

Uso do SeptiFast para diagnóstico de sepse em doentes graves de um hospital brasileiro

SeptiFast for diagnosis of sepsis in severely ill patients from a Brazilian hospital

Roberta Sitnik¹, Alexandre Rodrigues Marra¹, Roberta Cardoso Petroni¹, Ozires Pereira Santos Ramos¹, Marinês Dalla Valle Martino¹, Jacyr Pasternak¹, Oscar Fernando Pavão dos Santos¹, Cristóvão Luis Pitangueira Mangureira¹, João Renato Rebello Pinho¹

RESUMO

Objetivo: Testar e validar um método molecular multiplex para detecção de infecções sanguíneas, além de comparar os resultados com os obtidos pela hemocultura convencional. **Métodos:** Os testes de hemocultura e o LightCycler® SeptiFast foram realizados em 114 pacientes consecutivos com evidência clínica de sepse. **Resultados:** Mais amostras positivas (23; 20,2%) foram detectadas pelo LightCycler® SeptiFast do que pela hemocultura (17; 14,9%), mostrando concordância de 86,8%. Os resultados discordantes foram de quatro pacientes positivos apenas para hemocultura, dez positivos apenas para LightCycler® SeptiFast e um com patógenos diferentes encontrados em cada método. Infecções por micro-organismos não reconhecidos pelo LightCycler® SeptiFast e detectados apenas pela hemocultura confirmam a necessidade da realização dos dois métodos. O tempo médio para os resultados da hemocultura foi de 5 dias para amostras negativas e de 3,5 dias para as positivas. Os resultados pelo LightCycler® SeptiFast foram obtidos em menos de 8 horas. **Conclusão:** O LightCycler® SeptiFast mostrou ser um teste de grande potencial para ser realizado simultaneamente à hemocultura para diagnóstico de sepse em doentes graves, permitindo um diagnóstico mais rápido de infecções por bactérias e fungos e, dessa forma, auxiliando a redução do tempo de hospitalização e racionalização do uso de antibióticos. Eventualmente, o LightCycler® SeptiFast pode detectar inclusive infecções por micro-organismos dificilmente detectáveis via hemocultura, especialmente aquelas causadas por *Candida não albicans*.

Descritores: Sepse/diagnóstico; Reação multiplex em cadeia da polimerase; Reação em cadeia da polimerase em tempo real

ABSTRACT

Objective: To test and validate a multiplex real-time polymerase chain reaction method for bloodstream infections, as well as to

compare the results with conventional blood culture. **Methods:** A total of 114 consecutive patients with clinical evidence of sepsis were submitted to blood culture and LightCycler™ SeptiFast tests. **Results:** More positive specimens (23; 20.2%) were detected using the LightCycler™ SeptiFast than the blood culture (17; 14.9%), with an agreement of 86.8%. Discordant results were seen in four patients positive only to blood culture, ten positive only to LightCycler™ SeptiFast and one to different pathogens found by each test. Infections with microorganisms detected only using blood culture reassured the need to perform both tests. The mean time to results for blood culture was 5 days for negative and 3.5 days for positive results. LightCycler™ SeptiFast results were achieved in less than 8 hours. **Conclusion:** LightCycler™ SeptiFast showed a high potential as a test to be carried out concomitantly with blood culture for sepsis diagnosis in severely ill patients. This test allowed a faster diagnosis of bacterial and fungal infections that helped to reduce hospital stay and to control the use of antibiotics. LightCycler™ SeptiFast can also eventually detect microorganism and infections that are hardly detected by blood culture, especially *Candida non-albicans* infections.

Keywords: Sepsis/diagnosis; Multiplex polymerase chain reaction; Real-time polymerase chain reaction

INTRODUÇÃO

A sepse é a principal causa de morbidade e mortalidade em todo mundo em pacientes hospitalizados. Estudos da incidência e resultados da sepse no Brasil são escassos; todavia, essa síndrome é considerada um grande problema de saúde pública em unidades de terapia intensiva (UTIs), causando altos custos para os sistemas de saúde.^(1,2) Há uma grande variabilidade na incidência e na mortalidade da sepse grave, dependendo dos

¹ Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

Autor correspondente: Roberta Sitnik – Hospital Israelita Albert Einstein, Avenida Albert Einstein, 627/701 – Morumbi – CEP: 05652-900 – São Paulo, SP, Brasil – Tel.: (11) 2151-2105 – E-mail: roberta.sitnik@einstein.br

Data de submissão: 6/8/2013 – Data de aceite 1/12/2013

Conflito de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082014AO2932

métodos ou da base de dados utilizadas. Nos Estados Unidos, em média, a sepse grave é registrada em 2% dos pacientes internados e, anualmente, a média dessa síndrome aumenta cerca de 13%.^(3,4)

A sepse é causada por um grupo heterogêneo de etiologias infecciosas.⁽⁵⁾ O diagnóstico precoce e o tratamento apropriado são correlacionados a resultados clínicos.⁽⁶⁻⁸⁾ A identificação precoce do patógeno aumenta a chance de identificar o agente etiológico correto e pode evitar o uso indevido de antibióticos. Todavia, determinar a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas é sempre necessário para prescrever a terapia antimicrobiana adequada. Kumar et al.⁽⁹⁾ relataram que cada hora de atraso em iniciar a terapia efetiva é associada à diminuição de 7,6% da sobrevivência. A hemocultura (HC) convencional é o padrão-ouro para detecção de patógenos no sangue; porém, o tempo necessário para completar o processo pode variar de 1 a 5 dias, dependendo do organismo. Recentemente, diversos métodos moleculares para o diagnóstico de infecções da corrente sanguínea foram desenvolvidos, os quais também estão sendo utilizados como adjuvantes aos métodos tradicionais, para alcançar resultados mais rápidos e precisos.⁽¹⁰⁻¹²⁾

Entre os métodos moleculares, o primeiro deles aprovado no Brasil pelas agências nacionais reguladoras foi o teste LightCycler® SeptiFast v2.0 (LCS; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Trata-se de teste de amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos para detectar e identificar diretamente o DNA de 25 patógenos comuns (bactérias e fungos) nas amostras sanguíneas. Os micro-organismos são responsáveis por aproximadamente 90% de todas as infecções encontradas na corrente sanguínea.^(7,13) Alguns estudos avaliaram a precisão do diagnóstico e a utilidade clínica do LCS, relatando que a combinação de LCS e HC melhorou significativamente o campo de diagnóstico, particularmente em pacientes em tratamento com antibiótico⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

OBJETIVO

Considerando que a rápida detecção do patógeno pode não somente facilitar o diagnóstico, mas também fornecer terapia apropriada e oportuna, e também os poucos dados sobre esse tipo de teste, especialmente no Brasil, o presente estudo testou e validou um método de reação multiplex em cadeia da polimerase em tempo real para infecções na corrente sanguínea e comparou os resultados obtidos aos da hemocultura convencional.

MÉTODOS

Pacientes

Realizou-se estudo prospectivo envolvendo pacientes de três unidades de internação diferentes do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), em São Paulo: UTI, Pronto Atendimento (PA) e Oncologia (ONCO). Participaram também pacientes do Hospital Municipal Dr. Moysés Deutsch (MBOI), localizado no Jardim Ângela, no perímetro sul da cidade de São Paulo. Assim, um total de 114 doentes graves foram incluídos no estudo.

O estudo foi conduzido nos Departamentos de Patologia e Microbiologia do Laboratório Clínico do HIAE durante os meses de dezembro de 2008 a outubro de 2009. Todos os pacientes se enquadraram nos critérios clínicos para síndrome de sepse. A sepse foi definida como infecção incluindo dois ou mais dos seguintes critérios da síndrome da resposta inflamatória sistêmica: temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$; batimentos cardíacos $>90/\text{min}$; taxa respiratória >20 respirações/min (ou pressão parcial de gás carbônico – PaCO_2 $<32\text{mmHg}$); contagem de hemácias >12.000 células/ μL ou <4.000 células/ μL (ou bastonetes $>10\%$).⁽¹⁸⁾

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética institucional do HIAE (processo número 161/2011). Não se utilizou Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pois a coleta da amostra fazia parte do plano de cuidados dos pacientes.

Procedimento de reação multiplex em cadeia da polimerase

Os testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados pelo Departamento de Patologia Molecular do Laboratório Clínico do HIAE, utilizando LCS e o *software* de identificação SeptiFast (SIS, Roche Diagnostics) por equipe treinada em métodos moleculares. Esse ensaio amplifica a região do *internal transcribed spacer* (ITS) entre as sequências 16S e 23S de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa de DNA ribossomal, e a sequência 18S e 5.8S de DNA ribossomal de fungos. A região do ITS é mais específica do que os RNAs ribossomal, sendo a mais indicada para diferenciar amostras pela análise da curva de melting após a amplificação por meio de *software* de identificação. Apesar de não ser um método quantitativo, a concentração é relacionada ao ciclo PCR em que a amostra torna-se detectável (ponto de cruzamento – PC). Baixas concentrações de *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS) e *Streptococci*, que refletem a variação do fluxo de contaminações, não são exibidas como resultado positivo.

Coletou-se amostra única de sangue de 5mL de cada paciente em tubo com EDTA estéril juntamente do primeiro conjunto de HC. As amostras sanguíneas foram armazenadas a -20°C no laboratório, sendo realizado teste PCR multiplex duas vezes durante a semana, de acordo com as instruções do fabricante. Em todos os passos do procedimento, utilizaram-se reagentes MGrade e material plástico da *Roche Diagnostics* para evitar a contaminação por bactéria ou fungo.

Procedimentos rigorosos devem ser seguidos para impedir as contaminações entre amostras e ambiente. O gabinete de fluxo laminar utilizado para manipulação foi lavado extensivamente com reagente DNA away (*Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos*), 70% etanol e exposto a lâmpada germicida ultravioleta por pelo menos 30 minutos antes e depois do uso. As precauções também incluíram fluxo unidirecional no laboratório iniciado na área pré-amplificação, movendo-se para área de pós-amplificação. Além disso, para manipulação das amostras, utilizamos luvas longas sem pó sobrepostas a outro par de luvas padrões que cobriam as mangas do jaleco, para evitar exposição da pele; e pipetas dedicadas para cada área.

A lise mecânica das amostras (3mL de sangue) foi realizada por meio do SeptiFast Lys Kit e do instrumento MagNA Lyser. Após a lise, foi feita a extração manual com o Kit SeptiFast Prep. As amostras lisadas foram incubados em temperatura elevada, com lise caotrópica pela protease do tampão de lise, que libera ácidos nucleicos e protege o DNA liberado a partir de DNases sanguíneas. Após dois passos, ligação e de lavagem, os ácidos nucleicos absorvidos foram eluídos em alta temperatura. Foi realizada amplificação com instrumento LightCycler® (*Roche Molecular Systems*). Cada corrida também continha um controle de reagente, um controle negativo e um controle interno introduzido em cada amostra, juntamente do reagente de lise. Curvas de *melting* foram obtidas e o *software* de identificação SeptiFast v.10 foi utilizado para determinar a temperatura *melting* correspondente. O tempo total para extração da amostra e amplificação do DNA, até o resultado final, foi de aproximadamente 6 a 7 horas.

Hemocultura

A HC convencional foi realizada em paralelo pelo Departamento de Microbiologia do laboratório, utilizando frascos BACTEC Plus Aeróbico/F e BACTEC Plus Anaeróbico/F. Todos os frascos foram monitorados por meio do sistema de HC BACTEC 9240 (*Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, Estados Unidos*). No caso de sinal positivo, removiam-

-se os frascos de HC do instrumento. A coloração de Gram de HC média nos fracos foi realizada, e os resultados foram rapidamente relatados aos médicos. As amostras foram coletadas em placas ágar sangue, ágar cromogênea (chromID® CPS® bioMérieux) e ágar sangue anaeróbico. Após, identificaram-se as amostras de bactérias e fungos, e conduziram-se testes de sensibilidade aos antibióticos, por meio do sistema Vitek II (*bioMérieux, Marcy l'Etoile, França*) e API 32 C (*bioMérieux, Marcy l'Etoile, França*) para levedura.

RESULTADOS

A amostra incluiu 40 (35,1%) mulheres e 74 (64,9%) homens, com média de idade de 49,7 anos ($\pm 24,8$). A maioria das amostras obtidas foi coletada da UTI (56 amostras; 49,1%), porém também foram recebidas amostras da ONCO (38 amostras; 33,3%), PA (16 amostras; 14,0%) e MBOI (4 amostras; 3,5%).

Entre os 114 casos, o LCS e a HC mostraram resultados positivos em 23 (20,2%) e 17 (14,9%) amostras, respectivamente. No total, 27 casos (23,7%) foram positivos para um dos dois ensaios (tanto LCS ou HC); alguns deles mostraram infecções por mais de um patógeno (total de 32 patógenos detectados). As infecções polimicrobianas foram detectadas em três pacientes pelo LCS e em um paciente pela HC. Em um indivíduo, dois patógenos diferentes foram identificados por cada método. A LCS detectou *Klebsiella pneumoniae/oxytoca* enquanto a HC detectou *Burkholderia cepacia*. Esse paciente teve resultado de cultura positiva para *K. pneumonia* na aspiração traqueal. Considerando todos os resultados positivos como positivos verdadeiros, especificidade e valor preditivo positivo (VPP), todos eles foram 100%, tanto para o LCS quanto para a HC. A sensibilidade foi 81,3% e o valor preditivo negativo (VPN) 93,5% para LCS, enquanto para HC os valores obtidos foram 53,6% e 86,1%, respectivamente. Os resultados para LCS e HC para esses pacientes com pelo menos um patógeno detectado são descritos na tabela 1.

A concordância geral entre HC e LCS foi de 86,6%. O tempo para os resultados negativos da HC foi de 5 dias e 3,5 dias para os positivos. Os resultados do LCS puderam ser atingidos em menos de 8 horas.

O resultado positivo para HC isolada para *Staphylococcus epidermidis* refletiu uma característica do *software*, que exclui os resultados positivos de CoNs com valores de PC maiores do que 20 (concentração menor do que 100CFU/mL). Essa característica reduz a taxa de falsos positivos baseada na hipótese de que são contaminantes e não agentes que causam infecção.

Para os fungos, somente uma amostra foi positiva para *Candida albicans* utilizando a HC; porém, no LCS,

Tabela 1. Resultados do LyghtCycler® System e da hemocultura em pacientes com resultados positivo e com pelo menos um sistema de detecção

Paciente	LCS	HC
Positivo para ambos os sistemas (concordante)		
2		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	<i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
13	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
14	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
18	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
25	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
26	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
27	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Positivo para ambos os sistemas (discordante)		
11	<i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
Positiva somente no LCS		
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
4	<i>Candida tropicalis</i>	Negativo
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
19	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Candida albicans</i> ; <i>Candida glabrata</i>	Negativo
20	<i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i>	Negativo
21	<i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i>	Negativo
22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
Positivo somente com HC		
5	Negativo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
15	Negativo	<i>Burkholderia cepacia</i>
16	Negativo	<i>Burkholderia cepacia</i>

LCS: LyghtCycler® System; HC: hemocultura.

Tabela 2. Patógenos detectados pelo LightCycler® SeptiFast e por hemocultura

	Somente PCR	Somente HC	PCR e HC
Bactéria Gram-negativa			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	0	4
<i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i>	3	1*	2
<i>Escherichia coli</i>	0	0	4
<i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i>	1	0	0
Bactéria Gram-positiva			
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CoNS)	0**	2	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0	1
Fungos			
<i>Candida albicans</i>	1	0	1
<i>Candida tropicalis</i>	1	0	0
<i>Candida glabrata</i>	1	0	0
Bactéria Gram-negativa não detectada pelo SeptiFast			
<i>Burkholderia cepacia</i>	ND	3	0

* *Klebsiella pneumoniae*; ** considerado contaminante pelo SeptiFast se o ponto de corte for maior do que 20. PCR: reação em cadeia da polimerase; CoNS: *Staphylococcus coagulase negativa*; ND: não detectado; HC: hemocultura.

três pacientes foram positivos para *C. albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

Foi obtida uma alta taxa de resultados positivos entre os pacientes da UTI de 28,6%. Já para os pacientes do PA e ONCO, a taxa positiva foi de 18,8% e 10,5%, respectivamente.

Os patógenos detectados estão listados na tabela 2. As infecções por Gram-negativo foram mais frequentes e a mais comum delas foi a *Pseudomonas aeruginosa*, detectada em 7,9% dos pacientes.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o LCS é um sistema útil para rápido diagnóstico da sepse em doentes graves. A concordância entre HC e LCS obtida foi de 86,8%. Em estudos anteriores, os resultados concordantes com tipos diferentes de populações variou de 70 a 88%.^(19,20)

Todos os bacilos *Gram*-negativos detectados pelo LCS podem ser patógenos reais. Apesar de que bacilos não fermentadores, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia*, podem ser encontrados como contaminantes ambientais, estes são reconhecidos como causa importante de infecção hospitalar, principalmente em indivíduos imunodeprimidos.

CoNS são frequentemente isoladas nas HCs, nas quais podem ser apenas contaminante ou causa de bacteremia. Apesar do cuidado na manipulação dos reagentes durante a montagem das reações desde a extração até a amplificação em tempo real, considerando que a pele humana e o trato respiratório superior apresentam alguns micro-organismos identificados pelo SeptiFast, é possível esperar contaminações por CoNs. De fato, os CoNS foram detectados pela HC em dois casos. Em um desses casos, também foram detectados CoNS por meio do LCS com PC elevado, porém estes foram excluídos pela interpretação do *software* LCS. Esse resultado reafirma a importância de adotar precauções para evitar a contaminação durante todo o processo, isto é, da coleta da amostra para amplificação da PCR. Outros autores mostraram que o LCS apresentou alta taxa de positividade e baixa taxa de contaminação quando comparado com a HC.^(20,21)

Mesmo utilizando a HC, determinar se CoNS isolado representa a bacteremia verdadeira é difícil. García et al.⁽²²⁾ analisaram pacientes com uma ou mais HCs positivas para CoNS e encontraram diferença estatisticamente significativa em tempo médio para positividade entre bacteremia clínica e contaminações (19,4 *versus* 22,7 horas; $p=0,02$), mostrando que o tempo para positividade pode ser um parâmetro útil para o diagnóstico da bacteremia CoNS verdadeira. No presente estudo, os tempos de incubação para positividade foram 22 e 25 horas em dois pacientes com resultados positivos para *S. epidermidis* apenas por meio da HC, o que pode sugerir possível contaminação, especialmente no último isolamento.

Em relação à detecção de fungos, a HC convencional identificou somente *C. albicans* em uma das amostras. O sistema de HC pode falhar na identificação de *Candida* não *albicans*, como demonstrado por Fernandez et al.⁽²³⁾. Esses autores também mostraram que o tempo médio para detecção de levedura positiva para *C. albicans* foi $35,3 \pm 18,1$ horas, enquanto para *C. glabrata* foi $80,0 \pm 22,4$ horas ($p < 0,0001$). O LCS foi positivo para três amostras de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*). Como esperado, apenas as primeiras amostras também foram detectadas pela HC em uma das duas amostras positivas para infecções por fungos identificadas por LCS. A detecção de patógenos por fungos melhorou substancialmente com o uso do LCS.

Alguns patógenos relevantes não foram detectados por LCS, mas somente pela HC. No nosso estudo, *B. cepacia* foi detectada em três pacientes somente por HC.

Resultados discordantes podem ter causas diferentes. O uso de antibióticos antes da coleta da amostra sanguínea pode interferir na cultura, levando a micro-organismos não viáveis, mas com resultado positivo no LCS. As HCs são negativas em cerca de 50% dos casos de sepse clínica.⁽⁸⁾ Por outro lado, um extenso volume de sangue coletado para testes de HC ou infecção por um organismo não incluído na lista principal do SeptiFast pode explicar os resultados positivo na HC e os negativos no LCS.⁽²⁴⁾

Analisando as diferentes unidades de internação estudadas, observou-se alta positividade na UTI (28,6%), o que mostra a utilidade clínica dos testes moleculares para esse tipo de pacientes. Todavia, nas outras unidades de internação analisadas, as amostras positivas também foram identificadas, o que aponta o impacto de aplicar o LCS para todo paciente com suspeita de sepse, independentemente da unidade de origem, desde que enquadrado em alguns critérios clínicos preestabelecidos. Esse é um ponto de discussão importante, já que os clínicos terão a possibilidade de utilizar uma terapia antimicrobiana mais adequada para seus pacientes e, como se sabe, essa prática clínica é importante para reduzir a mortalidade em pacientes com sepse.^(25,26)

O tempo para processamento do resultado é a maior vantagem do uso do PCR em tempo real. No presente estudo, devido à necessidade de manter uma área separada do laboratório e um time dedicado a essa reação, o LCS não pôde ser realizado pelo menos uma vez ao dia, o que poderia ser necessário para manter o tempo de resposta (TAT, sigla do inglês *turnaround time*) um pouco menor para melhor avaliação de seus efeitos no gerenciamento do paciente.

Os resultados obtidos não foram levados em consideração pelos médicos já que o principal objetivo deste estudo foi testar a viabilidade do LCS no laboratório e verificar suas características de desempenho. Idealmente, utilizando uma equipe dedicada à execução do LCS, pode-se reduzir o TAT para menos de 4 horas, usando métodos de extração automatizada⁽²⁷⁾ resultando em uma significativa melhora do tratamento e da resposta dos pacientes, mesmo com o uso de amostras não sanguíneas.^(11,14,16,28)

A principal limitação do LCS é a necessidade de laboratório especializado, seguindo diretrizes rigorosas, para evitar contaminação de micro-organismos que podem estar presentes no ambiente e na manipulação (pele ou secreções). Essa necessidade é maior do que

aquelas em testes de amplificação de outros ácidos nucleicos conduzidos por outros agentes não encontrados no ambiente. Devido ao alto grau de complexidade do LCS, suas limitações restringem seu uso na maioria dos laboratórios clínicos. Por outro lado, o LCS parece um ensaio interessante para antecipar a identificação de infecções por micro-organismos em doentes graves.

Este estudo demonstrou a viabilidade do método molecular em nosso laboratório, que estava comprometido com regras para evitar contaminação, conforme descrito durante a validação do LCS, que contou com um estudo detalhado do fluxo de trabalho no laboratório, com objetivo de evitar a contaminação pelo ambiente e pela transferência amostra-para-amostra como foi descrito nos métodos deste trabalho.

CONCLUSÃO

Até onde se sabe, este é o primeiro estudo no Brasil que utilizou a metodologia LightCycler® SeptiFast. Detectaram-se mais amostras positivas no LightCycler® SeptiFast do que na hemocultura com concordância geral de 86,8%. Infecções por micro-organismos que não são identificados no SeptiFast foram detectadas somente na hemocultura, o que reafirma a necessidade de se realizarem ambos os testes. Além disso, o LightCycler® SeptiFast não pode detectar o perfil de resistência, com exceção da *Staphylococcus aureus* a oxacilina (MRSA). O LightCycler® SeptiFast mostrou alto potencial como teste para ser realizado simultaneamente com a hemocultura no diagnóstico de pacientes com suspeita de sepse. Além disso, esse instrumento permitiu diagnóstico mais rápido das infecções causadas por fungos ou bactérias, o que reduziu a hospitalização e o uso de antibióticos. O LightCycler® SeptiFast também pode, eventualmente, detectar algumas infecções por micro-organismos que são dificilmente encontradas por meio da HC, especialmente as infecções causadas por *Candida não albicans*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos os pacientes e os médicos, que participaram no ensaio inicial do SeptiFast System em nosso hospital; os Departamentos de Patologia Molecular e Microbiologia Patológica do Laboratório Clínico, pelo excelente trabalho técnico; e a Eduardo Machado, pela revisão da língua inglesa. Também agradecemos a Roche Diagnostics, pela doação de todos os materiais necessários para testagem da reação multiplex em cadeia da polimerase e pelo treinamento sobre o fluxo do teste oferecido a toda equipe do laboratório.

REFERÊNCIAS

- Silva E, Pedro M de A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E; Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004;8(4):R251-2.
- Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, Tura BR, Silva CL, Cal RG, Beer I, Michels V, Safi J, Kayath M, Silva E; Costs Study Group - Latin American Sepsis Institute. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(5):425-34.
- Gaieski DF, Edwards M, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*. 2013;41(5):1167-74.
- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-51.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1303-10.
- Gao F, Melody T, Daniels DF, Giles S, Fox S. The impact of compliance with 6-hour and 24-hour sepsis bundles on hospital mortality in patients with severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*. 2005;9(6):R764-70.
- Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*. 1999;115(2):462-74.
- Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM; Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis shock. *Crit Care Med*. 2004;32(3):858-73. Erratum in: *Crit Care Med*. 2004;32(6):1448. *Crit Care Med*. 2004;32(10):2169-70.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(6):1589-96.
- Klouche M, Schröder U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(7):888-908.
- Lehmann LE, Alvarez J, Hunfeld KP, Goglio A, Kost GJ, Louie RF et al. Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit Care Med*. 2009;37(12):3085-90.
- Ecker DJ, Sampath R, Li H, Massire C, Matthews HE, Toleno D, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(4):399-415.
- Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med*. 2003;115(7):529-35.
- Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeff A, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol*. 2008;197(3):313-24.
- Dark P, Dunn G, Chadwick P, Young D, Bentley A, Carlson G, et al. The clinical diagnostic accuracy of rapid detection of healthcare-associated bloodstream infection in intensive care using multipathogen real-time PCR technology. *BMJ Open*. 2011;1(1):e000181.
- Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2252-8.
- Dark P, Wilson C, Blackwood B, McAuley DF, Perkins GD, McMullan R et al. Accuracy of LightCycler® SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review protocol. *BMJ Open*. 2012;2(1):e000392.

18. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. 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*. 1992;101(6):1644-55.
19. Maubon D, Hamidfar-Roy R, Courby S, Vesin A, Maurin M, Pavese P, et al. Therapeutic impact and diagnostic performance of multiplex PCR in patients with malignancies and suspected sepsis. *J Infect*. 2010;61(4):335-42.
20. Pasqualini L, Mencacci A, Leli C, Montagna P, Cardaccia A, Cenci E et al. Diagnostic performance of a multiple real-time PCR assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1285-8.
21. Westh H, Lisby G, Breyse F, Böddinghaus B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(6):544-51.
22. García P, Benítez R, Lam M, Salinas AM, Wirth H, Espinoza C, et al. Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 1):67-72.
23. Fernandez J, Erstad BL, Petty W, Nix DE. Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(4):402-7.
24. Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36 Suppl 2:S6-16.
25. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest*. 2000;118(1):146-55.
26. Zaragoza R, Artero A, Camarena JJ, Sancho S, González R, Nogueira JM. The influence of inadequate empirical antimicrobial treatment on patients with bloodstream infections in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(5):412-8.
27. Regueiro BJ, Varela-Ledo E, Martínez-Lamas L, Rodríguez-Calviño J, Aguilera A, Santos A, et al. Automated extraction improves multiplex molecular detection of infection in septic patients. *PloS One*. 2010;5(10):e13387.
28. Lehmann LE, Herpichboehm B, Kost GJ, Kollef MH, Stüber F. Cost and mortality prediction using polymerase chain reaction pathogen detection in sepsis: evidence from three observational trials. *Crit Care*. 2010;14(5):R186.