regra inferior a 10 UFC/ml e muitas vezes inferior a 1 UFC/ml. Nos adultos, cada mililitro adicional de sangue estudado aumenta a recuperação microbiana até 3%. Na população pediátrica o número de microrganismos presentes por mililitro de sangue é por norma superior a 100 UFC/ml, e muitas vezes excede as 1000 UFC/ml (Reimer et al, 1997). No entanto, aumentar o volume de sangue estudado, aumenta também a taxa de recuperação microbiana (Bouza et al, 2007; Washington, 1975).

1.1.11 Sistemas automáticos

Nos últimos anos foram desenvolvidos e comercializados diversos sistemas para o estudo microbiológico das hemoculturas. O avanço mais importante deu-se com os sistemas de monitorização contínua (Reimer et al, 1997). Estes sistemas monitorizam continuamente a evidência de crescimento microbiano, normalmente a cada 10 minutos. Os dados captados são processados e analisados informaticamente. Uma vez que são efectuadas diversas leituras por dia a cada hemocultura, existe informação suficiente para usar algoritmos sofisticados que determinam a ocorrência de crescimento microbiano. Estes algoritmos permitem a detecção mais rápida de crescimento, cerca de 1 a 1.5 dias mais cedo do que com os sistemas de monitorização não contínua (Beekmann et al, 2003), e pensa-se também contribuírem para a minimização de sinais falso-positivos gerados por estes aparelhos. Estes equipamentos incorporam sistemas de detecção, incubadoras e mecanismos de agitação numa única unidade. Estes sistemas permitem ainda a colheita até 10 ml de sangue por hemocultura (Reimer et al, 1997). Num estudo recente, Bouza e colaboradores mostraram que apesar dos avanços tecnológicos, o volume de sangue estudado deve reflectir um equilíbrio entre o necessário para o diagnóstico microbiológico e o risco de desenvolvimento de anemia

nosocomial, tendo sempre em conta que, de acordo com o postulado por Washington em 1975, quanto maior o volume de amostra estudado, maior será a taxa de detecção microbiana (Bouza et al, 2007).

1.1.11.1 Sistema *BacT/ALERT 3D*, bioMérieux

Um dos sistemas de monitorização contínua largamente usados é o sistema BacT/ALERT 3D (bioMérieux) (Capoor et al, 2006; Jamal et al, 2006; Mirrett et al, 2007). Na base de cada garrafa de hemocultura existe um sensor que muda de cor quando a concentração de CO₂ no meio aumenta (Figura 3). São incorporados díodos emissores e sensores de luz, cujos sinais são analisados por um algoritmo. Este algoritmo reconhece três critérios para evidenciar crescimento microbiano – uma leitura inicial que excede uma linha de base pré-definida, um aumento linear da concentração de CO₂ e um aumento na taxa de produção de CO₂ (Reimer et al, 1997).



Figura 3. Sistema automático de monitorização contínua BacT/ALERT 3D, bioMérieux, COM a base da garrafa de hemocultura em pormenor, sendo visível o sensor.

Estes sistemas permitiram estabelecer ciclos de 5 dias de incubação para as hemoculturas, sem perda relevante de recuperação de microrganismos, mas com redução significativa do número de contaminantes (Wilson et al, 1993). Está também descrito que não é necessária a subcultura das amostras negativas ao fim dos 5 dias de

incubação (Hardy et al, 1992), sendo no entanto possível aumentar o ciclo de incubação sempre que exista suspeita da presença de microrganismos de crescimento lento.

1.1.12 Exame directo - Gram

Sempre que detectado um sinal positivo, é efectuada uma subcultura a partir do caldo de hemocultura, bem como um esfregaço da hemocultura, sendo este corado pelo método de gram (Figura 4). A informação obtida a partir deste exame microscópico será a primeira informação laboratorial a disponibilizar ao clínico de forma a orientar a terapia. Estima-se que cerca de 40% dos pacientes com bacterémia esteja a receber tratamento antimicrobiano inadequado à altura da primeira notificação do resultado do gram (Sogaard et al, 2007). Beekmann e colaboradores observaram uma correlação significativa entre o tempo de notificação e o tempo de hospitalização por paciente com bacterémia (Beekmann et al, 2003).

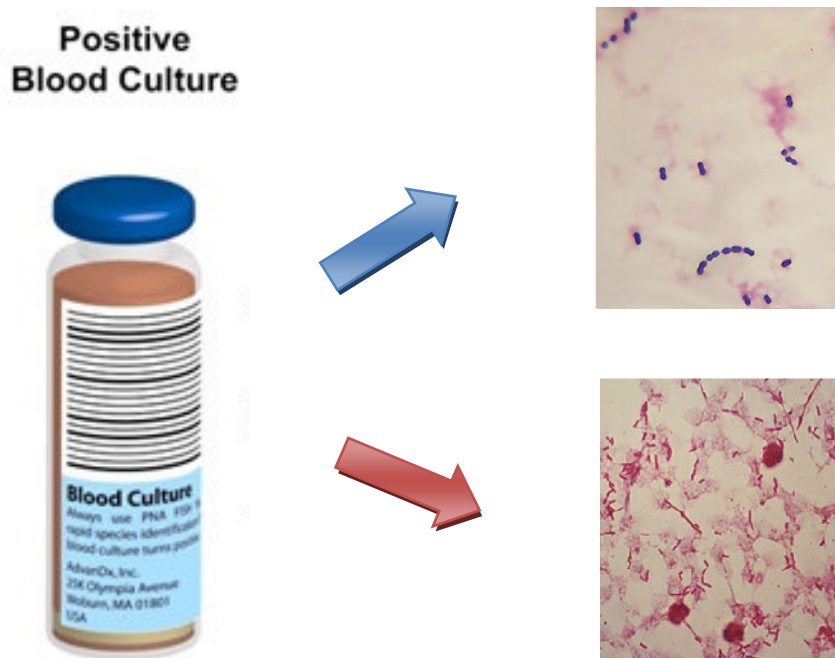


Figura 4. Exame directo com coloração por Gram a partir do caldo da hemocultura positiva. Em cima cocos gram positivo; em baixo bacilos gram negativo.

1.1.13 Hemocultura - Vantagens e limitações

A detecção de bactérias no sangue desempenha um papel importante no diagnóstico de doentes com febre, estabelecendo a presença de infecção (e excluindo a origem não infecciosa), confirmando a terapia empírica instituída, possibilitando o ajuste da antibioterapia após testes de susceptibilidade aos antimicrobianos a partir dos isolados clínicos. A hemocultura continua a ser o método de referência e tem um elevado valor diagnóstico, principalmente quando o diagnóstico microbiológico é mais problemático, como no caso de endocardite, infecções do tracto biliar, endovascular ou de enxertos, bem como em infecções de locas profundas que de outra forma necessitariam de procedimentos invasivos para a colheita de amostra (Peters et al, 2004).

A hemocultura constitui ainda uma ferramenta epidemiológica essencial, que estabelece a base da terapia empírica (Llewelyn & Cohen, 2007). O conhecimento actualizado dos organismos responsáveis por infecções do sistema circulatório mais frequentemente encontrados em enfermarias específicas como as UCIs e serviços de Hematologia, bem como os perfis de susceptibilidade associados, orientam os clínicos no tratamento inicial de um paciente com febre (Sogaard et al, 2007).

No entanto a utilidade da hemocultura enquanto teste de diagnóstico com repercussão clínica imediata está limitada a algumas patologias pela probabilidade a-priori de detectar determinados patogéneos, pela demora de resultados, pouca sensibilidade para organismos fastidiosos e pela administração de antibioterapia antes da colheita de amostras (Peters et al, 2004). Nestes casos, muitas vezes o estudo das hemoculturas não se apresenta vantajoso numa análise custo-benefício.

Munson e colaboradores avaliaram a associação entre a notificação de hemoculturas positivas e o tratamento antimicrobiano dos pacientes, tendo observado que a maioria das intervenções terapêuticas ocorre principalmente nas primeiras quatro horas após a colheita. Neste período de tempo a terapêutica havia sido iniciada em mais de 50% dos casos e descontinuada em 30% dos casos (Munson et al, 2003). Estes autores descreveram que o efeito da notificação do resultado do exame de Gram na terapêutica era bastante superior ao efeito do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Mas estas duas notificações em conjunto levavam a menos alterações terapêuticas do que as

instituídas imediatamente após a colheita. Sogaard e colaboradores referem valores de 30 a 45 % de alterações à terapia empírica após a primeira notificação (Sogaard et al, 2007). Estes dados corroboram a ideia de que a grande maioria das alterações nos tratamentos antimicrobianos ocorre de acordo com a resposta clínica do paciente ao tratamento (Campbell et al, 2003; Ehrenstein et al, 2005; Levin et al, 1997). Por outro lado, no caso de suspeita de infecção por organismos de crescimento lento como *Mycobacterium tuberculosis*, a terapia empírica é iniciada muito antes dos resultados laboratoriais e, se necessário, alterada com base em sinais clínicos (Peters et al, 2004). O mesmo acontece na suspeita de organismos fastidiosos como *Bartonella* spp, *Coxiella burnetii* ou *Tropheryma whipplei* bem como para infecções por fungos invasivos (Fenollar & Raoult, 2007; Socan et al, 1999; Zeaiter et al, 2003).

Uma grande limitação da hemocultura prende-se com a acentuada diminuição de sensibilidade quando a colheita é efectuada após a antibioterapia (Glerant et al, 1999; McKenzie & Reimer, 1987). Esta situação ocorre frequentemente em pacientes neutropénicos com antibioterapia profiláctica, que apesar de apresentarem sinais clínicos de infecção, apresentam sistematicamente hemoculturas negativas (Serody et al, 2000), mesmo com agravamento do seu estado clínico (Neu, 1986).

Os métodos actuais atingiram um nível considerável de desenvolvimento, com volumes de amostra excelentes e tempos de detecção de crescimento microbiano que dificilmente poderão melhorar. A hemocultura continua a ser um meio de extrema utilidade, quer para o diagnóstico, quer para a confirmação da suspeita clínica. No entanto o avanço científico e tecnológico permite encarar outras metodologias que poderão melhorar a detecção de microrganismos no sangue. Novos avanços deverão ter por meta uma melhor sensibilidade, tempo de resposta e redução do efeito inibitório da antibioterapia. Detectar o agente etiológico de uma infecção mais precocemente permite a implementação de terapia antimicrobiana dirigida, reduzindo a morbilidade e mortalidade associadas (Peters et al, 2004).

1.1.14 Métodos Moleculares

1.1.14.1 PCR

A reacção de polimerase em cadeia (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis nos anos 80, permitindo amplificar mais de mil milhões de vezes regiões específicas de DNA (Kubista et al, 2006). O princípio subjacente à técnica é extremamente simples: um segmento de DNA alvo de tamanho delimitado por dois primers oligonucleotídicos específicos é amplificado pela acção de uma DNA polimerase termo-estável.

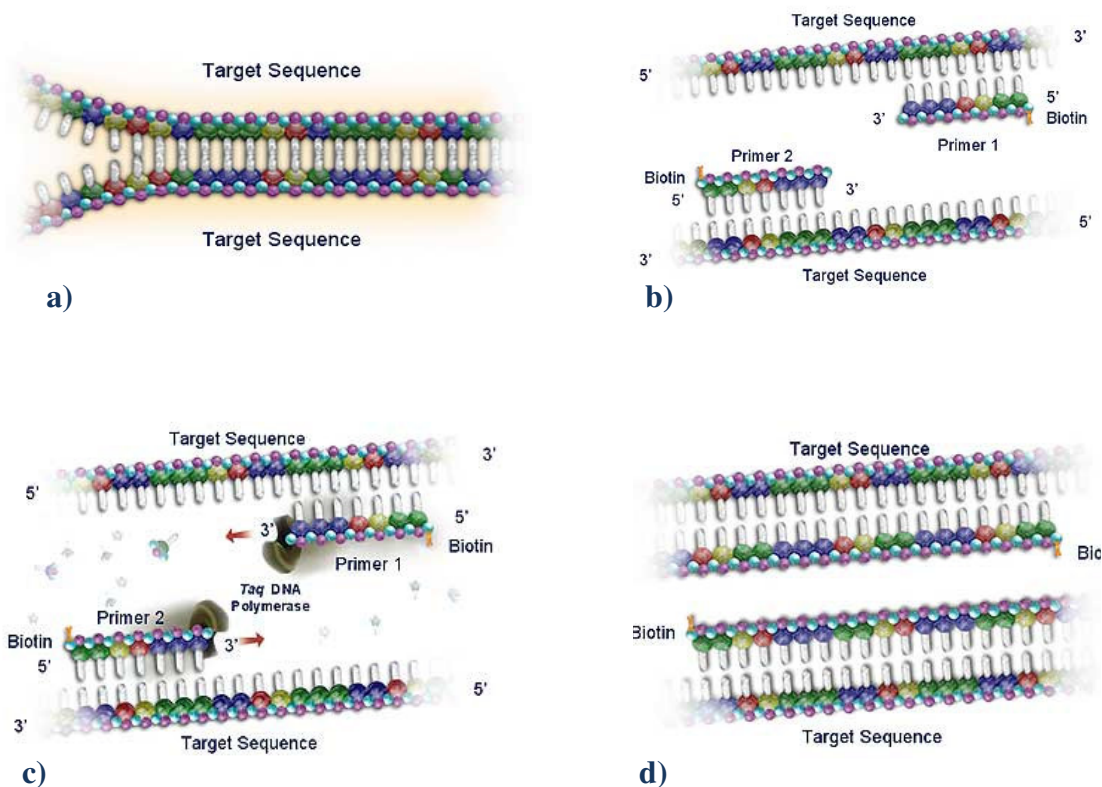


Figura 5. Esquema representativo da reacção de polimerase em cadeia – PCR. a) Desnaturação b) Hibridação. c) Extensão das cadeias. d) Duplicação do número de cadeias de DNA.

A reacção de amplificação ocorre em ciclos sucessivos, cada ciclo envolvendo um passo de desnaturação do DNA alvo, por aquecimento a 92-95°C (Figura 5.a); um passo de hibridação dos *primers* com as sequências complementares do DNA alvo a temperatura

entre 50-60°C (figura 5.b) e um passo final de extensão enzimática dos *primers*, entre 68-72°C, em que a DNA polimerase promove a síntese das sequências compreendidas entre os dois *primers* (Figura 5.c). Os produtos resultantes da extensão dos *primers* a cada ciclo podem ser utilizados como alvo de amplificação no ciclo seguinte. Teoricamente o número de cópias do segmento de DNA delimitado pelos *primers*, duplica a cada ciclo de amplificação (Figura 5.d). Assim, 30 ciclos de PCR originam uma amplificação de cerca de 10^9 vezes (Taveira, 2000).

1.1.14.2 *PCR em Tempo Real*

Em microbiologia clínica os testes de diagnóstico laboratorial baseados na amplificação por PCR têm sido usados desde os anos 90, principalmente na identificação de microrganismos de crescimento lento ou na detecção de organismos incapazes de crescer em cultura, situações específicas em que os métodos moleculares oferecem uma alternativa clara e inequívoca aos métodos tradicionais.

A primeira demonstração de PCR em tempo real foi conseguida por equipas da Roche Molecular Systems e Chiron, liderados por Higuchi, que efectuaram uma reacção de PCR sob luz ultravioleta, à qual havia sido adicionada uma molécula fluorescente – Brometo de Etídio. Sabendo-se que a fluorescência do brometo de etídio aumenta quando este se liga aos ácidos nucleicos, foi possível observar a acumulação de DNA com uma câmara de vídeo (Valasek & Repa, 2005).

O desenvolvimento da PCR em tempo real veio revolucionar o diagnóstico laboratorial em microbiologia clínica (Espy et al, 2006). Este método difere da PCR convencional, principalmente no que diz respeito à detecção do produto amplificado. Tradicionalmente esta fase é posterior à reacção de PCR, implicando tempos de resposta mais longos, e no caso de ser efectuada por electroforese em gel de agarose, com alguma perda de especificidade (Smith et al, 2004). Na PCR em tempo real a detecção é efectuada concomitantemente com a amplificação, limitando o processo a um tubo fechado, o que elimina os riscos de contaminação inerentes à manipulação pós PCR (Corless et al, 2000; Yamamoto, 2002). As plataformas de PCR em tempo real disponíveis no mercado permitem níveis de sensibilidade e especificidade equivalentes

ou mesmo superiores aos sistemas tradicionais, sendo mais simples de operar e requerendo menos trabalho manual técnico. A metodologia “*fast cycling*” permite obter uma identificação de um agente etiológico em tempo clinicamente útil.

A combinação da excelente sensibilidade e especificidade, menor risco de contaminação, facilidade de operação e rapidez, estabeleceu a PCR em tempo real como uma alternativa aos testes culturais tradicionais e imunoenaios utilizados em microbiologia clínica no diagnóstico de várias doenças infecciosas (Espy et al, 2006).

1.1.14.2.1 PLATAFORMAS DE PCR EM TEMPO REAL

Actualmente existem diversos instrumentos de PCR em tempo real disponíveis comercialmente. Estes variam no método de controlo de temperatura, no formato de detecção do produto amplificado, tempo de resposta analítica e no número de amostras que podem ser testadas em cada ensaio (Cockerill, 2003). Em alguns casos existem sistemas automáticos de extracção de ácidos nucleicos que complementam os equipamentos de detecção, sendo já uma realidade um sistema de extracção, amplificação e detecção integrada que permite a automatização quase total (GeneXpert, Cepheid). A rapidez da reacção nestes equipamentos é possível devido à elevada razão área-volume da mistura de reacção, normalmente depositada em recipientes longos e estreitos, bem como a mecanismos de variação térmica altamente eficientes, por circulação de ar ou condutividade térmica (Csako, 2006). A maior eficiência da variação térmica aliada às características físicas dos recipientes de reacção, permitem a desnaturação das cadeias de DNA em cerca de 1 segundo, possibilitando a realização de uma reacção de PCR entre 30 a 60 minutos.

Há ainda diferenças na forma de detecção (tipo de lâmpada ou laser) e também nos comprimentos de onda a que a fluorescência é detectada. Alguns exemplos dos equipamentos mais usados incluem o LightCycler[®] (Roche), SmartCycler (Cepheid) e 7300 Real Time System (Applied Biosystems).

Na figura 6 é possível observar o sistema óptico do LightCycler 2.0, Roche, em que a excitação é conseguida através de um LED (*light emitting diode*) a um comprimento de

onda de 470nm, possuindo este equipamento seis canais capazes de detectar a fluorescência emitida em seis comprimentos de onda distintos.

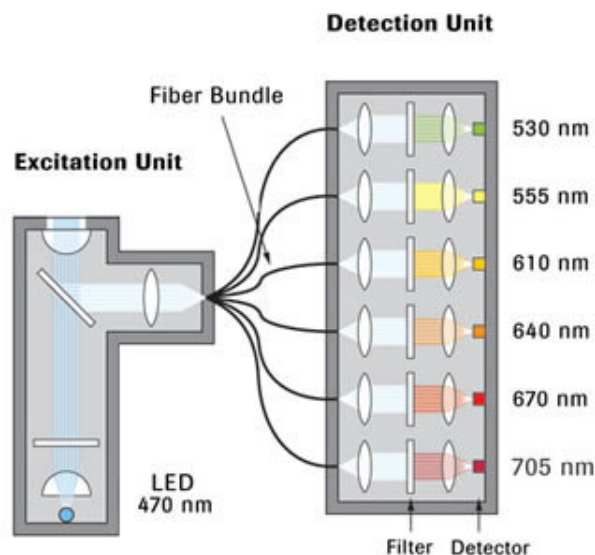


Figura 6. Sistema óptico de excitação e detecção de fluorescência do LightCycler 2.0, Roche.

1.1.14.2.2 FORMATOS DE DETECÇÃO EM TEMPO REAL

Para detectar o produto amplificado, é incorporado na mistura de reacção um marcador fluorescente que se liga ao DNA durante a amplificação. Esta ligação pode ser inespecífica ou específica. No primeiro caso o marcador, SYBR[®]Green por exemplo, tem a propriedade de se intercalar durante os passos de hibridação e extensão, em quaisquer cadeias duplas de DNA formadas, originando um sinal fluorescente significativo, que aumenta na proporção directa ao aumento do produto amplificado. A inespecificidade deste sinal resulta de nem todas as cadeias duplas de DNA se deverem à amplificação das sequências alvo. Por exemplo, a formação de dímeros de *primers*, resulta na detecção de um sinal inespecífico com SYBR[®]Green. Um sinal específico pode ser conseguido usando sondas fluorogénicas, como as TaqMan[®], *Molecular beacons*, Eclipse[®], entre outras (Smith et al, 2004). Em todos os casos referidos, a sonda é marcada com um fluorocromo numa extremidade e com um *quencher* na outra.

A hibridação assegura a separação destas moléculas, interrompendo a absorção da fluorescência pelo *quencher*, o que, conseqüentemente, resulta na emissão de fluorescência.

1.1.14.2.2.1 SONDAS TAQMAN

As primeiras sondas fluorescentes desenvolvidas para PCR em tempo real foram as 5'nuclease, habitualmente designadas pela marca comercial - TaqMan®. Neste formato, um pequeno oligonucleotídeo é marcado com uma molécula *reporter* na extremidade 5', e uma molécula *quencher* na extremidade 3'. Quando a sonda hibridiza com o alvo, em cada ciclo de extensão a actividade 5'-3' exonuclease da polimerase do DNA hidrolisa a sonda, libertando o *reporter*. A fluorescência emitida por esta molécula deixa de ser absorvida pelo *quencher*, sendo captada por um sistema óptico de detecção (Figura 7).

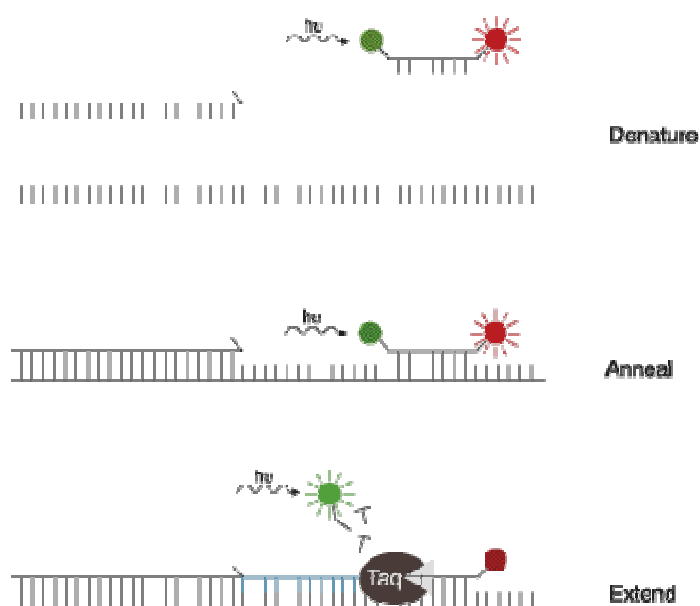


Figura 7. Princípio TaqMan® com libertação da molécula repórter durante a fase de extensão pela actividade exonuclease da DNA polimerase.

A molécula fluorescente livre (*reporter*) acumula-se após cada ciclo de PCR, podendo a sua intensidade ser captada em qualquer altura da reacção, incluindo o passo de

annealing, o que não acontece com as sondas de hibridação, cuja captura de fluorescência apenas pode ser efectuada precisamente na fase de hibridação.

1.1.14.2.2.2 SONDAS DE HIBRIDAÇÃO - FRET

O princípio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) baseia-se na transferência de energia entre fluorocromos adjacentes, dependendo da distância entre eles. Neste formato são usadas duas sondas desenhadas de forma a hibridarem com o alvo numa configuração “cauda-cabeça”. A sonda *upstream* está marcada com uma molécula fluorescente na extremidade 3’ e a sonda *downstream* está marcada com uma aceitadora na extremidade 5’. Se as duas sondas hibridarem com o produto de PCR alvo, a fluorescência emitida pelo fluorocromo na extremidade 3’ da primeira sonda é absorvida pelo fluorocromo aceitador na extremidade 5’ da segunda sonda. Este segundo fluorocromo é assim excitado, emitindo fluorescência num comprimento de onda detectado e medido no final de cada passo de hibridação, pelo sistema óptico do equipamento (Figura 8).

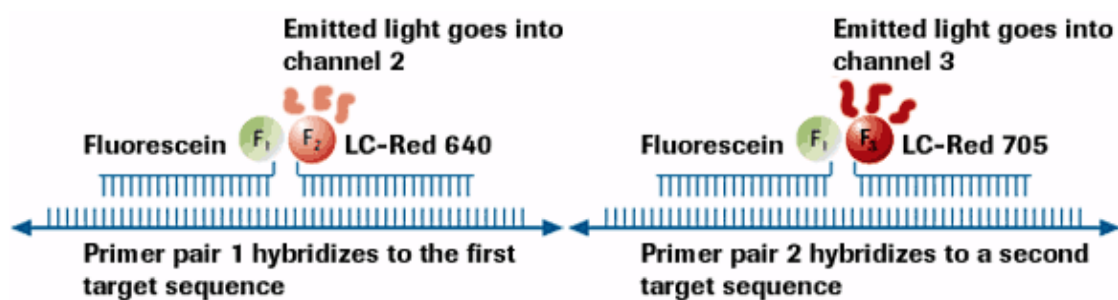


Figura 8. Princípio FRET em ensaio *multiplex*, com emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda.

As duas sondas alinhadas compreendem uma região de 40 a 50 pares de bases, apenas ocorrendo transferência de energia, logo, emissão de fluorescência, se a hibridação com o produto alvo ocorrer de forma exacta, o que confere a este formato uma elevada especificidade.

A tecnologia FRET permite também a análise de curvas de dissociação do produto amplificado. Elevando lentamente a temperatura da reacção, as sondas destacam-se do produto de PCR, perdendo-se o sinal fluorescente. A temperatura à qual metade do híbrido alvo-sonda se dissocia, designa-se por temperatura de dissociação ou *melting* (T_m) e depende do conteúdo guanina/citosina da sequência e do comprimento do oligonucleotídeo.

Ao contrário do que acontece com as sondas TaqMan®, um polimorfismo num único nucleótido não impede que o sinal fluorescente ocorra, mas a temperatura de *melting* correspondente será mais baixa. Assim, este formato pode ser usado para discriminar organismos, podendo ser usados diferentes fluorocromos, conforme a capacidade do sistema óptico de detecção da plataforma usada (Kubista et al, 2006). Na figura 9 é possível observar um exemplo das curvas de dissociação com os respectivos picos de temperatura de *melting* (T_m), específica das diferentes sequências em estudo.

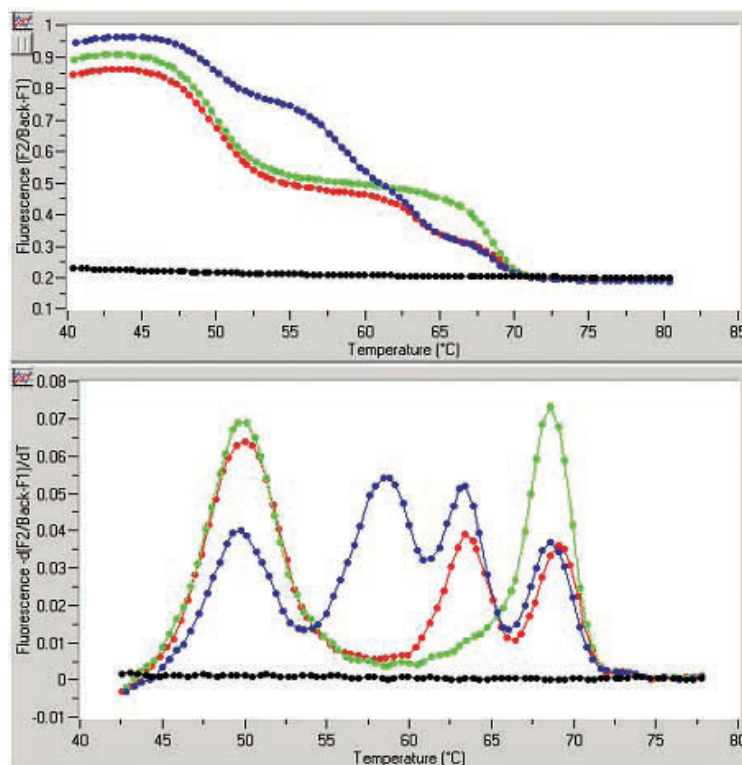


Figura 9. Curvas de dissociação, com os respectivos picos correspondentes à temperatura de *melting* (T_m), específica para diferentes alvos.

1.1.14.3 PCR Universal

Habitualmente procura-se identificar o agente causal pela presença de uma sequência de DNA específica da espécie, em que os genes alvo estão normalmente envolvidos na patogenicidade ou virulência do microrganismo. No entanto, esta abordagem torna-se pouco adequada quando um leque alargado de agentes pode estar envolvido, como é o caso do sangue, e o volume de amostra disponível é limitado como ocorre com o LCR.

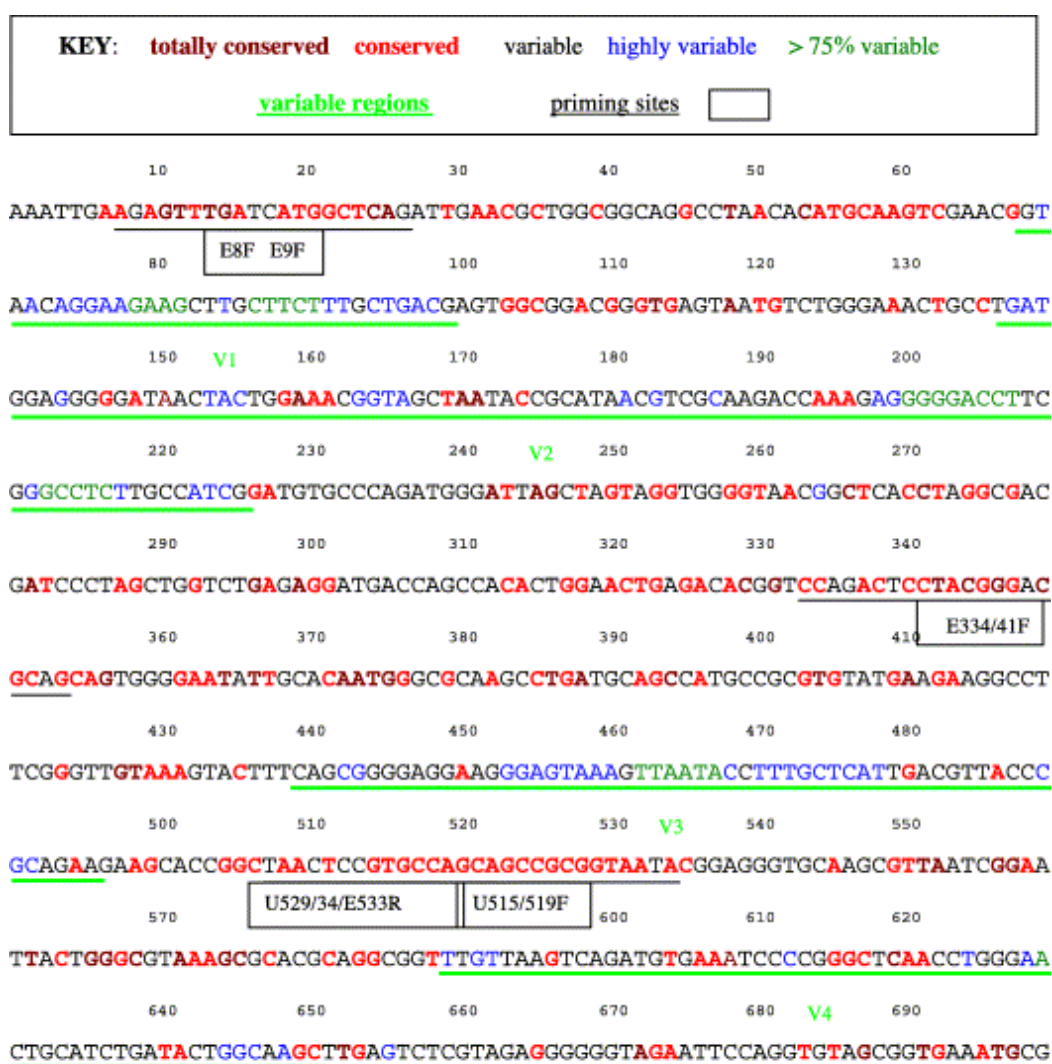


Figura 10. Mapa de variabilidade bacteriana. Sequência do gene 16S rRNA de *E. coli* com locais de ligação de *primers* universais e regiões variáveis V1 a V9 sublinhadas a verde claro. Adaptado de (Baker et al, 2003)

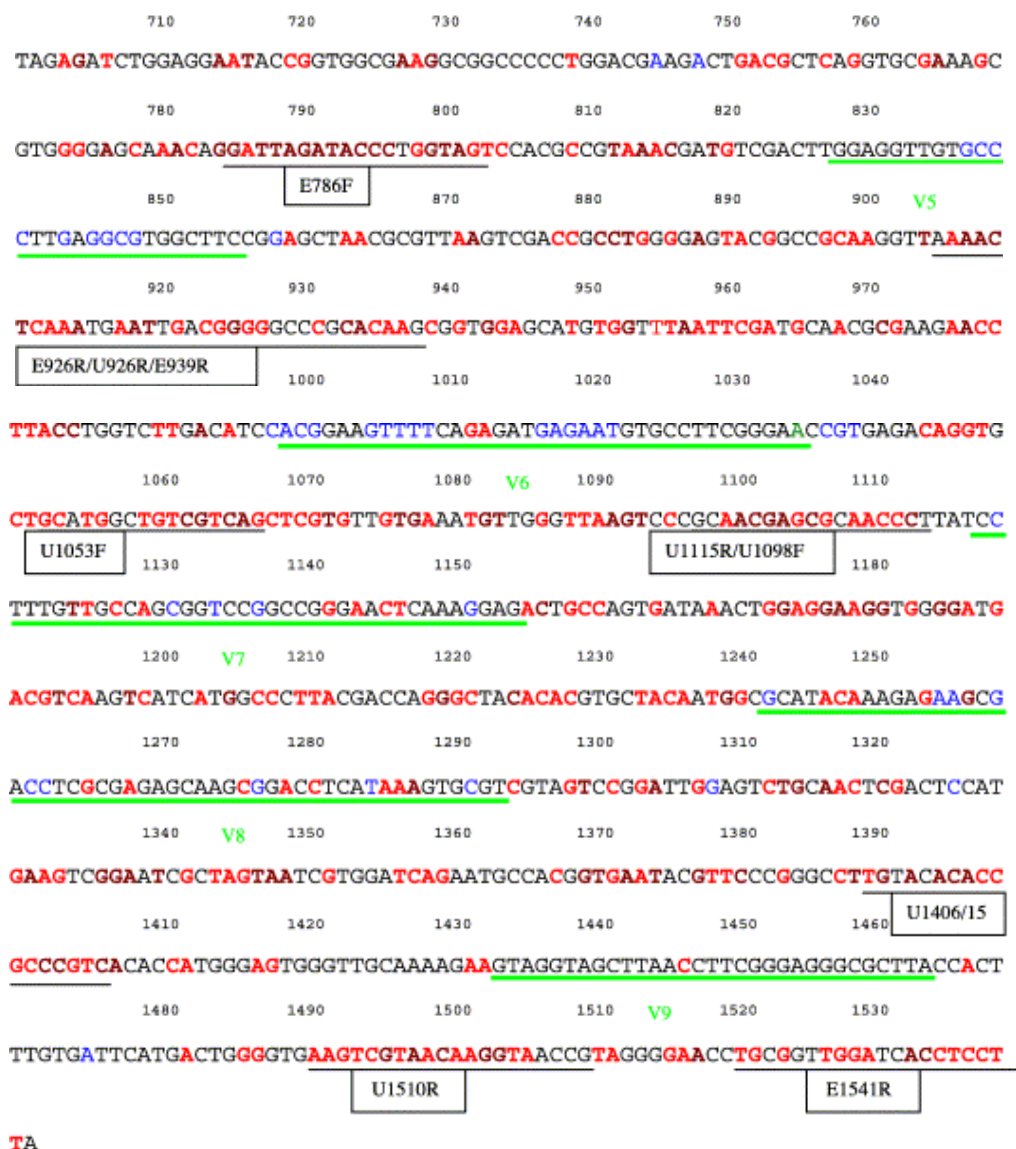


Figura 10. (Continuação) Mapa de variabilidade bacteriana. Sequência do gene 16S rRNA de *E. coli* com locais de ligação de *primers* universais e regiões variáveis V1 a V9 sublinhadas a verde-claro. Adaptado de (Baker et al, 2003)

Uma estratégia alternativa aplicável às amostras biológicas normalmente estéreis, como o sangue e o LCR, consiste na amplificação de zonas conservadas dos genes que codificam para o RNA ribossomal (rRNA) bacteriano (Persing, 1993), com recurso a primers de especificidade alargada, cobrindo numa única reacção uma ampla gama de agentes bacterianos (Greisen et al, 1994; Leong & Greisen, 1993; Wilson et al, 1990).

O princípio da PCR universal para amplificação do rRNA, baseia-se na descoberta de que todos os organismos não virais partilham homologia em pequenos segmentos dos genes de rRNA (Persing, 1993). Alguns segmentos encontram-se em todas as formas de vida não virais, outros são comuns a todos os membros do grupo *Bacteria*

(Fonseca, 1998). Esta característica possibilita a síntese de primers universais, para a amplificação e/ou determinação da sequência de uma grande variedade de organismos (Greisen et al, 1994; Lu et al, 2000).

Dada a quantidade de informação disponível sobre a sequência do gene 16S rRNA, sabe-se que este mantém uma natureza altamente conservada ao longo de todo o reino procariota (Amann et al, 1995; Hugenholtz et al, 1998; Keswani & Whitman, 2001; Persing, 1993) . Assim, o gene do 16S rRNA, constituinte da pequena subunidade ribossomal 30S dos procariotas, está presente em múltiplas cópias, no genoma de todas as bactérias conhecidas, patogênicas ao homem.

A estrutura secundária do gene 16S rRNA possui nove regiões hiper variáveis, interrompidas ocasionalmente por regiões conservadas (figura 10) (Baker et al, 2003; Van de Peer et al, 1996), o que possibilita a amplificação por PCR de sequências alvo usando *primers* “universais” (Amann et al, 1995; Breitkopf et al, 2005; Corless et al, 2001; Greisen et al, 1994; Jordan & Durso, 2005; Lu et al, 2000; Rantakokko-Jalava et al, 2000; Vliegen et al, 2006; Wilson et al, 1990; Xu et al, 2005).

1.1.14.3.1 LIMITAÇÕES

No entanto, uma vez que a PCR universal pode detectar a quase totalidade das bactérias, incluindo a flora normal da pele, torna-se difícil discriminar uma infecção de uma eventual contaminação durante o processo de colheita da amostra (Corless et al, 2000). Este princípio aplica-se ainda à possibilidade de contaminação dos reagentes e material habitualmente utilizados na PCR (Corless et al, 2000; Nikkari et al, 2001). Como na PCR uma simples cópia de DNA molde pode ser amplificada 10^6 a 10^9 vezes, qualquer contaminação com DNA bacteriano exógeno pode ser problemática. Por outro lado, a purificação das polimerases a partir das bactérias parece ser uma fonte recorrente de contaminação de genes 16S rDNA, estando documentada a co-purificação de ácidos nucleicos, incluindo sequências de DNA ribossomal. A solução utilizada consiste na irradiação dos reagentes com luz UV com uma concentração otimizada, de forma a neutralizar o DNA contaminante, solução que implica algum sacrifício da sensibilidade, em benefício da especificidade do resultado (Corless et al, 2000; Nadkarni et al, 2002; Nikkari et al, 2001; Yamamoto, 2002).

1.1.14.4 *Sequenciação*

As primeiras tentativas para sequenciar DNA foram efectuadas na década de 60 através da análise detalhada de produtos de degradação (Shendure et al, 2008). No entanto o comprimento e a complexidade do polímero de DNA mostraram ser bastante problemáticos. Em 1977 dois grupos liderados por Fred Sanger e Walter Gilbert publicaram, independentemente, descrições de metodologias para sequenciação de DNA, tendo por base a electroforese em gel, capaz de separar fragmentos de DNA com resolução de um único par de bases (Maxam & Gilbert, 1977; Sanger et al, 1977). Nos anos que se seguiram, a disseminação rápida destas tecnologias e a progressão para protocolos robustos, estiveram na origem de avanços críticos nas áreas da genética e da biologia molecular. O desenvolvimento de plataformas de sequenciação automática e a sua comercialização nos anos 80, determinaram o domínio do protocolo desenvolvido por Sanger, também designado por sequenciação dideoxi, que se tornou no método de escolha nas décadas seguintes (Hunkapiller et al, 1991; Shendure et al, 2008).

1.1.14.4.1 MÉTODO DE SANGER

O método clássico de Sanger requer uma cadeia simples de DNA alvo, *primer*, DNA polimerase, nucleótidos com marcação radioactiva e nucleótidos modificados que terminam a extensão das cadeias de DNA. A amostra é dividida em quatro reacções de sequenciação separadas, contendo os quatro deoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP). A cada reacção é adicionado apenas um dos quatro di-deoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP), terminadores de cadeia que não possuem o grupo 3'-OH, necessário para a ligação fosfodiéster entre nucleótidos durante a extensão das cadeias de DNA. A incorporação de di-deoxinucleótidos termina a extensão das cadeias, resultando em fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Estes fragmentos marcados são desnaturados pelo calor e separados por electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. Cada uma das quatro reacções é corrida em poços individuais, com visualização por auto-radiografia.

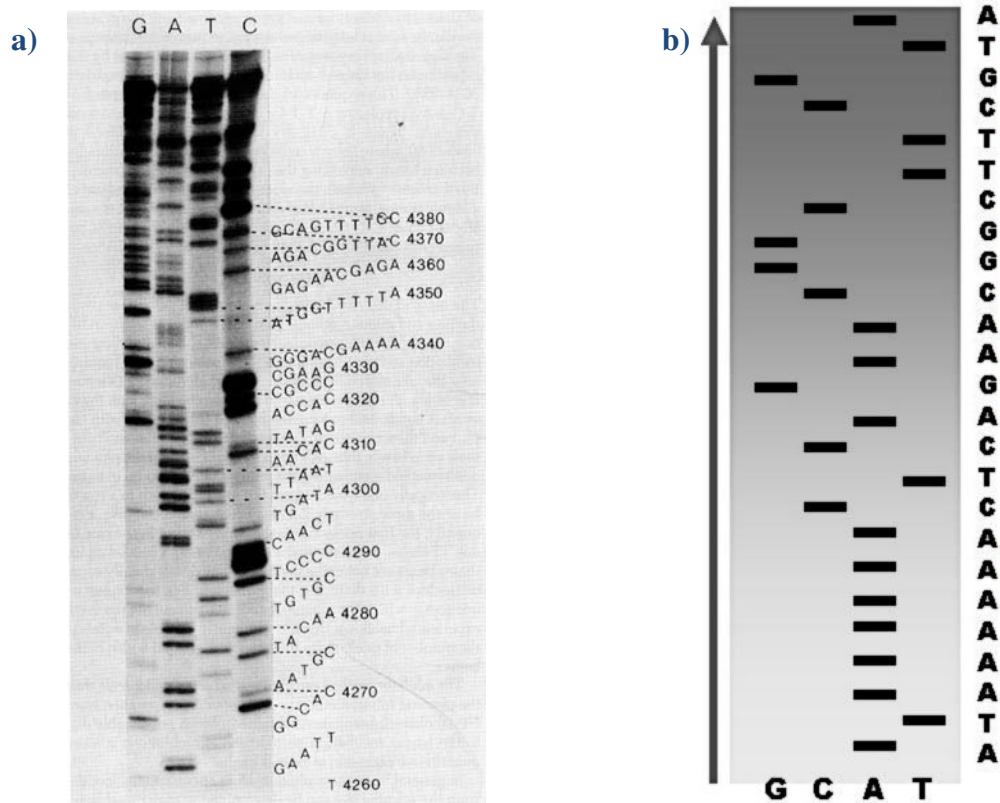


Figura 11. a) Auto-radiografia de um gel de acrilamida da sequência de DNA do ϕ X174 como descrito por Sanger em 1977 (Sanger et al, 1977); b) esquema da sequenciação de Sanger, com leitura dos fragmentos de baixo para cima com a respectiva sequência à direita.

1.1.14.4.2 SEQUENCIAÇÃO CÍCLICA AUTOMÁTICA

O método de sequenciação dideoxi actual difere do método clássico de Sanger em alguns pontos-chave. É efectuada apenas uma reacção para a extensão de primers, que inclui os quatro di-deoxinucleótidos (ddNTPs). Estes estão marcados com fluorocromos que são excitados ao mesmo comprimento de onda, mas com diferentes espectros de emissão, permitindo a sua identificação. Para minimizar a quantidade de DNA alvo necessário, é efectuada uma reacção de sequenciação cíclica, em que são efectuados múltiplos ciclos de desnaturação, hibridação de *primers* e extensão das cadeias para aumentar linearmente o número de cadeias terminadas. Este passo requer o uso de polimerases apropriadas, termo-estáveis e com capacidade de incorporar os ddNTPs modificados.

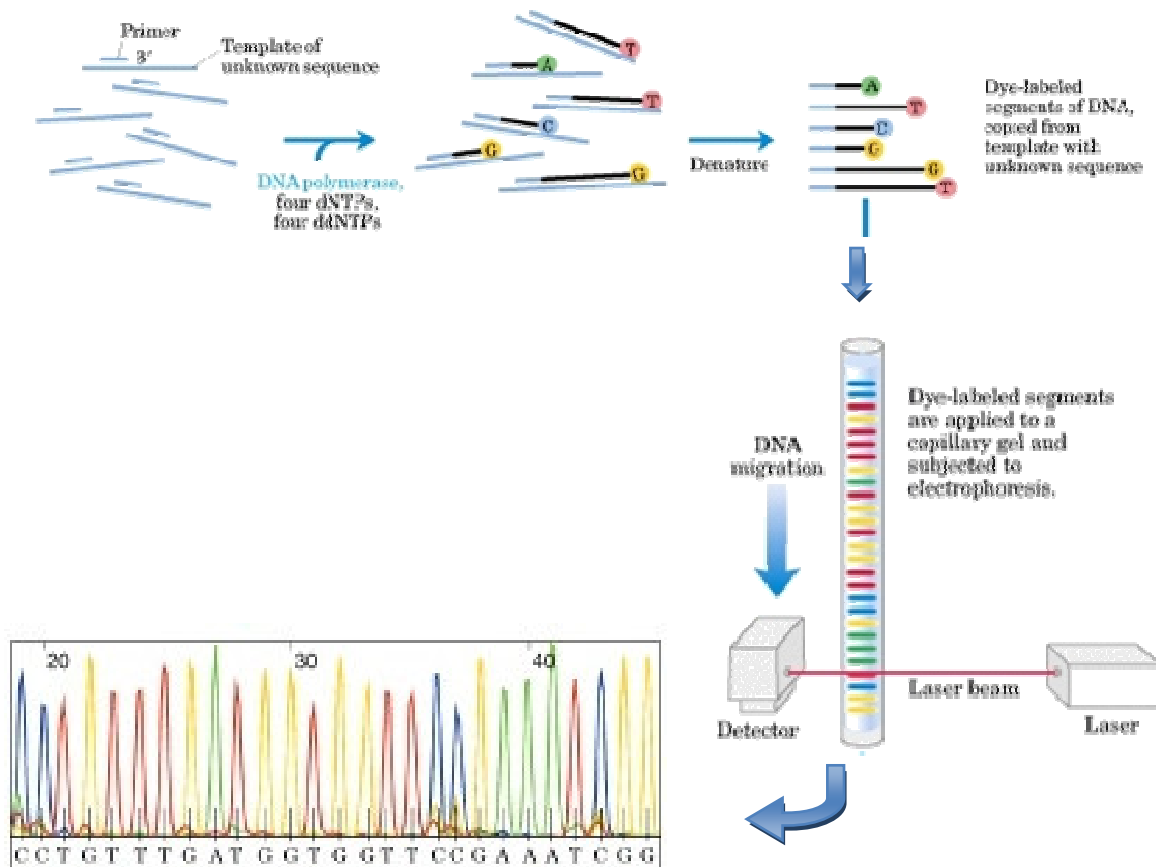


Figura 12. Esquema representativo da sequenciação cíclica automática.

Os produtos da reacção de sequenciação cíclica são então analisados num equipamento de sequenciação automática, por electroforese num capilar longo, preenchido com polímero desnaturante, que resulta na separação dos fragmentos por tamanho, com resolução de um único par de bases. À medida que os fragmentos distintos passam através de um sensor óptico, os fluorocromos dos ddNTPs são excitados a um dado comprimento de onda, emitindo fluorescência em diferentes comprimentos de onda, revelando a identidade da sua base terminal por FRET. A medição simultânea dos espectros de emissão dos quatro comprimentos de onda, produz um traço sequencial a quatro cores. Algoritmos informáticos (*base callers*) interpretam a altura dos picos obtidos, produzindo uma sequência de DNA. A exactidão das leituras pode alcançar os 99.999% (Shendure et al, 2008).

Os instrumentos de sequenciação automática convencionais são capazes de efectuar leituras de pouco mais de 1000 pares de bases de comprimento, ou produzir 2.5 mega bases de informação por dia.

1.1.14.4.3 PROGRESSOS NA SEQUENCIAÇÃO DE DNA

Os progressos no método de sequenciação aumentaram com a selecção de alvos de sequenciação de maior complexidade, desde o genoma mitocondrial humano com 16.5 kb, até ao genoma do citomegalovírus (hCMV) com 237 kb (Hutchison, 2007). Além dos avanços na automatização, foi desenvolvido um conjunto de tecnologias de suporte com o objectivo de reduzir custos e aumentar a capacidade de sequenciação. Desde a construção de bases de dados, preparação de amostras, di-deoxinucleótidos fluorescentes e polimerases termo-estáveis, bem como a implementação de centros de sequenciação de grande fluxo em unidades especializadas na sequenciação eficiente de DNA (Shendure et al, 2008).

Muito do investimento no desenvolvimento da sequenciação teve por base o *Human Genome Project*, cujo esboço foi conseguido em 2001 (Lander et al, 2001). A inovação tecnológica necessária a um projecto destas dimensões levou à diminuição exponencial do custo por base sequenciada (Collins et al, 2003). Na figura 13 é possível acompanhar a análise genómica em larga escala para diferentes organismos ao longo do tempo.

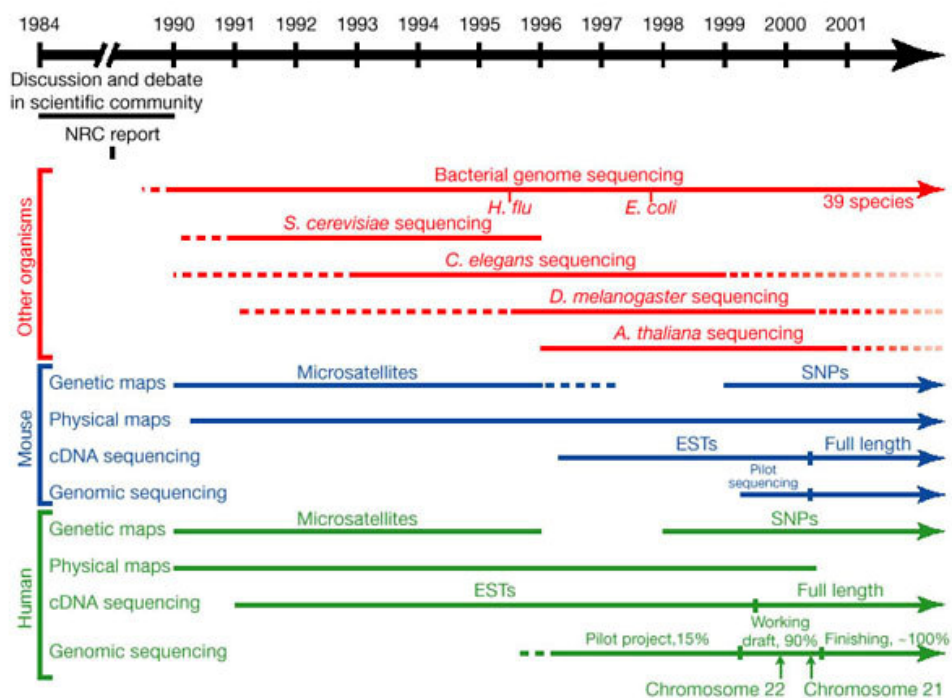


Figura 13. Linha temporal da análise genómica em larga escala, sendo visível a vermelho o trabalho efectuado em organismos não vertebrados. (Lander et al, 2001).

1.1.14.4.4 CYCLIC ARRAY SEQUENCING

As plataformas de sequenciação automática recentemente comercializadas, que não adoptam o método de Sanger, incluem os sistemas 454/Roche e SOLiD™/Applied Biosystems cujo princípio de funcionamento pode ser designado por sequenciação cíclica em matriz. Estes sistemas são capazes de decodificar simultaneamente uma matriz bidimensional com milhões de características sequenciais distintas.

O sistema 454/Roche aplica o princípio da pirosequenciação, um método de sequenciação por síntese em tempo real, que apresenta uma exactidão semelhante ao método de Sanger (Wicker et al, 2006). Neste método o DNA genómico é fragmentado mecanicamente e liga-se a micro esferas. Estas são capturadas em emulsão, funcionando como micro reactores de PCR amplificando o alvo milhões de vezes. As micro esferas são então distribuídas em placas de fibra óptica, distribuídas por poços onde são adicionados os quatro nucleótidos à vez. A integração de um nucleótido numa cadeia de DNA, traduz-se na emissão de um sinal luminoso pela libertação de pirofosfato inorgânico catalisado pela enzima luciferase. A intensidade do sinal é proporcional ao número de nucleótidos que são integrados a cada passo (Figura 14 e 15.a).

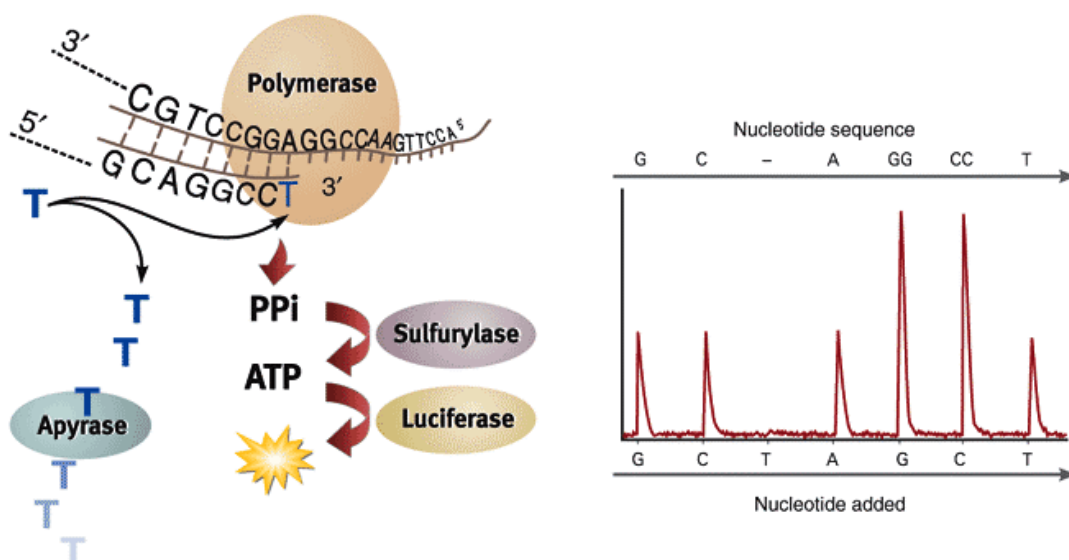


Figura 14. Princípio da pirosequenciação. Activação da cascata enzimática quimioluminescente, capaz de gerar um sinal luminoso possível de quantificar.

No sistema SOLiD™ comercializado pela Applied Biosystems, as micro esferas são dispersas na superfície de uma lâmina de vidro e imobilizadas por uma camada fina de gel de acrilamida ou por ligação covalente directa à superfície. Uma característica única deste sistema reside na enzima utilizada, uma ligase. A cada ciclo, um conjunto de sondas marcadas competem pela ligação ao *primer* de sequenciação. Este conjunto de sondas está organizado de forma a existir correlação entre a identidade do fluorocromo que marca a sonda e a posição específica da base (Figura 15.b).

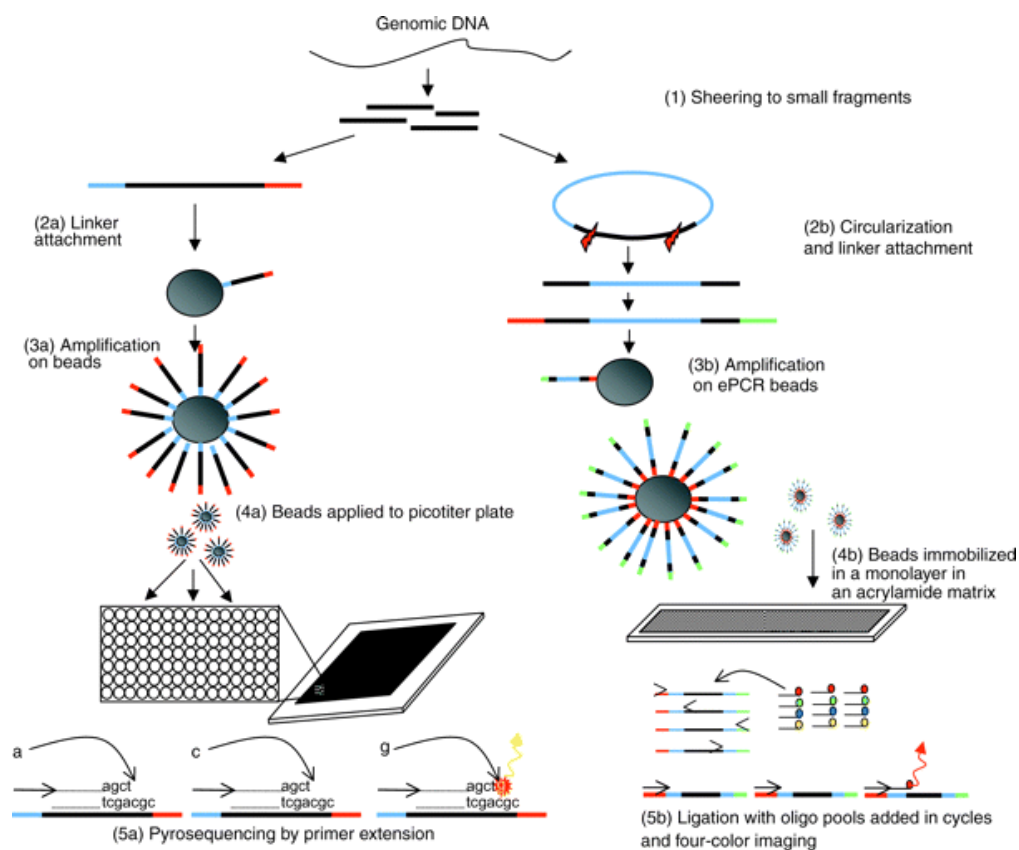


Figura 15. Representação do princípio de sequenciação cíclica em matriz, usado pelo sistema 454/Roche (a) e SOLiD™/Applied Biosystems (b) Adaptado de: (Hall, 2007)

Os dois sistemas são cíclicos, uma vez que a cada ciclo um processo enzimático questiona a identidade de uma única base, paralelamente para todos os elementos. As vantagens residem na quantidade de informação que estes sistemas conseguem processar paralelamente, numa única corrida, a custos inferiores aos métodos de sequenciação tradicionais. As sequências obtidas são significativamente menores do que com o método dideoxi, sendo necessário juntar os vários fragmentos obtidos e rever as

bases de dados de forma a verificar a compatibilidade. Como todos os métodos novos, será necessário estabelecer a sua exactidão e aplicabilidade. Vários grupos estão já a desenvolver plataformas para sequenciação directa de moléculas simples, sem qualquer passo de amplificação (Shendure et al, 2008). É previsível que os métodos de sequenciação paralela massiva sejam dominantes nos próximos anos (Hutchison, 2007).

1.1.14.4.5 SEQUENCIAÇÃO BACTERIANA

O ano de 1995 marcou a publicação das sequências genómicas de duas bactérias patogénicas humanas: *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al, 1995) e *Mycoplasma genitalium* (Fraser et al, 1995). Inicialmente usada primordialmente em investigação, os desenvolvimentos tecnológicos deram lugar a um manancial de informação que permitiu estabelecer a sequenciação microbiana como uma ferramenta essencial em várias áreas da microbiologia clínica, abrindo novos horizontes nos campos do diagnóstico, epidemiologia, patofisiologia e terapêutica (van Belkum, 2003). Até à presente data (Abril 2008) estão disponíveis 682 sequências cromossómicas bacterianas completas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=2&type=1&name=Bacteria%20Complete%20Chromosomes>), sendo a figura 16 ilustrativa do aumento significativo do número de genomas bacterianos sequenciados nos últimos anos.

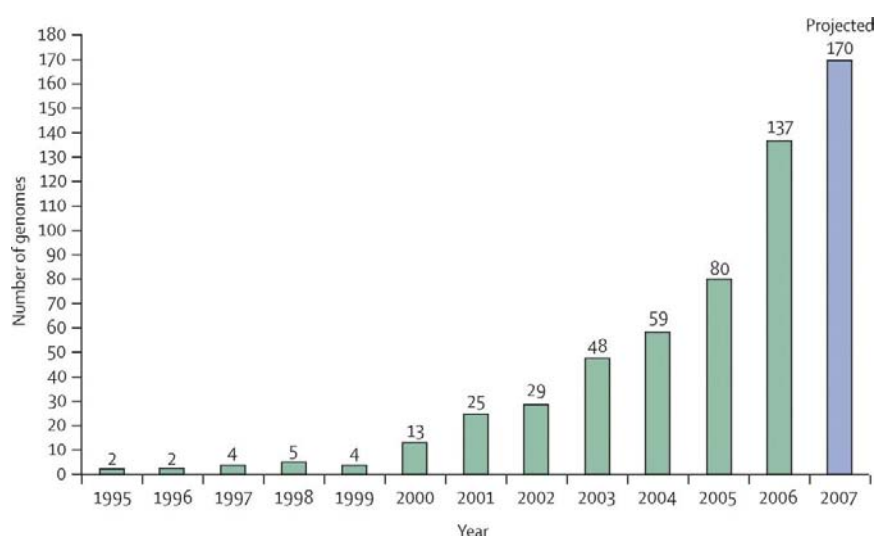


Figura 16. Número de genomas bacterianos completamente sequenciados desde 1995, ano da sequenciação do genoma de *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium*. Adaptado de (Fournier et al, 2007).

A informação disponibilizada pela sequenciação do genoma bacteriano pode ser usada para seleccionar alvos para detecção molecular e genotipagem. Após identificação das funções dos diferentes genes por analogia com outras bactérias, é possível deduzir características fenotípicas a partir do genótipo. As aplicações resultantes incluem o desenvolvimento de meios de cultura específicos, a identificação de mecanismos de resistência aos antibióticos, a identificação de factores de virulência e a exploração das interacções hospedeiro-patogéneo (Fournier et al, 2007).

Uma das limitações dos métodos moleculares prende-se com a selecção da sequência alvo, que pode interferir na sensibilidade e especificidade da detecção, e a capacidade de discriminar entre espécies e mesmo estirpes. A sequenciação genómica forneceu as bases para a correcta escolha de alvos (Figura 17).

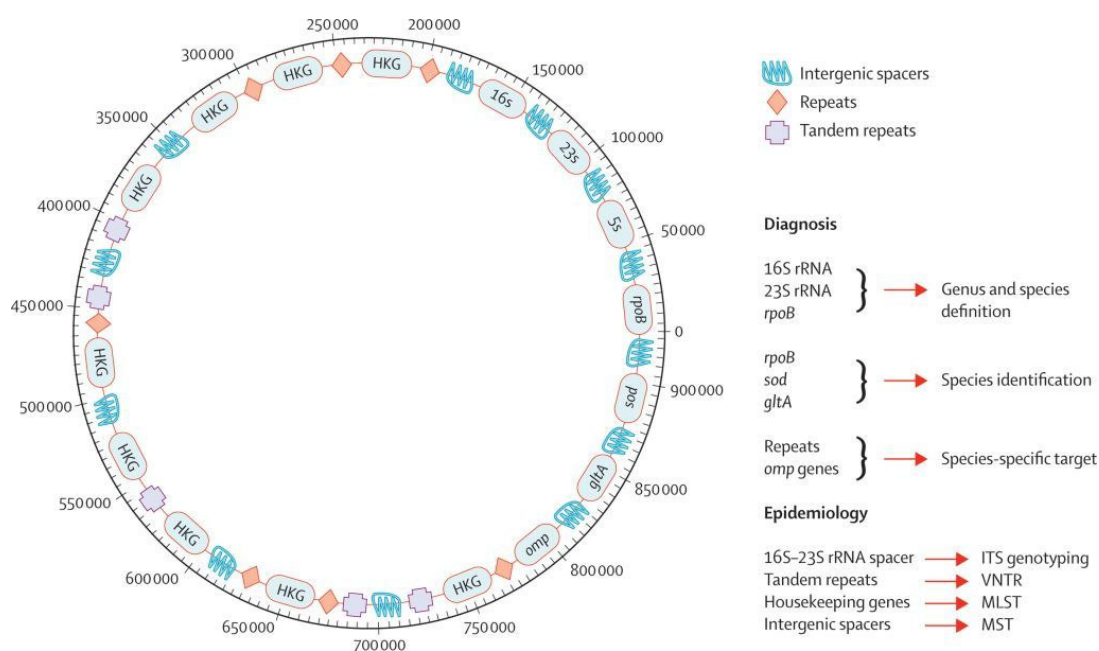


Figura 17. Estratégias para a escolha de *primers* e sondas para PCR. Adaptado de (Fournier et al, 2007)

Hkg=housekeeping gene. Its=internal transcribed spacer. Mlst=multilocus sequence typing.

Mst=multispacer typing. Vntr=variable number of tandem repeats

1.1.15 Sequenciação do Gene 16S rRNA

Em 1965 Dubnau e colaboradores estudaram oito espécies do género *Bacillus*, encontrando um *core* de material genético conservado, relativamente resistente à alteração evolutiva, que incluía os genes que codificam para o RNA ribossomal e RNA de transferência (Dubnau et al, 1965a; Dubnau et al, 1965b). Nos anos 80 Woese, num estudo pioneiro, referiu-se a uma revolução na biologia, atribuída à possibilidade de sequenciar ácidos nucleicos, bem como às abordagens moleculares que alteraram a percepção da evolução bacteriana. Este autor mostrou que era possível determinar relações filogenéticas entre bactérias comparando regiões conservadas do seu código genético (Woese, 1987). Woese referiu-se a cronómetros moleculares, moléculas cuja sequência se altera aleatoriamente ao longo do tempo. Não sendo possível comparar o estado inicial de evolução com o final (presente), uma vez que o padrão inicial (ancestral) não está disponível, a comparação é efectuada entre versões de uma dada sequência, representativas de linhagens diversas, partilhando um padrão ancestral comum (Woese, 1987). Os genes que codificam para o 5S, 16S e 23S rRNA, bem como os espaços entre estes genes, possuem a estabilidade suficiente para permitir esta comparação, sendo o gene 16S rRNA o mais usado em taxonomia bacteriana. O gene 16S pode ser comparado não só entre bactérias, mas também com o gene 16S rRNA das arqueobactérias e o gene 18S rRNA dos eucariotas. A figura 18 mostra a relação entre os domínios *Archaea*, *Bacteria* (procariotas) e *Eucarya*, bem como os principais ramos nos procariotas baseados nas sequências do gene 16S rRNA (Clarridge, 2004; Woese, 1987).

O gene 16S rRNA apresenta-se altamente conservado, o que se supõem ser resultado do seu papel crítico na função celular, sendo possível detectar regiões com maior taxa de mutação. Sendo um gene alvo para vários agentes antimicrobianos, algumas mutações podem afectar a susceptibilidade do organismo a estes agentes. Possui uma sequência com cerca de 1500 bp, com polimorfismos inter-espécie suficientes para permitir distinções com validade estatística. Sendo universal, o gene 16S rRNA permite estabelecer relações entre todas as bactérias.

2. OBJETIVOS

Com este trabalho pretendeu-se testar o kit comercial *SeptiFast* Test (Roche), aplicando-o a amostras de sangue total de pacientes seleccionados com base em critérios clínicos e comparar os resultados obtidos com os resultados da hemocultura.

Pretendeu-se ainda otimizar uma técnica de amplificação do gene 16S rRNA, já estudada, recorrendo ao material e reagentes agora disponíveis, tentando aumentar a sensibilidade da mesma, sem comprometer a especificidade, para aplicação a produtos biológicos como sangue e LCR, com posterior comparação dos resultados obtidos com os resultados das culturas.

Foi ainda objectivo implementar uma metodologia de identificação de isolados bacterianos por sequenciação directa, recorrendo ao sistema comercial MicroSeq 500 (Applied Biosystems).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LC SeptiFast Test (Roche)

3.1.1 Amostras

Paralelamente à colheita de sangue para hemocultura, foram colhidas 47 amostras de 3 ml de sangue total, em K-EDTA, de forma asséptica, a pacientes internados na Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente (UCIP), com suspeita de sépsis, seleccionados com base em critérios clínicos. Foi também solicitada a colaboração do Serviço de Urgência (SU) do Hospital Geral de Santo António, Centro Hospitalar do Porto, de onde foram estudadas 38 amostras de sangue, sujeitas aos critérios de selecção já referidos. As amostras para estudo molecular foram conservadas entre 4 e 8°C ou a -20°C até processamento, de acordo com as indicações do fabricante. As hemoculturas foram enviadas de imediato ao serviço de Microbiologia para os procedimentos habituais.

3.1.2 Hemoculturas

O serviço de Microbiologia funciona em permanência, 24 horas por dia, pelo que as hemoculturas foram processadas de imediato, recorrendo ao sistema de monitorização contínua BacT/ALERT 3D, bioMérieux,

Após detecção automática de crescimento microbiano, foi efectuado o exame microscópico do caldo da hemocultura após coloração de Gram, sendo o resultado comunicado ao clínico responsável sempre que considerado relevante. Paralelamente foi efectuada subcultura do caldo da hemocultura em meio sólido enriquecido, para isolamento, identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.1.3 Estudo Molecular

3.1.3.1 *Extracção e Purificação dos Ácidos Nucleicos*

De acordo com as indicações do fabricante, foram dispensados 3mL de sangue em tubos de lise contendo esferas de vidro e cerâmica, sendo a lise mecânica efectuada no equipamento MagnaLyser durante 70 segundos a 7000 rpm. Ao lisado foi adicionada proteinase K e um tampão caotrópico de lise, potenciador da libertação de ácidos nucleicos, protegendo-os das DNases presentes no sangue. A cada amostra foi adicionado um controlo interno (CI), uma molécula sintética de DNA de cadeia dupla com locais de ligação aos *primers* idênticos aos das sequências alvo. As sequências do CI complementares à sonda de hibridação foram desenhadas de forma a permitirem a diferenciação das sequências alvo. Após digestão, o lisado foi transferido para colunas com filtros de sílica. O DNA genómico humano, bem como o DNA bacteriano ou fúngico alvo ligou-se à superfície da sílica. Todas as substâncias não ligadas, como sais, proteínas e outros fragmentos celulares foram removidos através de lavagens sucessivas. Os ácidos nucleicos adsorvidos foram finalmente libertados a temperatura elevada (72°C) num volume aproximado de 250 µL. Este processo foi efectuado recorrendo ao SeptiFast Lysis Kit M^{GRADE} e SeptiFast Prep Kit M^{GRADE}, e demorou perto de 4 horas a executar.

Em todas as extracções efectuadas foi introduzido um controlo negativo que foi sujeito a todos os procedimentos descritos paralelamente às amostras estudadas. Todos os passos de processamento da amostra e extracção de ácidos nucleicos foram efectuados numa sala apropriada, dedicada ao tratamento de amostras e manuseamento de ácidos nucleicos, em câmara de fluxo laminar descontaminada diariamente com RNase Away e radiação UV. Foi utilizado material plástico consumível (pontas, tubos, pipetas) com a classificação M^{GRADE} (*Microbiology grade*). Este material é sujeito a um tratamento que além da inviabilização de microrganismos, garante a destruição de quaisquer ácidos nucleicos potencialmente contaminantes.

3.1.4 Amplificação dos Ácidos Nucleicos

3.1.4.1 Alvo

A região alvo seleccionada foi a *internal transcribed spacer* (ITS), que apresenta diversos operões no genoma bacteriano e fúngico. A ITS está localizada entre as sequências de DNA ribossomal 16S e 23S de todas as bactérias gram-positivo e gram-negativo e entre as sequências de DNA ribossomal 18S e 5.8S de todos os fungos. Na tabela 4 estão discriminadas as diferentes espécies detectadas pelo teste *SeptiFast*.

Tabela 4. *SeptiFast* Master List (SML)

Gram (-)	Gram (+)	Fungos
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	CoNS ²	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i>	<i>Streptococcus spp</i> ³	<i>Candida krusei</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> ¹		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

¹ Não detecta *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*

² *Staphylococcus* coagulase negativos (*S. hominis*, *S. pasteurii*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*)

³ *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. constellatus*, *S. cristatus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. thermophilus*, *S. vestibularis*, *S. viridans*.

3.1.4.2 Amplificação

A amplificação dos ácidos nucleicos foi efectuada por PCR em Tempo Real no LightCycler 2.0 (Roche), recorrendo ao kit LC SeptiFast Test. Para cada amostra foram efectuadas três reacções de PCR: uma para amplificação de bactérias gram-positivo, uma para bactérias gram-negativo e a terceira para fungos. Em cada reacção foram usados *primers* genéricos ou específicos das espécies em estudo (informação não disponibilizada pelo fabricante).

Nas misturas de reacção foi incorporada a enzima AmpErase (uracil-N-glycosylase), capaz de reconhecer e catalisar a destruição de cadeias de DNA contendo deoxiuridina, constituintes do produto de PCR, mas conservando as cadeias com deoxitimidina, com origem no DNA bacteriano e fúngico.

Para cada reacção de PCR foram adicionados 50 µL de mistura de reacção a 50 µL de DNA, recorrendo aos capilares de 100 µL LightCycler M^{GRADE}. Após centrifugação, correu-se o programa descrito na tabela 5 no LightCycler 2.0, com a duração aproximada de 2 horas.

Tabela 5. Condições de termociclação SeptiFast Test Light Cycler 2.0

Descrição	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Rampa (°C/s)	Aquisição fluorescência
Incubação UNG	1	40	300	20	-
Activação enzimática	1	95	600	20	-
Amplificação I	Desnaturação	95	15	3	-
	<i>Annealing</i>	58	50	20	-
	Extensão	72	40	3	-
Amplificação II	Desnaturação	95	15	3	-
	<i>Annealing</i>	50	50	20	Simplex
	Extensão	72	40	3	-
Dissociação		95	60	20	-
		40	60	20	-
		80	0	0.1	Contínua

3.1.4.3 *Detecção do produto amplificado*

O produto amplificado foi detectado pela emissão de fluorescência recorrendo a sondas de hibridação FRET.

Cada uma das reacções de PCR (gram-positivos, gram-negativos e fungos) foi analisada em quatro canais diferentes, correspondentes a diferentes comprimentos de onda de emissão de fluorescência (Ch 610, Ch 640, Ch 670 e Ch 705). Em cada caso estava pré definido um valor de linha de base, capaz de determinar a diferença entre um resultado positivo ou negativo. A ausência de amplificação do controlo negativo, a amplificação dos controlos positivos com picos de dissociação (T_m) específicos e dentro de valores definidos pelo fabricante, bem como a amplificação do Controlo Interno (CI) em cada reacção, definiram a validade dos resultados.

O desenho das sondas usadas permitiu diferenciar as espécies pelas diferenças nas temperaturas de dissociação quando detectadas num mesmo canal. No final da reacção os resultados foram analisados individualmente, para correcção das diferentes temperaturas de dissociação obtidas.

3.1.4.4 *Identificação automática das espécies*

A identificação dos produtos amplificados teve por base a análise de curvas de dissociação das amostras e controlos, recorrendo ao *SeptiFast Identification Software*, capaz de gerar um relatório de resultados, validando o ensaio ou assinalando as falhas no mesmo.

Todo o software relativo ao sistema *SeptiFast*, de acordo com o conceito IVD – *in vitro diagnostics* – é fechado, não permitindo alterações ao programa, nem possibilitando alterações a parâmetros pré definidos.

3.2 Amplificação de 370bp do gene 16S rRNA

3.2.1 Amostras

Foram utilizadas estirpes ATCC - *American Type Culture Collection* existentes no serviço de Microbiologia, para a optimização dos protocolos de extracção e amplificação de ácidos nucleicos. As estirpes seleccionadas incluíram bactérias gram-positivo e bactérias gram-negativo (tabela 6).

Tabela 6. Estirpes bacterianas usadas no processo de optimização

Estirpes Bacterianas	
Bactérias gram-positivo	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49616
Bactérias gram-negativo	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

Foram efectuadas suspensões das diferentes estirpes em soro fisiológico, padronizado a 1 na escala de McFarland (30×10^7 UFC/ml), diluídas seriadamente e conservadas a -20°C até processamento.

3.2.2 Extracção e purificação dos Ácidos Nucleicos

Todo o material plástico usado na extracção de ácidos nucleicos foi sujeito a radiações UV (UV Crosslinker, Appligene), a $999.99 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ durante 20 minutos

(intensidade previamente otimizada), com o objectivo de inactivar DNA contaminante de origem exógena.

Dadas as diferenças na constituição da parede bacteriana das estirpes, estabeleceu-se um protocolo de tratamento enzimático pré-extracção, capaz de libertar os ácidos nucleicos quer de bactérias gram-positivo quer gram-negativo. Assim, após homogeneização, a 200µl de suspensão bacteriana, foram adicionados 100µl de tampão Tris-EDTA (QBiogene, USA), acrescentaram-se 10µl de Mutanolisina 1mg/ml (Sigma, Espanha) e 30µl de lisostafina 5mg/ml (Sigma, Espanha). As suspensões incubaram a 37°C por 60 minutos, seguindo-se homogeneização vigorosa no vortex.

A purificação de DNA bacteriano foi efectuada de forma automática no equipamento MagnaPure LC (Roche, Alemanha), com recurso ao kit Magna Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche, Alemanha), utilizando o protocolo de lise externa. A cada 300µL de suspensão bacteriana lisada como descrito, foram adicionados 200µl de tampão de lise, incubando 15 minutos com agitação. A extracção automática no Magna Pure LC obedeceu às indicações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram tratadas com agentes desnaturantes potentes e proteinase K, para digestão proteica. Uma vez livres, os ácidos nucleicos são adsorvidos à sílica que reveste a superfície das partículas magnéticas. Após lavagens para remoção de possíveis inibidores, o processo termina com a eluição dos ácidos nucleicos purificados. Para um volume de amostra pré tratada de 500µl, optou-se por eluir um volume de 50µl de DNA.

3.2.3 Amplificação 16S rRNA por PCR em Tempo Real

A reacção de PCR em tempo real foi otimizada no termociclador Smart Cycler II (Cepheid, USA) com base num protocolo previamente implementado. Os primers foram seleccionados a partir de um artigo de Greisen e colaboradores (Greisen et al, 1994). Do mesmo artigo foi retirada a sequência da sonda, que foi sintetizada com o formato TaqMan, sendo marcada com FAM (6-carboxifluoresceína) na extremidade 5' e TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) na extremidade 3'. As sequências de primers e sonda estão descritas na tabela 7.

Tabela 7. *Primers* e sonda TaqMan usados no PCR em tempo real para amplificação de 370bp do gene 16S rRNA.

Designação	Localização*	Sequência 5'→3'	Fragmento
<i>Primer forward</i> RW01	1170-1189	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT	
<i>Primer reverse</i> DG74	1522-1540	AGGAGGTGATCCAACCGCA	370 bp
Sonda RDR245	1369-1395	GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG	

*Localização em *Escherichia coli*

O protocolo base cumpria as seguintes condições: tampão da enzima 1X, concentração $MgCl_2$ a 2,5mM, dNTPs a 0,2mM, *primers* a 1 μ M, sonda a 0,3 μ M e enzima EXT DNA Polymerase (Finnzymes) a 0,04U/ μ L num volume final de 25 μ L incluindo 5 μ L de DNA. O programa de PCR seguiu os passos descritos na tabela 8.

Tabela 8. Programa de PCR em Tempo Real para amplificação de 370bp do gene 16S rRNA no SmartCycler, Cepheid.

Descrição	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
Activação enzimática	1X	95	300
Desnaturação		95	5
<i>Annealing</i>	45X	55	25
Extensão		68	30

Foi testada uma nova enzima – AmpliTaq DNA LD (Low DNA) (Applied Biosystems), bem como diferentes concentrações de $MgCl_2$ (2.0mM, 2.5mM, 3.0mM e 3.5mM), de primers (1.0 μ M, 1.2 μ M e 1.4 μ M) de sonda (0.3 μ M, 0.4 μ M e 0.5 μ M) e volume de DNA na reacção (5 e 10 μ l).

A avaliação das diferentes condições foi efectuada por análise da intensidade de fluorescência emitida, do valor de C_T (*cycle threshold*) no canal FAM do Smart Cycler.

Durante a fase de optimização foi efectuada a análise electroforética de todos os produtos de reacção por electroforese capilar no Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies), recorrendo ao kit Series II DNA 100.

3.2.4 Controlo de contaminações

Além da descontaminação de todo o material plástico usado no processo de extracção de ácidos nucleicos por exposição a radiação UV, a manipulação do DNA a testar foi sempre efectuada em câmara de fluxo laminar descontaminada com RNase Away (MBP, Molecular Bioproducts) e radiação UV, cumprindo sempre as normas de funcionamento da Unidade de Biologia Molecular no que respeita à separação física das áreas de manipulação de DNA, preparação da mistura de reacção e manipulação do produto amplificado, respeitando o fluxo unidireccional de trabalho.

Em cada reacção de PCR foi incluído um ou mais controlos negativos, que seguiram todos os passos do procedimento, sendo adicionada água ultra pura (Water Amplification Grade, Promega, USA), em vez de DNA, o que permitiu avaliar a pureza dos reagentes utilizados, bem como controlar a possibilidade de contaminação durante a fase de adição de DNA, durante a qual os tubos do controlo negativo permaneceram sempre abertos.

3.3 Sequenciação bacteriana

3.3.1 Estirpes bacterianas

Foram utilizados isolados bacterianos estudados no serviço de Microbiologia, provenientes de um programa externo de controlo de qualidade – UK NEQAS – *United Kingdom National External Quality Assessment Service*, bem como isolados clínicos obtidos a partir de diferentes produtos biológicos. As culturas bacterianas foram enviadas para sequenciação quando a sua identificação por métodos convencionais não se revelou conclusiva.

3.3.2 Extracção e purificação dos Ácidos Nucleicos

Foram usadas culturas em meio sólido para assegurar o grau de pureza das mesmas. Assim, com uma ansa estéril recolheram-se algumas colónias perfeitamente isoladas, que foram suspensas em 200 µl de tampão G2 (Qiagen). Adicionaram-se 10µl de Mutanolisina 1mg/ml (Sigma, Espanha) e 30µl de lisostafina 5mg/ml (Sigma, Espanha), incubando a 37°C por 60 minutos, ao que se seguiu homogeneização vigorosa no vortex. A purificação dos ácidos nucleicos foi efectuada recorrendo ao equipamento EZ 1 BioRobot (Qiagen) e ao Tissue Kit e Cartão de Bactérias do mesmo equipamento. O princípio do método de extracção tem por base o método das partículas magnéticas revestidas com sílica, já descrito. Seguiram-se as indicações do fabricante, optando-se por eluir os ácidos nucleicos num volume final de 100µl.

3.3.3 Amplificação e sequenciação com o sistema MicroSeq 500

Após quantificação por espectrofotometria, foram usados aproximadamente 25ng do DNA purificado para amplificação dos primeiros 500 pb do gene 16S rRNA recorrendo ao kit MicroSeq 500 16S rDNA Microbial Identification System (Applied Biosystems). O PCR foi efectuado no termociclador Perkin Elmer 9600, com um volume final de reacção de 30µl, com o programa descrito na tabela 9 de acordo com as indicações do fabricante.

Tabela 9. Condições de termociclação para amplificação com MicroSeq 500.

Descrição	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
Activação enzimática	1	95	600
Desnaturação		95	10
<i>Annealing</i>	30	60	30
Extensão		72	30
Extensão final	1	72	600

Confirmou-se a presença de produto amplificado por electroforese capilar recorrendo ao Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies), sendo possível observar nas amostras positivas um fragmento entre os 460 pb e os 560 pb.

A purificação dos produtos amplificados foi efectuada em colunas Microcon-100 Microconcentrator (Millipore), de acordo com as indicações do fabricante. A presença de DNA purificado foi confirmada por electroforese capilar como previamente descrito. A reacção de sequenciação cíclica foi efectuada com o MicroSeq 500 16S rDNA Sequencing Kit (Applied Biosystems), compreendendo uma reacção *forward* e outra *reverse*, cada uma num volume total de 20µl, dos quais 20ng de produto amplificado e purificado, no termociclador Perkin Elmer 9600 (Applied Biosystems) com o programa descrito na tabela 10, de acordo com o indicado pelo fabricante.

Tabela 10. Condições da reacção de sequenciação cíclica MicroSeq 500

Descrição	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
Desnaturação		96	10
<i>Annealing</i>	25	50	3
Extensão		60	240

Após a reacção assimétrica, o DNA foi purificado com o sistema de colunas AutoSeq™ G-50 Dye Terminator Removal Kit (GE-Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante, sendo então concentrado em centrífuga de vácuo durante 40 minutos. Finalmente o DNA foi desnaturado com 20µl de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) e pelo calor, 2 minutos a 95°C, sendo então transferido para o sequenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.3.4 Amplificação e sequenciação de 370pb do gene 16S rRNA

3.3.4.1 Amostras clínicas

A amplificação de 370bp do gene 16S rRNA foi testada inicialmente na Unidade de Biologia Molecular com o objectivo de detectar presença bacteriana em amostras de LCR de pacientes com suspeita de meningite bacteriana. O protocolo então iniciado não teve continuidade, uma vez que sem um método de identificação do microrganismo, a interpretação do resultado era problemática. Desta forma, para testar a viabilidade da identificação por sequenciação directa dos 370bp do gene 16S rRNA, utilizaram-se 11 amostras de LCR com resultado positivo por PCR em tempo real (protocolo já descrito).

Foram também sequenciados 5 isolados bacterianos previamente testados com o sistema MicroSeq 500 16S rDNA Microbial Identification System (Applied Biosystems).

3.3.4.2 *Procedimento*

Para avaliar a possibilidade de identificar bactérias sequenciando os 370pb amplificados como descrito em 3.2.3, recorreu-se ao BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). O processo é semelhante ao anteriormente descrito, resumidamente, foi efectuada amplificação do DNA no termociclador Smart Cycler II (Cepheid) com o programa descrito na tabela 8, mas sem adição de sonda na mistura de reacção. Foi verificada a presença de produto amplificado por electroforese capilar, este foi purificado com colunas Microcom-100 Microconcentrator. As reacções de sequenciação cíclica *forward* e *reverse* foram efectuadas separadamente, usando 8µl de Terminator Ready Reaction Mix, 3.2 pmol de cada *primer* e 3 a 10 ng de produto amplificado, completando com água ultra pura para um volume final de 20µl. O programa de PCR está descrito na tabela 10, sendo antecedido de um passo de desnaturação a 96°C durante 1 minuto. Seguiu-se o procedimento de purificação com as colunas AutoSeq™ G-50 Dye Terminator Removal Kit (GE-Healthcare), como descrito em 3.3.3, mas em vez de formamida foi usado TSR – Template Suppression Reagent (Applied Biosystems), sendo então as amostras transferidas para o sequenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.3.5 *Análise das sequências*

A análise das sequências foi efectuada recorrendo ao *software* Chromas (Genome Express) e incluiu a edição das sequências obtidas para resolução de discrepâncias resultantes das limitações dos sistemas de detecção e análise, e a comparação das mesmas com sequências existentes numa base de dados pública, recorrendo ao BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Foi considerado para identificação da bactéria o resultado com a maior percentagem de homologia com as sequências presentes na base de dados ou, quando aplicável, os dois resultados com maior percentagem de homologia.

4. RESULTADOS

4.1 SeptiFast Test

Analisando os resultados obtidos com o SeptiFast Test, recorrendo ao *SeptiFast Identification Software* (SIS), de 85 amostras, 3 (3,5%) foram consideradas inválidas dada a ausência de amplificação de CI nas três reacções de PCR. Assim, foram consideradas 45 amostras (55%) provenientes da UCIP e 37 amostras (45%) com origem no SU, num total de 82 amostras. A representação gráfica dos picos de dissociação do CI para gram-positivos (T_m 47,5°C no canal 705), gram-negativos (T_m 59°C no canal 705) e fungos (T_m de 47°C no canal 640) encontra-se na figura 19.

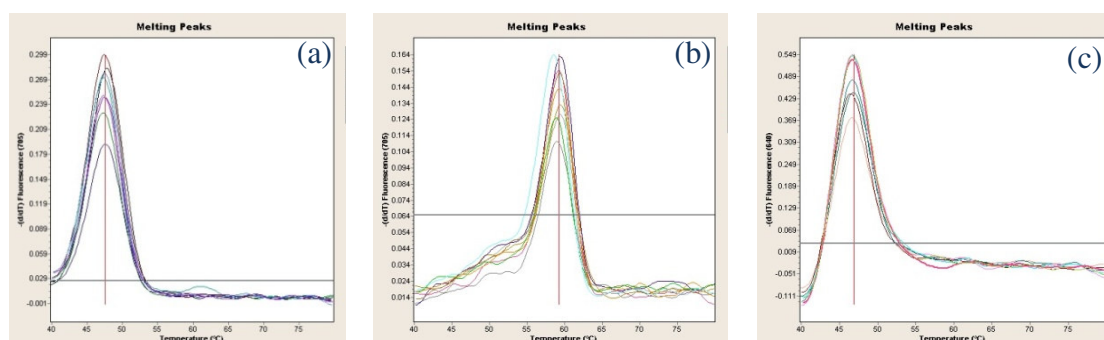


Figura 19. Representação gráfica dos picos de dissociação do controlo interno para gram-positivos (a), gram-negativos (b) e fungos (c).

Das amostras colhidas na UCIP, havia administração prévia de antibioterapia em 91% dos casos, enquanto nas amostras provenientes do SU esta terapia havia sido previamente estabelecida em apenas 5% dos casos (Figura 20). Portanto 52,4% do total das amostras foram obtidas de doentes com antibioterapia de largo espectro.

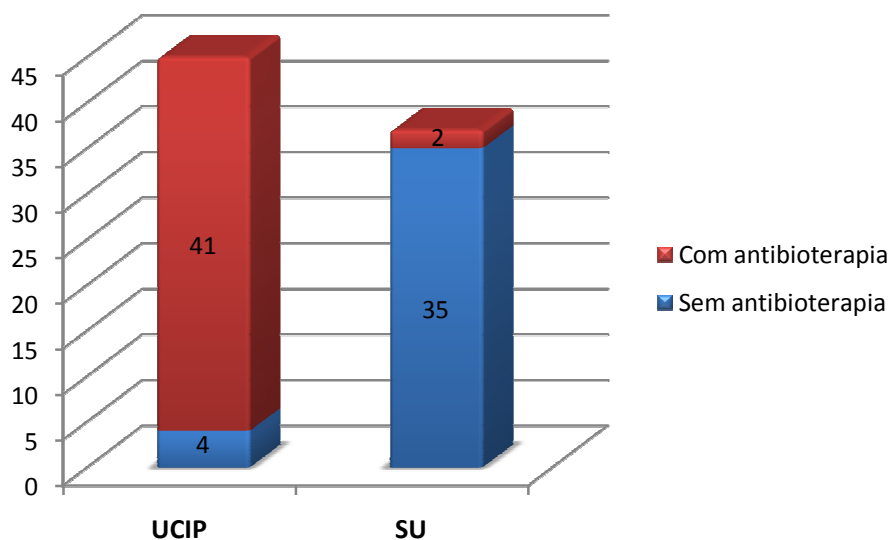


Figura 20. Antibioterapia instituída previamente à colheita, por serviço.

4.1.1 Comparação entre SeptiFast e Hemocultura

Os resultados obtidos com o SeptiFast Test comparados com os resultados das respectivas hemoculturas encontram-se na tabela 11.

Tabela 11. Resultados obtido por SeptiFast comparados com a Hemocultura

	Hemocultura		Total
	+	-	
SeptiFast +	9 (a)	8 (b)	17
SeptiFast -	8 (c)	57 (d)	65
Total	17	65	82

(a)-Verdadeiros Positivos (b)-Falsos Positivos (c)-Falsos Negativos (d)- Verdadeiros Negativos

Sensibilidade = $[a/(a+c)] = 9/(9+8) = 53\%$

Especificidade = $[d/(b+d)] = 57/(8+57) = 88\%$

VPP = $[a/(a+b)] = 9/(9+8) = 53\%$

VPN = $[d/(c+d)] = 57/(8+57) = 88\%$

Ao estudar os resultados por serviço de proveniência, não foram encontradas diferenças significativas, como pode ser observado na tabela 12

Tabela 12. Resultados comparativos entre *SeptiFast* e Hemocultura por serviço

	UCIP		SU		Total
	H +	H -	H +	H -	
SeptiFast +	5	3	4	5	17
SeptiFast -	4	33	4	24	65
Total	9	36	8	29	82

H - Hemocultura

Das 9 amostras que apresentaram resultados positivos por ambas as metodologias, verificou-se uma concordância total entre a identificação obtida por *SeptiFast* e a identificação clássica das estirpes isoladas na hemocultura: *E. coli* em 2 casos, *S. aureus* em 4 amostras, uma *P. aeruginosa*, numa das amostras foram identificados dois agentes (*K. pneumoniae* (fig. 21) e *A. fumigatus* (fig. 22)). Num dos casos, a partir da hemocultura foi identificado um *Staphylococcus haemolyticus*, que por *SeptiFast* foi identificado como um *Staphylococcus* Coagulase Negativo.

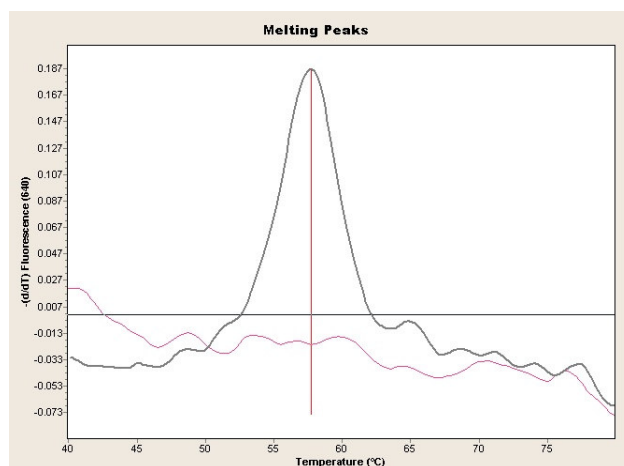


Figura 21. *Klebsiella pneumoniae* Ch 640; TM 57,8°C

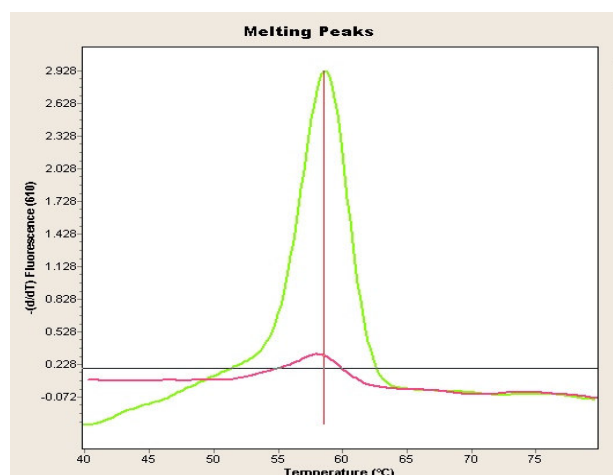


Figura 22. *Aspergillus fumigatus* Ch610; Tm 58°C

Da análise dos resultados obtidos encontraram-se 57 amostras concordantemente negativas pelos dois métodos. Com base nestes resultados, quando comparado com o exame cultural, o SeptiFast apresenta uma sensibilidade de 53%, especificidade de 88%, valor preditivo positivo (VPP) de 53% e valor preditivo negativo (VPN) de 88% (Tabela 11).

4.1.2 Resultados discordantes

4.1.2.1 *SeptiFast* Negativo – Hemocultura Positiva

Analisando os resultados discordantes, em 8 amostras houve detecção de microrganismos por hemocultura, sem amplificação por PCR. Estes casos estão descritos detalhadamente na tabela 13.

A discrepância nas datas de colheita destas 8 amostras, corresponde ao início do estudo, em que a colheita de amostra para SeptiFast foi efectuada 48-72h após a colheita de hemocultura, e estas amostras estão descritas na tabela 13, correspondendo aos casos 3 a 11.

Tabela 13. Resultados negativos por SeptiFast com isolamento cultural (hemocultura positiva)

Id.	Serviço	Antibioterapia	SeptiFast	Hemocultura	Observações
3	UCIP	Ciprofloxacina	NEG	<i>E. cloacae</i>	Apenas 1 hemoc. positiva Discrepância na data de colheita
4	SU	NC ¹	NEG	<i>E. coli</i>	Sinal específico fraco Discrepância na data de colheita
7	UCIP	Meropenem	NEG	<i>Ps. aeruginosa</i>	Sinal específico fraco Discrepância na data de colheita
8	UCIP	AMC ²	NEG	<i>E. coli</i>	Discrepância na data de colheita
10	SU	NC ¹	NEG	<i>S. aureus</i>	Discrepância na data de colheita
11	UCIP	Linezolid	NEG	<i>E. cloacae</i>	Apenas 1 hemoc. positiva
55	SU	NC ¹	NEG	<i>E. coli</i>	Sinal específico fraco
58	SU	NC ¹	NEG	<i>Ps. aeruginosa</i>	Sem CF ³ em Gram negativo

¹Nao Consta ²Amoxicilina/Ac. Clavulâmico ³Controlo Interno

Sendo o resultado positivo determinado por um pico de dissociação que atravessa uma linha de base pré definida, é possível observar na figura 23 o gráfico correspondente ao canal 670 para o controlo negativo (a vermelho), uma amostra positiva para *E. coli* (T_m 50.7°C a cinzento) e a amostra 4 a azul, com T_m específica de *E. coli*, mas ligeiramente abaixo da linha de base pré definida (0.236, com 0.230 para a amostra 4). O mesmo ocorreu na amostra 55, com T_m de 50.4°C (gráfico não apresentado). Na figura 24 uma situação semelhante para a amostra 7, desta vez com T_m de 57,5°C no canal 670, com valor de fluorescência de 0.193 para um valor de base de 0.236.

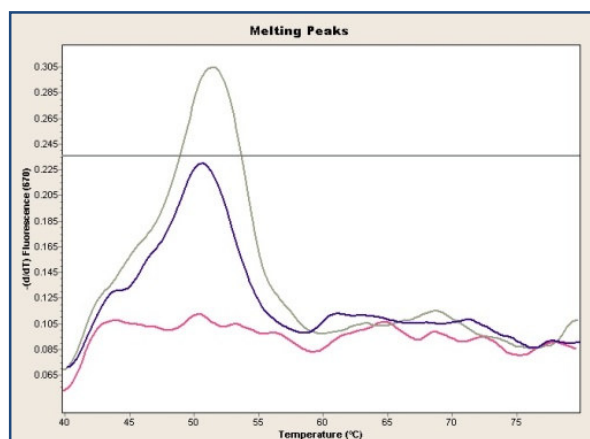


Figura 23. Amostra 4 CH 670 T_m 50.7°C, pico azul, ligeiramente abaixo da linha de base.

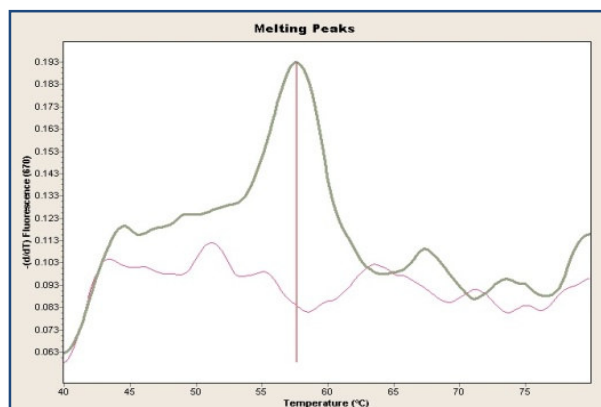


Figura 24. Amostra 7, CH 670 T_m 57.5°C, pico cinzento, ligeiramente abaixo da linha de base.

Na amostra 58, apesar de haver amplificação do CI para gram-positivos e fungos, não foi observado sinal de CI na PCR de gram negativos, o que sugere que apesar da extracção de ácidos nucleicos ter sido bem sucedida (amplificação CI para gram positivos e fungos), poderá ter ocorrido inibição da amplificação do CI por excesso de DNA bacteriano. Relativamente às amostras 3 e 11 é ainda de assinalar que em quatro hemoculturas colhidas com diferença de dois dias, apenas houve crescimento bacteriano numa das colheitas.

4.1.2.2 *SeptiFast* Positivo – Hemocultura Negativa

Em 8 amostras houve detecção de microrganismos por PCR, no entanto as hemoculturas permaneceram estéreis até ao final do período de incubação. Estes casos estão descritos detalhadamente na tabela 14.

Em três pacientes (9, 28 e 54) com hemocultura negativa, o mesmo microrganismo identificado no sangue por *SeptiFast* foi isolado em outros produtos biológicos colhidos a estes pacientes na mesma altura. Relativamente aos pacientes 16, 46 e 79, não foram isolados ou detectados quaisquer microrganismos pelos métodos convencionais, no entanto apresentaram resposta positiva à terapêutica instituída.

Tabela 14. Resultados discordantes: SeptiFast positivo – Hemocultura negativa

Id.	Serviço	Antibioterapia	SeptiFast	Hemoc.	Observações
9	UCIP	Imipenem	<i>Kl. pneumoniae</i>	NEG	<i>K. pneumoniae</i> isolada na urina
15	UCIP	Meropenem	<i>E. cloacae/aerogenes</i>	NEG	Paciente faleceu em choque séptico
16	SU	NC ¹	<i>S. aureus</i>	NEG	Confirmação clínica da infecção com resposta à antibioterapia
28	UCIP	Meropenem	<i>S. aureus</i> / <i>K. pneumoniae</i>	NEG	<i>S. aureus</i> na expectoração
46	SU	NC ¹	<i>E. cloacae/aerogenes</i>	NEG	Doente pós cirúrgico, recorreu ao SU com febre, foi internado e respondeu à antibioterapia
54	SU	NC ¹	<i>E. cloacae/aerogenes</i> <i>C. tropicalis</i>	NEG	Isolados <i>E. cloacae</i> e <i>C. tropicalis</i> na urina.
77	SU	NC ¹	<i>S. pneumoniae</i>	NEG	Doente teve alta clínica do SU. Sem informações adicionais relevantes.
79	SU	NC ¹	<i>S. aureus</i>	NEG	Doente recorreu ao SU com febre, foi internado e respondeu à antibioterapia

¹Não Consta

A amostra 16 corresponde a um paciente que faleceu em choque séptico dois dias após internamento na UCIP na sequência de ruptura abdominal, situação clínica que é compatível com o agente detectado, não havendo registo de análises microbiológicas complementares. Na amostra 77 foi detectada uma espécie *Streptococcus pneumoniae*, sem registo de internamento hospitalar e sem análises microbiológicas complementares, não sendo possível confirmar este resultado.

Considerando que apenas um dos casos não teve confirmação, quer clínica, quer analítica (amostra 77), em sete pacientes o resultado obtido por PCR pode ser considerado como verdadeiro positivo. Assim, os resultados obtidos por SeptiFast, quando comparados com o resultado da Hemocultura e a evidência clínica (designado por – Infecção confirmada) podem ser apresentados de acordo com a tabela 15.

Tabela 15. Resultados obtidos por *SeptiFast* relativamente à infecção confirmada

	Infecção confirmada	Infecção não confirmada	Total
SeptiFast +	16 (a)	1 (b)	17
SeptiFast –	8 (c)	57 (d)	65
Total	24	58	82

(a)-Verdadeiros Positivos (b)-Falsos Positivos (c)-Falsos Negativos (d)- Verdadeiros Negativos

Sensibilidade = $[a/(a+c)] = 16/(16+88) = 67\%$

Especificidade = $[d/(b+d)] = 57/(1+57) = 98\%$

VPP = $[a/(a+b)] = 16/(16+1) = 94\%$

VPN = $[d/(c+d)] = 57/(8+57) = 88\%$

Se for aplicado o mesmo critério para a avaliação do resultado da hemocultura (Infecção confirmada por *SeptiFast*), os resultados dos dois métodos podem ser comparados como descrito na tabela 16.

Tabela 16. Comparação dos dois métodos relativamente à confirmação da infecção

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
<i>SeptiFast</i> Test	67%	98%	94%	88%
Hemocultura	68%	100%	100%	88%

VPP – Valor preditivo positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

Considerando os resultados globais, obtidos pelos dois métodos, detectaram-se 25 amostras positivas, 30,4% da totalidade das amostras estudadas.

4.1.3 Microrganismos detectados

Na figura 25 é possível observar os diferentes tipos de microrganismos detectados pelos dois métodos. A detecção de bactérias gram positivo foi ligeiramente superior com o SeptiFast, sendo a hemocultura ligeiramente superior na recuperação de bactérias gram negativo.

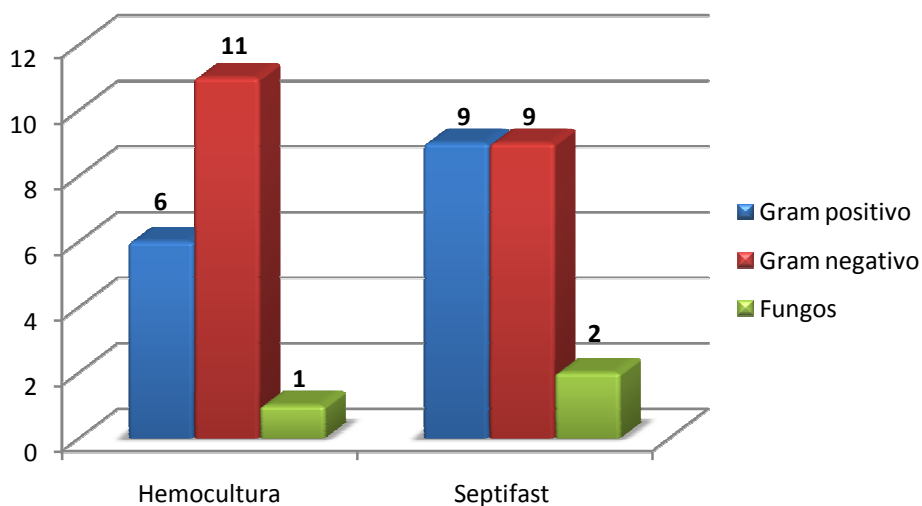


Figura 25. Tipo de microrganismos detectados por hemocultura e SeptiFast

Na figura 26 estão representados os microrganismos detectados por método, destacando-se *S. aureus* quando detectado por SeptiFast, e *E. coli* quando detectada por hemocultura.

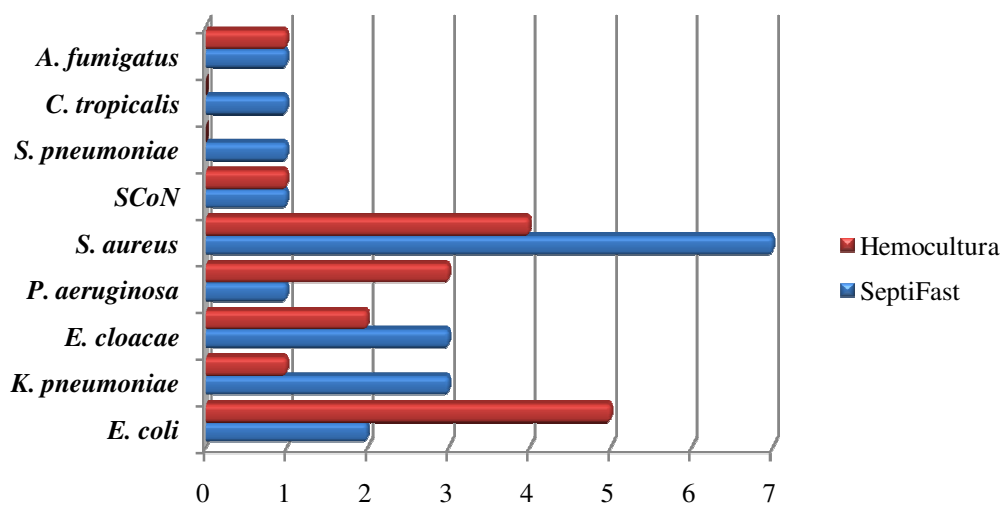


Figura 26. Microrganismos detectados por hemocultura e SeptiFast

Nas amostras estudadas foram detectadas infecções mistas em 2 casos por Hemocultura e em 3 casos por SeptiFast, descritas na tabela 17.

Tabela 17. Infecções mistas detectadas por SeptiFast e Hemocultura

Identificação	SeptiFast	Hemocultura
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Citrobacter freundii</i>
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Aspergillus spp</i>
28	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
54	<i>E. cloacae/aerogenes</i> <i>Candida tropicalis</i>	-

4.1.4 Tempo de resposta laboratorial

O tempo médio que demorou até positividade da hemocultura foi de 20 horas (min 6.8 e máx. 89 horas), com tempo médio de positividade para gram positivos de 30 horas e gram negativos de 15 horas. O tempo de execução SeptiFast até obtenção da identificação foi de 6-7 horas.

4.2 Optimização da PCR em tempo real para amplificação de 370bp do gene 16S rRNA

Tendo por base um protocolo previamente ensaiado, tentou-se a sua optimização no sentido de melhorar a sensibilidade do mesmo. Assim foi testada uma nova enzima - AmpliTaq Gold DNA Polymerase LD, com as diferentes estirpes bacterianas. Os resultados da comparação entre as duas enzimas estão descritos na tabela 18. Além de não haver melhoria significativa de sensibilidade, houve amplificação dos controlos negativos com a nova enzima.

Tabela 18. Resultados comparativos entre diferentes enzimas obtidos na PCR em tempo real

Estirpe	EXT DNA Pol		AmpliTaq Gold DNA Pol LD	
	FAM C_T	bp	FAM C_T	bp
Branco	-	-	36.65	370
25922	18.74	370	18.79	370
25923	17.27	370	-	370
27853	20.64	370	22.45	370
49616	18.99	370	19.22	370

C_T – Cycle threshold bp – pares de bases

Para confirmar os resultados obtidos, repetiu-se o ensaio mas desta vez com diluições seriadas da estirpe ATCC 25923 (resultados não apresentados), confirmando-se a sensibilidade equivalente, com amplificação do controlo negativo no ciclo 33 da reacção com a enzima AmpliTaq Gold LD. Nas amostras mais diluídas não se observou amplificação. Os restantes reagentes utilizados foram testados separadamente, sem se verificar qualquer contaminação, eliminando-se a possibilidade de contaminação por parte destes reagentes. A ocorrência de sinal positivo sem presenç a de DNA bacteriano levou ao abandono desta enzima, optando-se por continuar a optimização com a EXT DNA Polymerase, cujos resultados sugeriram maior grau de pureza.

Testou-se o efeito do aumento do volume de DNA na reacção, usando 5µl e 10µl de DNA. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 19.

Tabela 19. Comparação entre volumes de DNA

Estirpe	5µl de DNA		10µl de DNA	
	FAM C_T	bp	FAM C_T	bp
Branco	-	-	-	-
25923 10 ⁻²	29.70	370	25.71	370
25923 10 ⁻³	31.83	370	-	370
25923 10 ⁻⁴	-	-	-	-

C_T – Cycle threshold bp – pares de bases

Com o dobro do volume de DNA foi notória a diminuição do valor de C_T para a diluição 10⁻². Apesar da diluição 10⁻³ não apresentar sinal de fluorescência, a presença de um fragmento específico de 370 bp levou à continuação da optimização da reacção com 10µl de DNA.

A variação da concentração de *primers* e MgCl₂ não introduziu melhorias na sensibilidade da técnica (resultados não apresentados), verificando-se que as quantidades inicialmente usadas ([MgCl₂]=2.5mM e [*primers*]=1.0µM) ofereciam melhores resultados também com 10µl de DNA.

Na necessidade de melhorar o sinal de fluorescência, testaram-se diferentes concentrações de sonda Taqman RDR245 – 0.3µM, 0.4µM e 0.5µM. Os resultados mostraram que a concentração de 0.5µM resultou em valores de C_T mais baixos, ou seja, no aumento da sensibilidade da técnica.

Finalmente, o protocolo optimizado foi testado em paralelo com o protocolo inicial, para diluições de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), observando-se aumento da intensidade de fluorescência, bem como a capacidade de detectar mais uma diluição em *Escherichia coli* (Figura 27 e tabela 20).

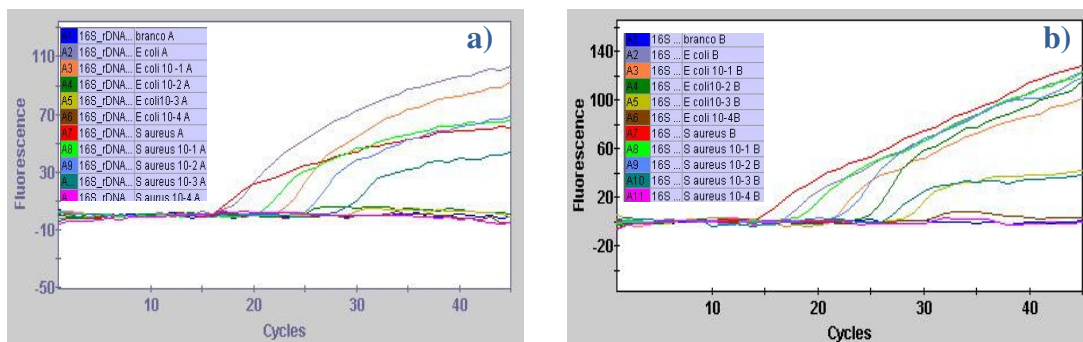


Figura 27. Curvas de amplificação do DNA de *S. aureus* e *E. coli* diluídos seriadamente resultantes da aplicação dos protocolos inicial (a) e otimizado (b).

Tabela 20. Resultados comparativos entre o protocolo inicial e o protocolo otimizado, aplicados a diluições seriadas de DNA de *S. aureus* e *E. coli*.

Amostras	5µL de DNA [Sonda] =0.3µM		10µL de DNA [Sonda] =0.5µM	
	C_T	bp	C_T	bp
Branco	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	17.14	370	17.63	370
<i>E. coli</i> 10 ⁻¹	22.88	370	22.13	370
<i>E. coli</i> 10 ⁻²	25.71	370	25.27	370
<i>E. coli</i> 10 ⁻³	30.62	370	29.10	370
<i>E. coli</i> 10 ⁻⁴	0.00	0	32.67	370
<i>S. aureus</i>	16.73	370	15.33	370
<i>S. aureus</i> 10 ⁻¹	20.98	370	18.96	370
<i>S. aureus</i> 10 ⁻²	25.32	370	22.59	370
<i>S. aureus</i> 10 ⁻³	28.52	370	27.38	370
<i>S. aureus</i> 10 ⁻⁴	0.00	0	0.00	0

C_T – cycle threshold bp – pares de bases

4.3 Sequenciação Bacteriana MicroSeq 500 16S rRNA

As sequências obtidas a partir dos isolados bacterianos foram identificadas de acordo com os resultados indicados na tabela 21.

Nas 54 estirpes estudadas, foi possível chegar a uma identificação conclusiva ao nível da espécie, com pelo menos 99% de identidade entre as sequências obtidas e as sequências presentes na base de dados, em 47 casos. Nas restantes 7 amostras, não foi possível a distinção conclusiva a este nível.

No isolado identificado como *Acinetobacter* spp, apenas ocorreu diferença inferior a 1% para identificação do género. Ao nível da espécie a diferença não permitia a identificação. Na identificação dos dois casos de *Brucella* spp, com homologia de 100% na sequência de 439 e 435 bases, encontravam-se as espécies *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. cetaceae* e *B. pinnipediae*, pelo que a distinção inter-espécie não foi possível. O mesmo ocorreu entre as sequências de *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, com 99% de homologia, bem como entre as sequências de *Lactobacillus paracasei* e *L. casei*, com 100% de homologia em 430 bases. Entre *Lactobacillus ramnosus* e *L. casei* 100% de homologia em 525 bases e finalmente 100% de homologia entre 480 bases não permitiram diferenciar as espécies *Mycobacterium abscessus* de *M. chelonae*.

Quando a elevada homologia ocorreu entre duas espécies, optou-se por indicar as espécies envolvidas, o que permitiu por vezes a diferenciação por métodos fenotípicos. Quando mais do que duas espécies correspondiam ao mesmo perfil, a identificação foi reportada apenas ao nível do género.

A estirpe identificada como *Streptococcus suis* foi isolada no laboratório de Microbiologia a partir de uma amostra de líquido cefalorraquidiano de um paciente com suspeita de meningite bacteriana, que tinha participado numa matança de porco. Após sequenciação do isolado clínico, existindo ainda amostra biológica suficiente, esta foi testada segundo procedimento descrito para os isolados bacterianos, e foi possível obter a mesma identificação, quer a partir do isolado clínico, quer do LCR.

Tabela 21. Resultados da sequenciação usando MicroSeq 500

Identificação	Origem	Características	Quantidade
<i>Acinetobacter spp</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram – NF	1
<i>Actinomyces funkeii</i>	Isolado Clínico	Anaeróbio	1
<i>Actinomyces israelii</i>	NEQAS	Anaeróbio	1
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Isolado Clínico	Anaeróbio	1
<i>Actinomyces turicensis</i>	Isolado Clínico	Anaeróbio	1
<i>Bacillus cereus</i>	NEQAS	Bacilo Gram +	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	1
<i>Brevibacterium sanguinis</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	1
<i>Brucella spp</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram - Fastidioso	2
<i>Campylobacter curvus</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram - Fastidioso	2
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	NEQAS	Bacilo Gram - Fastidioso	1
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	NEQAS	Bacilo Gram - Fastidioso	1
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram - Fastidioso	1
<i>Corynebacterium afermentans</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	NEQAS	Bacilo Gram +	1
<i>Corynebacterium macinleyi</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	1
<i>Corynebacterium striatum</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	2
<i>Corynebacterium xerosis</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	1
<i>Eikenella corrodens</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram - Fastidioso	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	Isolado Clínico	Coco Gram +	1
<i>Enterococcus faecium</i>	Isolado Clínico	Coco Gram +	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Isolado Clínico	Cocobacilo Gram -	1
<i>Haemophilus segnis</i>	Isolado Clínico	Cocobacilo Gram -	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	1
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	NEQAS	Bacilo Gram +	1
<i>Lactobacillus rhamnosus/casei</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	1
<i>Microbacterium oxydans</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	1
<i>Mycobacterium abscessus/chelonae</i>	Isolado Clínico	Micobactéria	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NEQAS	Coco Gram -	1
<i>Neisseria mucosa</i>	Isolado Clínico	Coco Gram -	1
<i>Nocardia asteroides</i>	NEQAS	Bacilo Gram +	2
<i>Nocardia asteroides</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	1
<i>Nocardia farcinica</i>	Isolado Clínico	Bacilo Gram +	3
<i>Propionibacterium propionicum</i>	Isolado Clínico	Anaeróbio	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolado Clínico	Coco Gram +	1
<i>Streptococcus constellatus</i>	Isolado Clínico	Strep. Viridans	2
<i>Streptococcus mitis</i>	Isolado Clínico	Strep. Viridans	4
<i>Streptococcus oralis</i>	NEQAS	Strep. Viridans	1
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Isolado Clínico	Strep. Viridans	1
<i>Streptococcus salivarius</i>	Isolado Clínico	Strep. Viridans	1
<i>Streptococcus suis</i>	Isolado Clínico	Coco Gram +	1
<i>Streptococcus suis</i>	LCR	Coco Gram +	1
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	Isolado Clínico	Anaeróbio	1

54

NF – Não fermentadores

Nos isolados com origem no programa UK-NEQAS, a identificação conseguida por sequenciação foi confirmada com o resultado do programa de controlo de qualidade. Nos isolados clínicos, a identificação obtida estava de acordo com as características fenotípicas observadas pelos métodos convencionais.

As bactérias identificadas por sequenciação estão representadas na figura 28, agrupadas de acordo com algumas características fenotípicas que as distinguem.

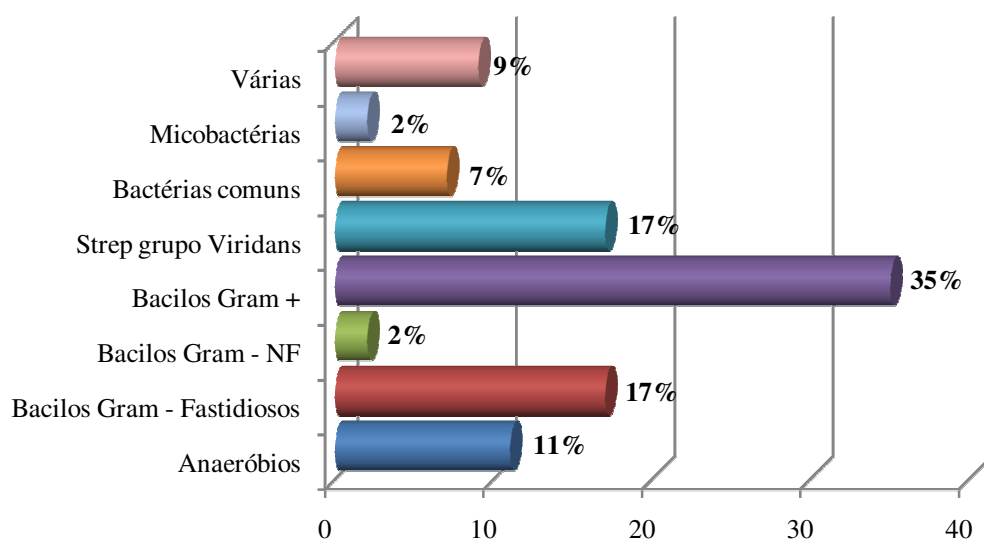


Figura 28. Bactérias identificadas por sequenciação agrupadas por categorias

Destaca-se claramente a categoria dos bacilos gram positivo representando 35% da totalidade dos organismos identificados, seguida pelos bacilos gram negativo fastidiosos e *Streptococcus* do grupo Viridans, microrganismos que são problemáticos quanto à sua identificação fenotípica.

A categoria designada por “bactérias comuns” compreende as espécies: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, normalmente identificadas sem dificuldade na rotina laboratorial. A identificação das três primeiras estirpes foi também confirmada por PCR específico, por protocolos já implementados na rotina laboratorial da Unidade de Biologia Molecular do Centro Hospitalar do Porto.

No grupo “Várias” foram agrupadas as espécies: *Haemophilus segnis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria mucosa* e *Streptococcus suis*, bactérias menos frequentes na rotina laboratorial, e cuja identificação por métodos fenotípicos pode ser problemática.

4.4 Sequenciação bacteriana de 370bp do gene 16S rRNA

Com o objectivo de avaliar a identificação rápida das espécies bacterianas detectadas por PCR em tempo real, foi realizada a sequenciação dos 370bp do gene 16S rRNA. A sequenciação dessa região foi testada em 5 isolados bacterianos previamente identificados recorrendo ao sistema MicroSeq 500 16S rDNA Microbial Identification System (Applied Biosystems) que determina os primeiros 500bp do gene 16S rRNA. Os resultados da sequenciação das duas regiões encontram-se na tabela 22.

Tabela 22. Comparação entre sequenciação com MicroSeq 500 e 370bp 16S rRNA

	MicroSeq 500	% ¹	370bp 16S rRNA	% ¹
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> / <i>L. casei</i>	100	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100
2	<i>Nocardia farcinica</i>	99	<i>Nocardia</i> spp	99
3	<i>Nocardia farcinica</i>	99	<i>Nocardia</i> spp	99
4	<i>Eikenella corrodens</i>	99	<i>Eikenella</i> spp	99
5	<i>Eikenella corrodens</i>	99	<i>Eikenella</i> spp	99

¹ Percentagem de homologia entre a sequência dos isolados e a sequência mais próxima na base de dados.

A sequenciação de uma região mais pequena e situada no fim do gene 16S rRNA, não permitiu identificar 4 dos isolados bacterianos ao nível da espécie (*Nocardia* spp e *Eikenella* spp), o que foi possível sequenciando os primeiros 500bp (MicroSeq 500). No entanto os 370bp permitiram identificar inequivocamente a estirpe de *Lactobacillus paracasei*, o que não aconteceu com o sistema MicroSeq 500. Sendo uma amostra com origem no programa de controlo externo de qualidade UK-NEQAS, o resultado foi confirmado, sendo efectivamente a espécie *L. paracasei*.

Foi então sequenciado o DNA extraído de 11 amostras de LCR previamente testadas com resultado positivo por PCR em tempo real. O resultado da sequenciação foi comparado com a identificação fenotípica obtida por métodos microbiológicos convencionais, aquando do estudo destas amostras (tabela 23)

Tabela 23. Comparação entre a identificação fenotípica e a sequenciação de 370bp do gene 16S rRNA

	Identificação fenotípica	Sequenciação 370bp 16S rRNA	%¹
1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	98
2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	98
3	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	95
4	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	98
5	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	98
6	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	98
7	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	99
8	<i>Neisseria meningitidis</i>	SI ²	-
9	<i>Neisseria meningitidis</i>	SI ²	-
10	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter</i> spp	98
11	Flora de contaminação	<i>Burkholderia</i> spp	99

¹ Percentagem de homologia entre a sequência dos isolados e a sequência mais próxima na base de dados.

² Sem identificação

Foi possível chegar a uma identificação conclusiva ao nível da espécie em sete casos, apesar da percentagem de homologia com as sequências presentes na base de dados ser na maioria dos casos inferior a 99%. Em dois casos a identificação foi conseguida apenas ao nível do género. A estirpe identificada como *Burkholderia* spp foi detectada numa amostra de LCR com flora de contaminação, mas sem identificação da mesma. Em duas amostras as sequências obtidas não encontraram correspondência com qualquer sequência da base de dados. Uma secção da sequência obtida a partir da amostra 9 pode ser observada na figura 29. A sobreposição de picos é sugestiva da

presença de mais do que uma sequência, podendo indicar contaminação da amostra. O mesmo pode ser inferido da análise da sequência da amostra 8 (imagem não apresentada). Na figura 30 é possível observar um exemplo das sequências obtidas a partir da sequenciação dos 370bp do gene 16S rRNA, sem sobreposição de picos.

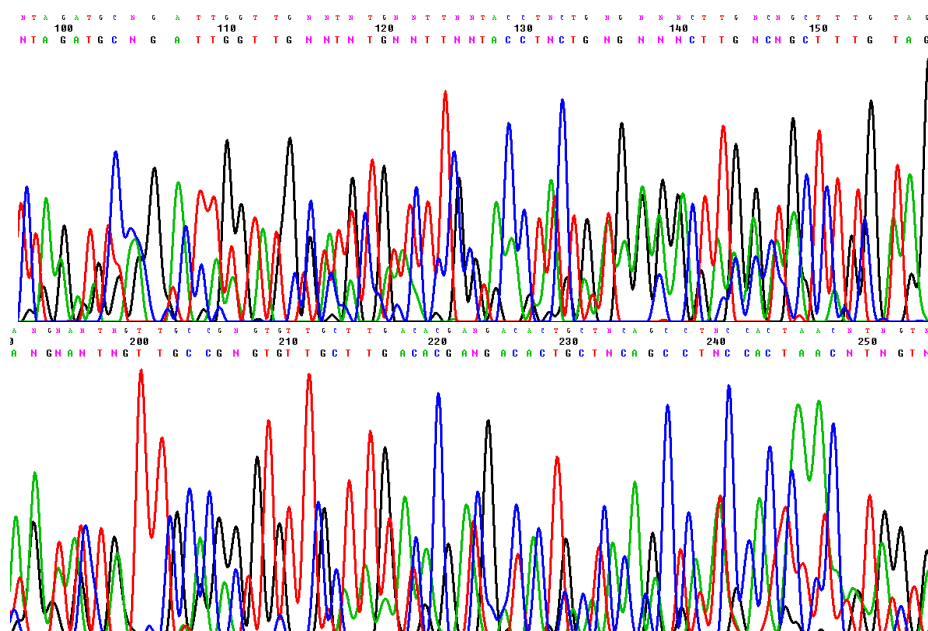


Figura 29. Secção da sequência obtida a partir da amostra 9. De referir a sobreposição de picos que impossibilita a correcta interpretação, característica da presença de sequências mistas.

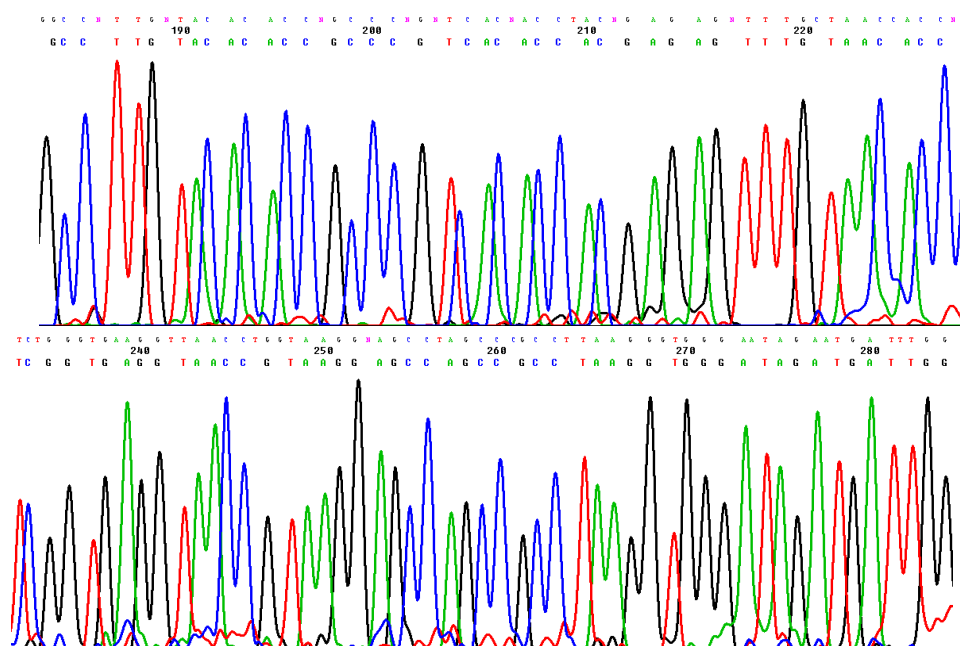


Figura 30. Exemplo das sequências obtidas por sequenciação dos 370bp do gene 16s rRNA, com resolução capaz de gerar uma boa interpretação

5. DISCUSSÃO

Um dos objectivos principais de um laboratório de microbiologia clínica consiste em estabelecer o diagnóstico etiológico de doenças infecciosas. A evolução científica e tecnológica dos últimos anos permitiu assumir a biologia molecular como uma ferramenta de extrema utilidade no diagnóstico microbiológico laboratorial. Inicialmente restrita à detecção de organismos fastidiosos e/ou de crescimento lento, ou como alternativa única a situações em que os métodos convencionais não eram capazes de responder, cada vez mais os métodos moleculares são encarados como complementares aos métodos fenotípicos em áreas crescentemente abrangentes. Neste trabalho foi estudada: a detecção e identificação molecular de microrganismos a partir de amostras biológicas; a identificação molecular de culturas bacterianas. A discussão foi assim dividida em duas partes.

5.1 Detecção e identificação molecular a partir de amostras biológicas

5.1.1 SeptiFast Test

Lançado no mercado como um teste rápido, sensível e específico, capaz de detectar 25 espécies de microrganismos, entre bactérias e fungos em cerca de 6 horas, directamente a partir de sangue, o SeptiFast Test (Roche) revelou-se um método laborioso, com um processo de extracção de ácidos nucleicos a demorar cerca de 4 horas de tempo absolutamente dedicado. De 85 amostras, 3 foram consideradas inválidas por ausência de amplificação de CI, o que poderá ter tido origem no processo de extracção, e foram retirados do estudo. Os resultados obtidos com as restantes 82 amostras estudadas, comparados com os resultados da hemocultura, revelaram uma sensibilidade de 53%, valor relativamente inferior ao esperado. A análise individual dos resultados discordantes mostrou uma falha no próprio estudo, a discrepância entre datas de colheita das hemoculturas e das amostras para estudo molecular, factor que não foi possível controlar no início do estudo.

Em alguns dos casos discordantes, com crescimento cultural, mas com resultado molecular negativo, observou-se presença de picos de dissociação com *T_m* específico da

espécie isolada culturalmente, ligeiramente abaixo da linha de base, o que sugere que o DNA bacteriano estava presente, mas em concentrações muito baixas.

Um dos grandes desafios actuais na biologia molecular aplicada ao diagnóstico prende-se com a necessidade de standardização de métodos e resultados. Ao pré definir valores de corte (quer para linhas de base, quer para intervalos de temperaturas de dissociação), premissa da designação IVD, pretende-se obviamente minimizar os erros inerentes à subjectividade da interpretação humana. No entanto o uso de sondas de hibridação FRET, cujas características potenciam, a níveis elevadíssimos, a especificidade do sinal positivo, talvez justifique uma maior flexibilidade na definição da linha de base. Sabe-se que são frequentes contaminações, no momento da colheita de sangue, com a flora comensal da pele, o que pode originar um sinal positivo sem significado clínico, assim como são bem conhecidos os organismos normalmente responsáveis por estas contaminações (*Staphylococcus coagulase negativa*) e estes casos estão salvaguardados pelo sistema *SeptiFast*. Os problemas encontrados ocorreram em bactérias gram-negativo (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Em três casos ficou a certeza de um resultado positivo observado visualmente, mas com interpretação negativa por parte do *software* SIS.

Há ainda que ter em conta a sensibilidade do teste. Segundo dados do fabricante o *SeptiFast* Test é capaz de detectar até 30 UFC/ml de sangue para todos os organismos excepto *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes* e *S. mitis*, casos em que apenas é capaz de detectar até 100 UFC/ml de sangue. A sensibilidade da hemocultura é limitada para microrganismos de crescimento lento e/ou fastidiosos (Socan et al, 1999; Zeaiter et al, 2003), tais como *Legionella pneumophilla* ou *Bartonella* spp., e está severamente comprometida quando a colheita é efectuada após instituição de terapia antimicrobiana (Glerant et al, 1999; McKenzie & Reimer, 1987), mas além destes casos é superior à sensibilidade do *SeptiFast*. Isto pode justificar quer os sinais específicos fracos considerados negativos (3 casos), quer a incapacidade de detectar DNA microbiano em dois pacientes em cujas quatro hemoculturas colhidas apenas numa houve crescimento, indicando um número baixo de organismos em circulação, podendo estar abaixo do limiar de detecção do teste molecular. A intermitência da presença bacteriana em circulação pode explicar os casos em que não se detectou DNA microbiano quando a colheita para estudo molecular foi posterior à colheita de hemocultura. Por fim, numa amostra com isolamento de *P. aeruginosa* a

partir da hemocultura, não houve amplificação do CI na reacção de gram-negativos. A presença de CI para as restantes reacções de PCR da mesma amostra, usando o mesmo DNA sugere que a extracção de ácidos nucleicos foi eficiente. No entanto pode ter ocorrido inibição da reacção de PCR por excesso de DNA bacteriano. Isto justificaria a ausência de amplificação quer do CI, quer do alvo. Na tentativa de esclarecer este resultado, o DNA foi diluído e tentou-se a repetição do ensaio apenas para a PCR de gram-negativos. O *software* SIS apenas contempla a análise do conjunto das três reacções de PCR, impossibilitando a análise automática dos resultados, mas a análise manual não mostrou sinal positivo para qualquer dos alvos ou controlo interno, resultado sugestivo de inibição.

Houve também situações em que o *SeptiFast* foi capaz de detectar DNA microbiano, mas não houve recuperação de microrganismos em cultura. Em sete dos oito casos o isolamento por métodos convencionais das mesmas espécies detectadas por *SeptiFast*, a partir de locais anatómicos clinicamente relevantes, ou a confirmação clínica da infecção com resposta à terapêutica, sugerem que de facto estaríamos na presença de verdadeiros positivos. A administração empírica de antibioterapia antes da colheita poderia justificar estes resultados, no entanto apenas nos três casos provenientes da UCIP havia registo acerca da mesma. Nos registos dos pacientes provenientes do SU não havia indicação de antibioterapia, no entanto em pelo menos três casos havia internamento prévio recente, podendo nessa altura ter havido terapia antimicrobiana, permanecendo o efeito inibitório do crescimento cultural. Um caso não foi possível confirmar: a detecção de *Streptococcus pneumoniae* num paciente sem mais estudos laboratoriais microbiológicos e sem história clínica relevante. Mas não deixa de ser curioso que o resultado revele precisamente uma das bactérias que pode ser mais problemáticas de recuperar em cultura. Vários estudos mostraram uma detecção eficaz de *S. pneumoniae* por PCR directamente a partir do sangue, em pacientes com história sugestiva, evidência radiológica de pneumonia, tratamento com antibióticos, mas cujas hemoculturas permaneceram negativas (Lorente et al, 2000; Wheeler et al, 2000; Zhang et al, 1995). Contudo um outro factor pode interferir na detecção molecular desta espécie; foi detectado DNA de *S. pneumoniae* por PCR, no sangue de 30% das crianças saudáveis com colonização *S. pneumoniae* na nasofarínge (Dagan et al, 1998; Isaacman et al, 1998). Uma vez que este tipo de colonização diminui com a idade e o paciente em

causa era adulto, isto pode não explicar o resultado positivo, tendo por isso sido considerado como um falso positivo.

Por definição, não é possível mostrar que um novo teste de diagnóstico é melhor que o método de referência, no caso a hemocultura (Peters et al, 2004), no entanto comparando os dois métodos com base na evidência de infecção, observam-se valores de sensibilidade semelhantes para *SeptiFast* Test (67%) e hemocultura (68%), sendo o último o método mais específico e com valor preditivo positivo superior. Destaca-se também o considerável valor preditivo negativo (VPN) que foi nos dois casos de 88%. Aqui existe uma diferença de relevo. No caso da hemocultura, são inúmeros os microrganismos que é possível detectar, virtualmente todas as bactérias e fungos cultiváveis. O *SeptiFast* Test está restrito a 25 espécies. Ou seja, o VPN do *SeptiFast* aplica-se a um universo de microrganismos bem mais restrito que o da hemocultura, ainda que represente cerca de 90% dos agentes responsáveis por sépsis (Ziegler et al, 1998). Sendo assim, um resultado negativo obtido pelo *SeptiFast* Test, não exclui a possibilidade, não só de existirem microrganismos em quantidade inferior ao limiar de detecção do método (como, aliás, acontece com qualquer metodologia), mas também de existir infecção por um agente que não faz parte da lista de 25 espécies detectadas por este método, sendo de referir que desta lista não faz parte a *Neisseria meningitidis*, um patógeno importante.

No entanto um dos objectivos principais da aplicação de um teste molecular como o *SeptiFast* é sem dúvida conseguir um resultado em tempo clinicamente útil. Os conceitos da “*golden hour*” e “*silver day*” tradicionalmente aplicados aos pacientes traumáticos (Bledsoe, 2002; Blow et al, 1999) foram adaptados às situações clínicas de sépsis grave e choque séptico. O diagnóstico precoce e a intervenção terapêutica eficaz, traduzem-se num prognóstico mais favorável para o paciente (Blow et al, 1999). A transição de sépsis para choque séptico ocorre mais frequentemente durante as primeiras 24 horas de internamento hospitalar, o que se reflecte não só na taxa de morbilidade, mas também na taxa de mortalidade associada: 20 a 46% (Balk, 2000; Rivers et al, 2001). Está também estabelecida a relação positiva entre a administração precoce de terapia antimicrobiana específica e a diminuição das taxas de mortalidade e morbilidade em UCIs (Houck & Bratzler, 2005; Kollef et al, 1999). A administração de antibioterapia correcta entre 4 a 8 horas da hospitalização reduz significativamente a mortalidade (Houck et al, 2004; Meehan et al, 1997). A primeira informação disponível

a partir de uma hemocultura positiva é o exame directo com coloração por Gram que no presente estudo demorou em média 20 horas, com uma média de 30 horas para bactérias gram-positivo. A esta primeira informação será necessário acrescentar o tempo para isolamento e identificação do agente, o que por norma ocorre cerca de dois dias após a colheita. É possível obter uma identificação objectiva do organismo responsável usando o *SeptiFast* Test em 6 horas e a partir desta informação proceder ao início ou ajuste da terapia antimicrobiana. Mesmo na impossibilidade de completar o teste num dia normal de trabalho, há a capacidade de ter o resultado disponível na manhã seguinte à colheita. A identificação do agente causal e o conhecimento dos padrões de susceptibilidade usuais nas enfermarias onde eles são isolados permitem adequar a terapia antimicrobiana de uma forma mais eficaz do que tendo por base apenas o resultado do Gram.

Este estudo focou dois serviços do Centro Hospitalar do Porto - Hospital Geral de Santo António: UCIP e SU. Os dados mais significativos vieram corroborar o esperado, a administração maciça de antibioterapia aos pacientes internados na UCIP (91%). No entanto este factor não pareceu influenciar os resultados, uma vez que o *SeptiFast* teve um desempenho apenas ligeiramente superior no SU, serviço onde o registo da instituição de antibioterapia era francamente inferior (5%). Como já referido, no entanto, a história clínica destes pacientes não permite excluir a possibilidade de antibioterapia antes da admissão ao SU (internamentos prévios) o que justificaria os resultados.

Quanto ao tipo de microrganismos detectados, o desempenho dos dois métodos, já discutido, explica as diferenças entre o tipo de organismos detectados, no entanto os resultados sugerem uma menor eficiência na detecção de bactérias gram-negativo por parte do *SeptiFast*, quer seja por menor sensibilidade, quer por possível inibição por excesso de DNA. Na fase final deste trabalho a empresa que comercializa o teste *SeptiFast* (Roche) alterou o protocolo de extracção recomendado, reduzindo o volume de amostra testada para metade, reflexo de problemas de inibição da amplificação do CI observados na PCR de gram-negativos, por excesso de DNA (informação do fabricante).

Os resultados estão de acordo com o descrito, destacando-se as bactérias gram-negativo, principalmente enterobactereáceas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae*) e *S. aureus*, como os organismos mais frequentemente detectados.

Por fim uma referência ao custo do sistema SeptiFast. Sendo bastante dispendioso, a sua utilização obriga à selecção criteriosa dos casos onde este teste apresenta mais vantagens custo-benefício, ou seja, nos casos em que a informação obtida por este método pode significar uma mais valia para o paciente e para a rentabilização de recursos hospitalares. Para tal, será necessário alargar o estudo, com uma colaboração clínica activa, tanto na selecção de pacientes, como na interpretação dos resultados.

5.1.2 Detecção e sequenciação de 370bp do gene 16S rRNA

A detecção de bactérias por PCR universal foi experimentada na Unidade de Biologia Molecular em 2001 para aplicação a amostras de LCR. Na altura foi optimizado um protocolo de PCR em tempo real que conseguiu detectar até 160 UFC/ml de LCR, no entanto sem identificação do agente causal. A recuperação deste protocolo teve por finalidade usar a tecnologia agora disponível para tentar melhorar a sensibilidade do método, aplicá-lo a amostras de sangue e identificar as amostras positivas por sequenciação.

O grande desafio da amplificação de regiões bacterianas conservadas, é conseguir uma sensibilidade óptima sem amplificar DNA contaminante de origem exógena. A experiência anterior com este protocolo permitiu prever e evitar os principais focos de contaminações, o que foi conseguido com sucesso. No entanto uma das fontes recorrentes de contaminação reside nas polimerases usada na PCR (Carroll et al, 1999; Koponen et al, 2002; Lu et al, 2000; Nadkarni et al, 2002). A enzima AmpliTaq Gold DNA Polymerase LD, altamente purificada para evitar contaminações, não apresentou qualquer vantagem, uma vez que originava amplificação dos controlos negativos. Contaminações com esta enzima foram já descritas por outros autores (Koponen et al, 2002). Com a enzima EXT DNA Polymerase, aumentando o volume de DNA na

reação para o dobro e otimizando a concentração da sonda, foi possível melhorar a sensibilidade da PCR em tempo real em cerca de um logaritmo. O passo seguinte deveria ter sido a aplicação deste protocolo às amostras de sangue estudadas pelo sistema SeptiFast, no entanto a validade de um protocolo deste género depende da capacidade de identificar o produto amplificado. Os *primers* universais da PCR em tempo real otimizada (Greisen et al, 1994) foram usados na sequenciação de bactérias previamente identificadas, para avaliar o desempenho do método, bem como em DNA extraído a partir de amostras de LCR testados em 2001, com resultado positivo. Os resultados obtidos permitiram identificar a maioria das bactérias ao nível do género, no entanto não foram tão conclusivas ao nível da espécie. A região sequenciada, localizada na parte final do gene 16S rRNA (*primer forward* RW01: 1170-1189; *primer reverse* DG74: 1522-1540 em *E. coli*) não permite a correcta diferenciação, por exemplo, entre espécies de *Staphylococcus* (Jordan et al, 2006). Um estudo recente analisou as nove regiões hiper-variáveis do gene 16S rRNA, designadas V1 a V9 (Chakravorty et al, 2007). Estas regiões compreendem os nucleótidos V1: 69-99, V2: 137-242, V3: 433-497, V4: 576-682, V5: 822-879, V6: 986-1043, V7: 1117-1173, V8: 1243-1294 e V9: 1435-1465, previamente descritos (Van de Peer et al, 1996). A cada região está associada uma maior capacidade de discriminação entre determinadas espécies, excepto para as regiões V4, V5, V7 e V8, estas duas últimas abrangidas pelos *primers* RW01 e DG74 usados na PCR em tempo real. A sequenciação dos 370bp do gene 16S rRNA foi aplicada a poucas amostras, e a maioria das identificações obtidas correspondia sem surpresa a *Neisseria meningitidis*, um dos principais agentes da meningite bacteriana, resultados que confirmaram o isolamento por métodos convencionais. Não existem *primers* verdadeiramente “universais”, uma vez que não há garantias da amplificação de todos os procariontes, nem será simples conseguir discriminar entre todas as espécies possíveis (Baker et al, 2003), no entanto será necessário averiguar a capacidade discriminatória destes *primers* em mais espécies bacterianas.

A análise destas sequências revelou alguns problemas, nomeadamente a incapacidade de uma leitura correcta dos 370 nucleótidos. As sequências comparadas com as bases de dados tinham em média menos de 300 nucleótidos, o que também pode interferir no resultado.

Estando prevista a substituição próxima do equipamento de sequenciação ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems), por um outro equipamento, será

interessante verificar a qualidade dos resultados. Prevendo-se que o novo equipamento tenha uma maior capacidade de resposta, será de esperar que o tempo necessário para a sequenciação (tipicamente 75 minutos por amostra), venha a ser significativamente reduzido.

Existe ainda a possibilidade de numa amostra biológica estar presente mais do que um agente bacteriano, o que, não interferindo com a detecção do DNA microbiano, pode tornar problemática a identificação, nomeadamente por sequenciação. Nestes casos existe a possibilidade de separar as sequências recorrendo a kits de clonagem de produtos de PCR.

Finalmente, o significado clínico da detecção de ácidos nucleicos pode suscitar algumas dúvidas. Os métodos convencionais detectam organismos viáveis, mas os métodos moleculares conseguem detectar DNA de organismos inviáveis, ou mesmo produtos de fagocitose. O DNA bacteriano pode ser amplificado longos períodos após o efeito bactericida da antibioterapia. Em qualquer dos casos é imprescindível a articulação dos resultados moleculares com os resultados obtidos por métodos convencionais, sempre acompanhados da interpretação clínica dos mesmos.

5.2 Identificação molecular de culturas bacterianas

A sequenciação de DNA de culturas bacterianas com o sistema MicroSeq 500 Bacterial Identification System revelou-se um método de grande utilidade na identificação de estirpes. Os casos em que não se conseguiu chegar a uma identificação definitiva ao nível da espécie compreenderam os géneros *Brucella* spp, *Campylobacter* spp, *Lactobacillus* spp, *Mycobacterium* spp e *Acinetobacter* spp.

Foi desenvolvido um sistema de classificação que reconhece seis espécies de *Brucella*, baseado em diferenças fenotípicas e antigénicas muito subtis, bem como nos diferentes

hospedeiros específicos. Assim tradicionalmente são reconhecidas: *B. abortus* (bovina), *B. melitensis* (caprina e ovina), *B. ovis* (ovina), *B. canis* (canina) *B. suis* (suína) e *B. neotomae* (roedores) (Whatmore et al, 2007). Estudos genéticos permitiram reconhecer a limitada variabilidade genética da *Brucella* spp, tendo sido já proposto o reconhecimento de apenas uma espécie (*B. melitensis*) dentro do gênero (Gandara et al, 2001). No entanto esta opção não é consensual, estando em curso estudos que permitam caracterizar de forma mais concreta este gênero (Whatmore et al, 2007). Assim, a sequenciação do gene 16S rRNA constitui um método de confirmação da identificação ao nível do gênero, não permitindo concluir sobre a espécie em causa (Gee et al, 2004), o que está de acordo com os resultados obtidos, em que as sequências estudadas apresentavam homologia de 100% com as várias espécies presentes na base de dados. A dificuldade em discriminar entre *Campylobacter jejuni* e *C. coli* por sequenciação parcial do gene 16S rRNA, por elevada homologia nas sequências, já foi também descrita (Gorkiewicz et al, 2003; Woo et al, 2003) podendo a sequenciação da totalidade do gene ter maior capacidade discriminatória (Woo et al, 2003).

A sequenciação do gene 16S rRNA tem sido amplamente aplicada à identificação de micobactérias, com resultados superiores aos conseguidos por métodos fenotípicos (Clarridge, 2004) no entanto mais uma vez a elevada homologia partilhada por duas espécies (*M. abscessus* e *M. chelonae*) não permitiu a sua distinção como já descrito por outros autores (Clarridge, 2004; Cloud et al, 2002; Hall et al, 2003; Patel, 2001; Woo et al, 2003), o que acontece também entre as espécies *M. avium* e *M. paratuberculosis* e entre *M. tuberculosis* e os outros membros do complexo *M. tuberculosis* (Clarridge, 2004). Apesar disso, a delimitação da identificação a duas espécies, possibilita a discriminação recorrendo a testes fenotípicos simples, o que é clinicamente importante, uma vez que os padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos são diferentes entre as duas (Yakrus et al, 2001). O baixo polimorfismo do gene 16S rRNA em espécies próximas de *Acinetobacter*, também não permite a sua distinção, sendo mais adequada a sequenciação da *internal transcribed spacer*, genes da recombinase A (*recA*) e girase B (*gyrB*) e a subunidade- β da polimerase do RNA (*rpoB*) (La Scola et al, 2006). A identificação da espécie de *Lactobacillus* não foi conseguida com o sistema MicroSeq, mas sequenciando os 370bp na região final do gene, foi possível chegar a uma identificação conclusiva de *Lactobacillus paracasei*, confirmada com o resultado do

controlo de qualidade UK-NEQAS, o que mostra que neste caso a sequenciação da totalidade do gene permitiria uma boa discriminação (Mori et al, 1997).

Foi tentado, com sucesso, a utilização do sistema MicroSeq 500 directamente numa amostra de LCR, no entanto o sistema apenas está validado para culturas bacterianas, onde a quantidade de DNA bacteriano é substancialmente superior.

As culturas estudadas, agrupadas de acordo com algumas características fenotípicas comuns, revelaram uma maior prevalência de bacilos gram-positivo, seguida de *Streptococcus* do grupo viridans e bacilos gram-negativo fastidiosos. Sem surpresa, é nestes casos que os métodos fenotípicos tipicamente apresentam maiores dificuldades na identificação, fornecendo resultados com “fraca discriminação” (Christensen et al, 2005; Clarridge, 2004; Drancourt et al, 2000; Janda & Abbott, 2007; Mignard & Flandrois, 2006; Patel, 2001; Petti et al, 2005; Rodicio Mdel & Mendoza Mdel, 2004; Woo et al, 2003; Zbinden et al, 2007).

Destaca-se por fim um grupo de bactérias comumente identificadas no laboratório de microbiologia por métodos convencionais, mas que não apresentaram uma identificação conclusiva: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. Estes organismos podem ser classificados como estirpes aberrantes, uma vez que apresentam um fenótipo incomum, que não é reconhecido pelas bases de dados usadas nos métodos convencionais.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O teste *SeptiFast* revelou-se um método laborioso, mas robusto, capaz de ser usado na rotina laboratorial, podendo ser uma ferramenta útil na detecção de bactérias e fungos directamente a partir de amostras de sangue, com identificação objectiva do agente em cerca de 6 horas. No entanto, dado o custo elevado, mais estudos são necessários, principalmente para avaliar em que pacientes este teste pode ser mais vantajoso numa relação custo-benefício. Uma possibilidade será a população neo-natal, em que a antibioterapia é instituída perante a suspeita de infecção e a quantidade de bactérias em circulação é normalmente superior à população adulta, sendo a rapidez no diagnóstico um factor decisivo.

Uma estratégia a seguir poderá passar pela optimização de um protocolo de extracção automática de ácidos nucleicos, com um passo inicial de lise da parede microbiana e tratamento com DNase para remover DNA genómico humano potencialmente inibidor. O volume de sangue é uma variável a ter em conta; será necessário optimizar o volume da amostra a extrair para minimizar a inibição, bem como o volume de eluição, que possibilite DNA suficiente para as reacções (250µL), mas não tanto que possa diluir os ácidos nucleicos, diminuindo a sensibilidade do método. Com este objectivo surgiram recentemente sistemas de concentração e tratamento de amostras de sangue (Sample Preparation for Pathogen Detection, Looxter®, SirsLab e Selective Bacterial DNA Isolation, MolYsis, Molzym) desenvolvidos para extracção de DNA bacteriano e fúngico para amplificação por PCR universal.

A PCR em tempo real para amplificação de 370bp do gene 16S rRNA poderá beneficiar da optimização do método de extracção, no entanto será imprescindível avaliar a capacidade discriminatória dos *primers* usados para a sequenciação entre as diferentes espécies de *Staphylococcus* spp, de forma a ser possível diferenciar uma infecção real de uma contaminação sem significado clínico.

A aquisição de um novo equipamento de sequenciação, com maior capacidade de resposta, permite pensar em diferentes estratégias de escolha de *primers*. Selecionando diferentes regiões variáveis, será possível aumentar a possibilidade de detectar, por exemplo, agentes responsáveis por endocardites, normalmente difíceis de detectar por métodos convencionais, ou mesmo agentes que não crescem em cultura (*Tropheryma whippelii*). Estas estratégias podem ainda ser aplicadas a outras amostras biológicas

desde que de locais anatómicos normalmente estéreis (LCR, Líquidos das cavidades serosas, biópsias)

Um dos factores que dificulta a interpretação dos resultados moleculares prende-se com a possibilidade de detecção de DNA com origem em bactérias não viáveis, ou produtos de fagocitose. Estão já a decorrer estudos que determinam o número de cópias do gene 16S rRNA por PCR quantitativo, de forma a avaliar a viabilidade bacteriana e o efeito bactericida dos antimicrobianos prescritos (Aellen et al, 2006).

A sequenciação parcial do gene 16S rRNA com o sistema MicroSeq 500 revelou-se bastante útil, sendo correntemente usada na rotina do Serviço de Microbiologia e Unidade de Biologia Molecular do Centro Hospitalar do Porto, na identificação de bactérias com perfis bioquímicos ambíguos, bactérias incomuns, fastidiosas, fracamente descritas ou com fenótipos aberrantes. Mais uma vez a aquisição de um novo equipamento de sequenciação virá diminuir significativamente o tempo de resposta, sendo possível, quando necessário e se justifique, proceder à sequenciação da totalidade do gene recorrendo ao MicroSeq Full Gene Bacterial Identification Kit (Applied Biosystems). Poderá ainda ser considerada uma estratégia semelhante para a identificação de fungos, recorrendo a sistemas com o mesmo princípio, mas dirigidos ao gene 18S rRNA.

Cerca de 20 anos após o desenvolvimento do primeiro método de amplificação de DNA praticável em laboratório clínico, os avanços tecnológicos são enormes e constantes, possibilitando a aplicação mais abrangente dos métodos moleculares na rotina laboratorial. As vantagens destas abordagens são indiscutíveis, no entanto os métodos convencionais mantêm o seu papel fundamental. Os melhores resultados obtidos são os que resultam da conjugação dos dois métodos, funcionando a Biologia Molecular como um complemento cada vez mais útil.

7. BIBLIOGRAFIA

Aellen S, Que YA, Guignard B, Haenni M, Moreillon P (2006) Detection of live and antibiotic-killed bacteria by quantitative real-time PCR of specific fragments of rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(6): 1913-1920

Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R, Lepage E, Le Gall R (2002) Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* **28**(2): 108-121

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**(1): 143-169

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* **29**(7): 1303-1310

Baker GC, Smith JJ, Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* **55**(3): 541-555

Balk RA (2000) Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin* **16**(2): 179-192

Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern GV (2003) Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J Clin Microbiol* **41**(7): 3119-3125

Bledsoe BE (2002) The Golden Hour: fact or fiction? *Emerg Med Serv* **31**(6): 105

Blow O, Magliore L, Claridge JA, Butler K, Young JS (1999) The golden hour and the silver day: detection and correction of occult hypoperfusion within 24 hours improves outcome from major trauma. *J Trauma* **47**(5): 964-969

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**(6): 1644-1655

Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, Boddinhaus B, Altwegg M, Bottger EC (2006) 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **44**(4): 1359-1366

Bouza E, Sousa D, Rodriguez-Creixems M, Lechuz JG, Munoz P (2007) Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections? *J Clin Microbiol* **45**(9): 2765-2769

Breitkopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K (2005) Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. *Circulation* **111**(11): 1415-1421

Brook I (1999) Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol* **25**(3): 155-172

Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, Dickinson G, Ackroyd-Stolarz S (2003) The contribution of blood cultures to the clinical management of adult patients admitted to the hospital with community-acquired pneumonia: a prospective observational study. *Chest* **123**(4): 1142-1150

Capoor MR, Nair D, Aggarwal P, Gupta B (2006) Rapid diagnosis of community-acquired pneumonia using the BacT/Alert 3D system. *Braz J Infect Dis* **10**(5): 352-356

Carroll NM, Adamson P, Okhravi N (1999) Elimination of bacterial DNA from Taq DNA polymerases by restriction endonuclease digestion. *J Clin Microbiol* **37**(10): 3402-3404

Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* **69**(2): 330-339

Chandrasekar PH, Brown WJ (1994) Clinical issues of blood cultures. *Arch Intern Med* **154**(8): 841-849

Christensen JJ, Andresen K, Justesen T, Kemp M (2005) Ribosomal DNA sequencing: experiences from use in the Danish National Reference Laboratory for Identification of Bacteria. *APMIS* **113**(9): 621-628

Clarridge JE, 3rd (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**(4): 840-862, table of contents

Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, Carroll KC (2002) Identification of Mycobacterium spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* **40**(2): 400-406

Cockerill FR, 3rd (2003) Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med* **127**(9): 1112-1120

Collins FS, Morgan M, Patrinos A (2003) The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* **300**(5617): 286-290

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB (2001) Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* **39**(4): 1553-1558

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarski EB, Fox AJ (2000) Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* **38**(5): 1747-1752

Csako G (2006) Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing. *Clin Chim Acta* **363**(1-2): 6-31

Dagan R, Shriker O, Hazan I, Leibovitz E, Greenberg D, Schlaeffer F, Levy R (1998) Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. *J Clin Microbiol* **36**(3): 669-673

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL (2008) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* **36**(1): 296-327

Drancourt M, Berger P, Raoult D (2004) Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *J Clin Microbiol* **42**(5): 2197-2202

Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D (2000) 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* **38**(10): 3623-3630

Dubnau D, Smith I, Marmur J (1965a) Gene conservation in *Bacillus* species. II. The location of genes concerned with the synthesis of ribosomal components and soluble RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**(3): 724-730

Dubnau D, Smith I, Morell P, Marmur J (1965b) Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**(2): 491-498

Ehrenstein BP, Jarry T, Linde HJ, Scholmerich J, Gluck T (2005) Low rate of clinical consequences derived from results of blood cultures obtained in an internal medicine emergency department. *Infection* **33**(5-6): 314-319

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, 3rd, Smith TF (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* **19**(1): 165-256

Fenollar F, Raoult D (2007) Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents* **30 Suppl 1**: S7-15

Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D (2006) Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol* **44**(3): 1018-1028

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**(5223): 496-512

Fonseca F (1998) Taxonomia Microbiana. In *Microbiologia*, Lidel ET (ed), Vol. 1, 1, pp 13-18. Porto: Lidel

Forbes B, Sahm D, Weissfeld A (1998) *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, Vol. 1, 10 edn. Chicago: Mosby.

Fournier PE, Drancourt M, Raoult D (2007) Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* **7**(11): 711-723

Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM, Fritchman RD, Weidman JF, Small KV, Sandusky M, Fuhrmann J, Nguyen D, Utterback TR, Saudek DM, Phillips CA, Merrick JM, Tomb JF, Dougherty BA, Bott KF, Hu PC, Lucier TS, Peterson SN, Smith HO, Hutchison CA, 3rd, Venter JC (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**(5235): 397-403

Gandara B, Merino AL, Rogel MA, Martinez-Romero E (2001) Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* **39**(1): 235-240

Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Herrera-Melero I, Aldabo-Pallas T, Cayuela-Dominguez A, Marquez-Vacaro JA, Carbajal-Guerrero J, Garcia-Garmendia JL (2008) Mortality and morbidity attributable to inadequate empirical antimicrobial therapy in patients admitted to the ICU with sepsis: a matched cohort study. *J Antimicrob Chemother* **61**(2): 436-441

Gee JE, De BK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T (2004) Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. *J Clin Microbiol* **42**(8): 3649-3654

Glerant JC, Hellmuth D, Schmit JL, Ducroix JP, Jounieaux V (1999) Utility of blood cultures in community-acquired pneumonia requiring hospitalization: influence of antibiotic treatment before admission. *Respir Med* **93**(3): 208-212

Gorkiewicz G, Feierl G, Schober C, Dieber F, Kofer J, Zechner R, Zechner EL (2003) Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* **41**(6): 2537-2546

Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D (1994) PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **32**(2): 335-351

Hall KK, Lyman JA (2006) Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev* **19**(4): 788-802

- Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD (2003) Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* **41**(4): 1447-1453
- Hall N (2007) Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol* **210**(Pt 9): 1518-1525
- Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D (2003) Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med* **115**(7): 529-535
- Hardy DJ, Hulbert BB, Migneault PC (1992) Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures. *J Clin Microbiol* **30**(10): 2743-2745
- Houck PM, Bratzler DW (2005) Administration of first hospital antibiotics for community-acquired pneumonia: does timeliness affect outcomes? *Curr Opin Infect Dis* **18**(2): 151-156
- Houck PM, Bratzler DW, Nsa W, Ma A, Bartlett JG (2004) Timing of antibiotic administration and outcomes for Medicare patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* **164**(6): 637-644
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**(18): 4765-4774
- Hunkapiller T, Kaiser RJ, Koop BF, Hood L (1991) Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science* **254**(5028): 59-67
- Hutchison CA, 3rd (2007) DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res* **35**(18): 6227-6237
- Isaacman DJ, Zhang Y, Reynolds EA, Ehrlich GD (1998) Accuracy of a polymerase chain reaction-based assay for detection of pneumococcal bacteremia in children. *Pediatrics* **101**(5): 813-816
- Jamal W, Tamaray G, Pazhoor A, Rotimi VO (2006) Comparative evaluation of BacT/ALERT 3D and BACTEC systems for the recovery of pathogens causing bloodstream infections. *Med Princ Pract* **15**(3): 223-227
- Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* **45**(9): 2761-2764
- Jordan JA, Durso MB (2005) Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn* **7**(5): 575-581
- Jordan JA, Durso MB, Butchko AR, Jones JG, Brozanski BS (2006) Evaluating the near-term infant for early onset sepsis: progress and challenges to consider with 16S rDNA polymerase chain reaction testing. *J Mol Diagn* **8**(3): 357-363

Keswani J, Whitman WB (2001) Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(Pt 2): 667-678

Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ (1999) Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* **115**(2): 462-474

Koponen JK, Turunen AM, Yla-Herttuala S (2002) Escherichia coli DNA contamination in AmpliTaq Gold polymerase interferes with TaqMan analysis of lacZ. *Mol Ther* **5**(3): 220-222

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**(2-3): 95-125

La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D (2006) Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of Acinetobacter species. *J Clin Microbiol* **44**(3): 827-832

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM,

McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**(6822): 860-921

Leong D, Greisen K (1993) PCR Detection of Bacteria found in Cerebrospinal fluid. In *Diagnostics Molecular Microbiology: Principles and Applications*, ASM (ed), pp 300-306. Washington DC: ASM

Levin PD, Hersch M, Rudensky B, Yinnon AM (1997) Routine surveillance blood cultures: their place in the management of critically ill patients. *J Infect* **35**(2): 125-128

Llewelyn MJ, Cohen J (2007) Tracking the microbes in sepsis: advancements in treatment bring challenges for microbial epidemiology. *Clin Infect Dis* **44**(10): 1343-1348

Lorente ML, Falguera M, Nogues A, Gonzalez AR, Merino MT, Caballero MR (2000) Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: a prospective clinical study. *Thorax* **55**(2): 133-137

Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC (2000) Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **38**(6): 2076-2080

Mandell G, Bennet J, Dolin R (2004) *Principles and Practice of Infectious Diseases Sixth Edition*, Vol. 1, 6 edn.: Churchill Livingstone.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* **348**(16): 1546-1554

Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(2): 560-564

McKenzie R, Reimer LG (1987) Effect of antimicrobials on blood cultures in endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **8**(3): 165-172

Meehan TP, Fine MJ, Krumholz HM, Scinto JD, Galusha DH, Mockalis JT, Weber GF, Petrillo MK, Houck PM, Fine JM (1997) Quality of care, process, and outcomes in elderly patients with pneumonia. *JAMA* **278**(23): 2080-2084

Mignard S, Flandrois JP (2006) 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods* **67**(3): 574-581

Millar BC, Xu J, Moore JE (2002) Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology. *J Clin Microbiol* **40**(5): 1575-1580

- Mirrett S, Hanson KE, Reller LB (2007) Controlled clinical comparison of VersaTREK and BacT/ALERT blood culture systems. *J Clin Microbiol* **45**(2): 299-302
- Mori K, Yamazaki K, Ishiyama T, Katsumata M, Kobayashi K, Kawai Y, Inoue N, Shinano H (1997) Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int J Syst Bacteriol* **47**(1): 54-57
- Munson EL, Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Doern GV (2003) Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management. *J Clin Microbiol* **41**(1): 495-497
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* **148**(Pt 1): 257-266
- Neu HC (1986) Cost effective blood cultures--is it possible or impossible to modify behavior? *Infect Control* **7**(1): 32-33
- Nikkari S, McLaughlin IJ, Bi W, Dodge DE, Relman DA (2001) Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J Clin Microbiol* **39**(5): 1956-1959
- O'Brien JM, Jr., Ali NA, Aberegg SK, Abraham E (2007) Sepsis. *Am J Med* **120**(12): 1012-1022
- Patel JB (2001) 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* **6**(4): 313-321
- Persing DH (1993) Target Selection and Optimization of Amplification Products. In *Diagnostics Molecular Microbiology: Principles and Applications*, ASM (ed), pp 88-104. Washington DC: ASM
- Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM (2004) New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* **4**(12): 751-760
- Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P (2005) The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* **43**(12): 6123-6125
- Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, Ruuskanen O, Alanen A, Kotilainen E, Toivanen P, Kotilainen P (2000) Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* **38**(1): 32-39
- Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP (1997) Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* **10**(3): 444-465
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M (2001) Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* **345**(19): 1368-1377

Rivers EP, McIntyre L, Morro DC, Rivers KK (2005) Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. *CMAJ* **173**(9): 1054-1065

Rodicio Mdel R, Mendoza Mdel C (2004) [Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**(4): 238-245

Ruppitsch W, Stoger A, Indra A, Grif K, Schabereiter-Gurtner C, Hirschl A, Allerberger F (2007) Suitability of partial 16S ribosomal RNA gene sequence analysis for the identification of dangerous bacterial pathogens. *J Appl Microbiol* **102**(3): 852-859

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467

Serody JS, Berrey MM, Albritton K, O'Brien SM, Capel EP, Bigelow SH, Weber DJ, Gabriel, Wiley JM, Schell MJ, Gilligan PH, Shea TC (2000) Utility of obtaining blood cultures in febrile neutropenic patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **26**(5): 533-538

Shafazand S, Weinacker AB (2002) Blood cultures in the critical care unit: improving utilization and yield. *Chest* **122**(5): 1727-1736

Shendure JA, Porreca GJ, Church GM (2008) Overview of DNA sequencing strategies. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 7**: Unit 7 1

Smith K, Diggle MA, Clarke SC (2004) Automation of a fluorescence-based multiplex PCR for the laboratory confirmation of common bacterial pathogens. *J Med Microbiol* **53**(Pt 2): 115-117

Socan M, Marinic-Fiser N, Kraigher A, Kotnik A, Logar M (1999) Microbial aetiology of community-acquired pneumonia in hospitalised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**(11): 777-782

Sogaard M, Norgaard M, Schonheyder HC (2007) First notification of positive blood cultures and the high accuracy of the gram stain report. *J Clin Microbiol* **45**(4): 1113-1117

Souvenir D, Anderson DE, Jr., Palpant S, Mroch H, Askin S, Anderson J, Claridge J, Eiland J, Malone C, Garrison MW, Watson P, Campbell DM (1998) Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients. *J Clin Microbiol* **36**(7): 1923-1926

Taveira N (2000) Detecção e Identificação Molecular de Microrganismos. In *Microbiologia*, Lidel ET (ed), Vol. 2, 1, pp 3-37. Porto: Lidel

Valasek MA, Repa JJ (2005) The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* **29**(3): 151-159

- van Belkum A (2003) Molecular diagnostics in medical microbiology: yesterday, today and tomorrow. *Curr Opin Pharmacol* **3**(5): 497-501
- Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res* **24**(17): 3381-3391
- Vincent JL, Abraham E (2006) The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* **173**(3): 256-263
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D (2006) Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* **34**(2): 344-353
- Vliegen I, Jacobs JA, Beuken E, Bruggeman CA, Vink C (2006) Rapid identification of bacteria by real-time amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. *J Microbiol Methods* **66**(1): 156-164
- Washington JA, 2nd (1975) Blood cultures: principles and techniques. *Mayo Clin Proc* **50**(2): 91-98
- Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP (2007) Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol* **7**: 34
- Wheeler J, Murphy OM, Freeman R, Kearns AM, Steward M, Lee MJ (2000) PCR can add to detection of pneumococcal disease in pneumonic patients receiving antibiotics at admission. *J Clin Microbiol* **38**(10): 3907
- Wicker T, Schlagenhauf E, Graner A, Close TJ, Keller B, Stein N (2006) 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley. *BMC Genomics* **7**: 275
- Wilson KH, Blichington RB, Greene RC (1990) Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **28**(9): 1942-1946
- Wilson ML, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP, Reimer LG (1993) Recovery of clinically important microorganisms from the BacT/Alert blood culture system does not require testing for seven days. *Diagn Microbiol Infect Dis* **16**(1): 31-34
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**(2): 221-271
- Woo PC, Ng KH, Lau SK, Yip KT, Fung AM, Leung KW, Tam DM, Que TL, Yuen KY (2003) Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol* **41**(5): 1996-2001
- Xu J, Moore JE, Millar BC, Webb H, Shields MD, Goldsmith CE (2005) Employment of broad range 16S rDNA PCR and sequencing in the detection of aetiological agents of meningitis. *New Microbiol* **28**(2): 135-143

Yakrus MA, Hernandez SM, Floyd MM, Sikes D, Butler WR, Metchock B (2001) Comparison of methods for Identification of Mycobacterium abscessus and M. chelonae isolates. *J Clin Microbiol* **39**(11): 4103-4110

Yamamoto Y (2002) PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(3): 508-514

Zbinden A, Bottger EC, Bosshard PP, Zbinden R (2007) Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* **45**(7): 2270-2273

Zeaier Z, Fournier PE, Greub G, Raoult D (2003) Diagnosis of Bartonella endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol* **41**(3): 919-925

Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD (1995) Detection of Streptococcus pneumoniae in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol* **33**(3): 596-601

Ziegler R, Johnscher I, Martus P, Lenhardt D, Just HM (1998) Controlled clinical laboratory comparison of two supplemented aerobic and anaerobic media used in automated blood culture systems to detect bloodstream infections. *J Clin Microbiol* **36**(3): 657-661

Zucol F, Ammann RA, Berger C, Aebi C, Altwegg M, Niggli FK, Nadal D (2006) Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *J Clin Microbiol* **44**(8): 2750-2759