

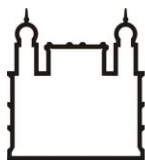
INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MOLECULAR EM PLATAFORMA
LAB-ON-A-CHIP PARA DIAGNÓSTICO DE MICRO-ORGANISMOS
ASSOCIADOS À SEPSE

TAÍS FRANCO DE CARVALHO

Curitiba/PR

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Mestrado em Biociências e Biotecnologia

TAÍS FRANCO DE CARVALHO

Desenvolvimento de método molecular em plataforma lab-on-a-chip para diagnóstico de micro-organismos associados à sepse

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do ICC/Fiocruz como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger

Co-Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo Morello

Curitiba/PR

2018

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de dedicar essa dissertação as duas pessoas fundamentais para minha formação acadêmica e pessoal. Ambos me ensinaram, com exemplo, a valorizar o conhecimento, a bondade e a responsabilidade. Mamãe e papai, muito obrigada pela dedicação financeira e emocional enorme que me possibilitou vencer esta etapa. Obrigada pelas aulas particulares de matemática, pelas correções de gramática e pelo amor incondicional que os acompanham.

Aos meus amigos que assistiram apresentações para me deixar mais tranquila, que ofereceram seu incentivo e carinho, muito obrigada por terem feito estes anos mais doces e divertidos.

A equipe Sepse pelos ensinamentos, atenção, paciência e parceria. Estes resultados são produto dos nossos esforços combinados. Ao Dr. Eduardo Amazonas Rocha de Almeida, pelos conselhos, por dividir sua experiência e me acompanhar e auxiliar desde os desafios do estágio até a conclusão dessa nova etapa. A Ma. Juliane Soldi Malgarin, pelas aventuras no HC, pelas aulas de microbiologia e pelas risadas. A Ma. Camila Zanatta, por me acolher e me educar na purificação de proteínas e pela amizade. E a nossa Iniciação Científica Natasha Cassins pela sua ajuda e entusiasmo. Foi um prazer e inspiração trabalhar com todos vocês.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger e Prof. Dr. Luís Gustavo Morello, por me darem a oportunidade de participar do projeto e pelo apoio para que este fosse conduzido sem percalços e concluído com sucesso. Ao Dr. Luís Gustavo, especialmente pelo tempo investido nas explicações, correções, discussões de resultado, planejamento de experimentos, frustrações e celebrações que fundamentaram esta caminhada.

Agradeço também a Finep, que através do convênio 01.12.0519.00, fomentou o desenvolvimento deste projeto.

Gostaria também de agradecer o IBMP e o ICC pela disponibilização de recursos para que este projeto fosse desenvolvido. Nas disciplinas, nos congressos, nos laboratórios e jornadas, os anos dedicados nas duas instituições foram de grande aprendizagem e crescimento graças aos colaboradores de ambas.

Resumo

Sepse é a disfunção múltipla de órgãos causada pela resposta inflamatória desregulada do corpo a uma infecção. É a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva no mundo, o que é associado a falta de diagnóstico e tratamento eficiente e no tempo adequado. Hemocultura é o padrão ouro para diagnóstico de infecções da corrente sanguínea. No entanto, ela demanda de 3 a 7 dias para o resultado final. A administração de antimicrobianos antes da coleta de amostras de sangue e o crescimento fastidioso de certos patógenos também tornam esse método não apropriado para guiar a terapia de forma correta. Logo, avanços têm sido feitos em biologia molecular para oferecer alternativas mais rápidas e sensíveis. De acordo com a literatura, testes baseados em PCR diretamente do sangue total são considerados os mais promissores dentre eles. Desenvolvemos nesse projeto um multitestes PCR/Arranjo que alia a amplificação por PCR com hibridização de ácidos nucleicos em Lab-on-a-chip (In-Check™ platform, STMicroelectronics). Os micro-organismos cobertos no painel foram selecionados de acordo com dados epidemiológicos nacionais. Sequências do genoma destes micro-organismos foram obtidas de bancos de dados e sequenciamentos e alinhadas para o desenho de iniciadores e sondas. Iniciadores foram gerados para reconhecer e amplificar regiões conservadas com variação interna onde as sondas foram desenhadas para detectar e diferenciar cada espécie. Para avaliar e otimizar iniciadores e sondas assim como o protocolo de PCR e de hibridização, foi utilizado DNA extraído de patógenos em cultivo previamente caracterizados com metodologias tradicionais de microbiologia e sequenciamento. Especificidade e sensibilidade analítica foram investigadas usando DNA extraído de sangue artificialmente contaminado com concentrações conhecidas de micro-organismos. O protótipo final identifica 22 espécies de bactérias e 5 espécies de *Candida* spp. Adicionalmente, sondas universais diferenciam bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e o gênero *Candida*. O limite de detecção do teste é de 10 a 1000 UFC/mL, o que tem valor clínico considerando concentrações de bactéria reportadas em sangue periférico de pacientes sépticos. O teste pode prover a detecção mais rápida e precisa de agentes causadores de sepsis, permitindo tratamento mais eficiente antes da progressão para choque séptico e potencialmente contribuindo para reduzir taxa de mortalidade. Também promove uso consciente de antimicrobianos, reduzindo seleção de cepas resistentes.

Abstract

Sepsis is the multiple organ dysfunction syndrome caused by an irregular body inflammatory response to an infection. It is considered the major cause of death in intensive care units worldwide, which is associated to the lack of appropriate and timely diagnosis and treatment. Blood culturing is the current gold standard technique for blood stream infection (BSI) diagnosis. However, generally takes 3 to 7 days to a final result and antimicrobial administration prior to collection and fastidious pathogens render this method unsuitable to guide therapy properly. Therefore, advances have been made in molecular biology to offer more sensitive and fast alternatives. According to the literature, PCR-based tests directly from whole blood are considered the most promising among them. We developed a PCR/Array-based multitest that allies PCR amplification and hybridization of nucleic acids in a Lab-on-a-chip (In-Check™ platform, STMicroelectronics). The microorganisms covered in the panel were selected according to the national epidemiology data. Sequences of the genome from the microorganisms on the test's panel were retrieved from the data bank and aligned for primers and probes design. Primers were generated to target and amplify conserved regions spanning internal variability that allowed probes to be designed to detect and differentiate each species. To evaluate and optimize probes and primers as well as PCR amplification and hybridization protocols, DNA extracted from cultured pathogens previously characterized with traditional microbiology techniques and sequencing was used. Analytical specificity and sensitivity were investigated using DNA extracted from whole blood artificially spiked with known cell density of microorganisms. The final prototype showed the ability to identify 22 species of bacteria, and 5 species of *Candida spp.* Additionally, universal probes were added to differentiate Gram-negative and Gram-positive bacteria and the genus *Candida*. The detection limit for the tested microorganisms is between 10 and 1000 CFU/mL, which has clinical value considering reported bacteria density in peripheral blood of septic patients. The test may provide faster and more accurate detection of the sepsis-causing agents, allowing more efficient treatment before progression to septic shock and potentially contributing to reduce mortality rates. It also has the benefit of promoting antimicrobial stewardship that limits the selection of resistant strains.

Lista de Figuras

Figura 1 - Pontuação SOFA.	15
Figura 2 - Plataforma In-check™ (STMicroelectronics).....	23
Figura 3 - Fluxograma do procedimento de contaminação artificial do sangue.	31
Figura 4 - Procedimento da contaminação artificial com <i>spread plate</i>	32
Figura 5 - Representação esquemática do resultado da hibridização do Protótipo Sepsis1.0.....	34
Figura 6 - Painel de micro-organismos do teste	35
Figura 7 - Iniciadores utilizados na reação multiplex de amplificação do protótipo Sepsis1.0.....	37
Figura 8 - Iniciadores utilizados na reação multiplex de amplificação do protótipo Sepsis2.0.....	37
Figura 9 - Iniciadores utilizados na reação multiplex de amplificação do protótipo Sepsis3.0.....	38
Figura 10 - Iniciadores utilizados na reação multiplex de amplificação do protótipo final, SepseDx.	39
Figura 11 - Representação do alinhamento de uma região do rDNA 16S bacteriano e exemplo de iniciadores e sonda.	40
Figura 12 - Testes do protótipo Sepsis1.0.....	40
Figura 13 - Testes protótipo Sepsis2.0.....	41
Figura 14 - Testes do protótipo Sepsis3.0.....	43
Figura 15 - Painel de micro-organismos.....	44
Figura 16 - Compilação dos resultados numéricos obtidos para as sondas selecionadas a partir dos protótipos Sepsis1.0, Sepsis2.0 e Sepsis3.0.....	45
Figura 17 - Representação esquemática do microarranjo de hibridização do protótipo SepseDx.....	45
FIGURA 18 - Multiplex das reações das câmaras A e B.....	46
Figura 19 - Otimização das condições da reação (método Taguchi).	46
Figura 20 - Comparação da combinação prévia com a combinação proposta pelo método Taguchi.....	47
Figura 21 - Teste de assimetria de iniciadores GyrB.....	48
Figura 22 - Teste de assimetria de iniciadores GyrB.....	48

Figura 23 - Teste de concentração de iniciadores.....	49
Figura 24 - Teste de temperatura de anelamento.	50
Figura 25 - Teste de protocolo de amplificação.....	51
Figura 26 - Testes de concentração de sais de magnésio na mistura de PCR IBMP 2X.....	52
Figura 27 - Testes de estabilidade de MasterMix 1 mês a -20°C.....	53
Figura 28 – Curva de contaminação com <i>E. coli</i>	54
Figura 29 - Curva de contaminação com <i>S. aureus</i>	55
Figura 30 - Limites de detecção dos representantes escolhidos do painel.	56
Figura 31 - Reprodutibilidade do limite de detecção	57
Figura 32 – Heatmap de especificidade do SepseDx.....	58
Figura 33 - Comparação do teste SepseDx com a hemocultura	59

Sumário

1.	Introdução	10
1.1	Sepse e Choque Séptico	10
1.2	Epidemiologia	11
1.3	Diagnóstico Clínico	14
1.4	Tratamento	15
1.5	Diagnóstico Laboratorial	16
1.5.1	Detecção	16
1.5.2	Identificação	17
2.	Objetivos	22
2.1.	Objetivo geral.....	22
2.2.	Objetivos específicos	22
3	Materiais e Métodos	23
3.1	Aspectos éticos.....	23
3.2	Plataforma	23
3.3	Micro-organismos e cultivo	24
3.4	Extração de DNA.....	24
3.5	Sequenciamento de DNA	25
3.6	Iniciadores e Sondas	26
3.6.1	Protótipos Sepsis 1.0 e 2.0.....	26
3.6.2	Protótipo Sepsis 3.0.....	27
3.6.3	SepseDx	27
3.7	Reação Multiplex	27
3.7.1	Concentração de Reagentes	27
3.7.2	Concentração e Razão de Iniciadores.....	28
3.7.3	Protocolo de Amplificação.....	29
3.7.4	Módulo de Amplificação IBMP	30
3.7.5	Estabilidade do MasterMix.....	30

3.8	Validação Laboratorial	30
3.8.1	Sensibilidade Analítica	30
3.8.2	Especificidade Analítica	32
3.8.3	Estudo Pré-Clínico.....	33
4	Resultados e Discussão.....	34
4.1	Plataforma	34
4.2	Micro-organismos e cultivo	34
4.3	Extração de DNA.....	35
4.4	Sequenciamento de DNA	36
4.5	Iniciadores e Sondas	36
4.5.1	Sepsis 1.0 e 2.0	36
4.5.2	Sepsis 3.0	38
4.5.3	SespseDx.....	39
4.6	Reação Multiplex	45
4.6.1	Concentração de Reagentes	46
4.6.2	Razão e Concentração de Iniciadores.....	47
4.6.3	Protocolo de Amplificação.....	50
4.6.4	Módulo de Amplificação IBMP	51
4.6.5	Estabilidade do MasterMix.....	52
4.7	Validação Laboratorial	53
4.7.1	Sensibilidade Analítica	53
4.7.2	Especificidade Analítica	57
4.7.3	Estudo Pré-Clínico.....	58
5	Conclusão	61
6	Perspectivas.....	62
7	Referências	63
	Anexos	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE E CHOQUE SÉPTICO

A sepse é a disfunção de múltiplos órgãos causada por uma resposta desregulada do organismo a uma infecção. Também conhecida como infecção generalizada, ela se origina de uma infecção inicial que pode ter focos em diferentes órgãos. Essa infecção desencadeia uma resposta imune desregulada, por motivos ainda não totalmente esclarecidos, e este processo leva a disfunção múltipla de órgãos que pode produzir um estado de doença crônico e crítico caracterizado por disfunção imune e catabolismo (Gotts and Matthay 2016).

Como foi observado por Sir William Osler em 1921, o paciente morre em decorrência da resposta do seu corpo e não como consequência da infecção em si. Considerada uma forma de envenenamento do sangue devido a presença de organismos patogênicos e suas toxinas na corrente sanguínea e nos tecidos (Martin 2012). São exemplos destas toxinas, endotoxinas como os lipopolissacarídeos, componentes membrana externa de bactérias Gram-negativas, induzem inflamação descontrolada. A inflamação é mediada por substâncias produzidas pelas células do sistema imune, principalmente macrófagos ativados pelo contato com patógenos.

São mediadores inflamatórios, as citocinas, por exemplo as interleucinas-1, -6 e -8, o fator de necrose tumoral (TNF), as prostaglandinas (PGs) e radicais livres como o óxido nítrico (NO). A super produção desses mediadores inflamatórios provoca coágulos nos vasos sanguíneos assim como extravasamento de fluido para os tecidos. Isso resulta em perfusão inadequada de nutrientes e oxigênio para os órgãos que entram em disfunção. Danos ao tecido também dão acesso dos patógenos e conseqüentemente das endotoxinas à circulação (Fracasso, 2008).

Quando na corrente sanguínea, os patógenos se multiplicam rapidamente, acumulando endotoxinas no sangue, induzindo células brancas do organismo inteiro a liberar mediadores de inflamação de forma maciça. Piora então o quadro de hipotensão e hipóxia dos tecidos que caracteriza o choque e pode progredir para a óbito (Fracasso, 2008).

Choque é caracterizado pela necessidade de vasopressores catecolaminas, como dopamina, adrenalina e noraadrenalina, devido a profundas anormalidades circulatórias e celulares/metabólicas com maior taxa de mortalidade associada

(Rhodes et al. 2017). Sinais de choque séptico são coma, anúria e insuficiência cardíaca e respiratória causados pela lesão celular irreversível gerada pela privação de substrato energético (Fracasso 2008).

A sepse foi inicialmente definida em 1991, num consenso que ficou eventualmente conhecido como Sepsis-1, como SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) associada a uma infecção. SIRS tem como sintomas frequência respiratória, cardíaca, temperatura e contagem de células brancas aberrantes (Bone et al. 1992). Em 2001, outro esforço científico para sua definição, o Sepsis-2, adicionou uma grande gama de outros sintomas para representar diversas potenciais manifestações no sistema causados pela infecção (Levy et al. 2003). Porém, isso fez com que houvesse maior confusão com os critérios de doenças não infecciosas, especialmente em ambiente de UTI (Sprung, Trahtemberg, 2017).

Mais recentemente, um terceiro consenso publicou o Sepsis-3 em que pacientes são categorizados uma vez que a infecção é presumida de acordo com seus sinais de disfunção orgânica (Singer et al. 2016). Esta nova definição é indicada para avaliar os pacientes enquanto as definições anteriores são indicadas no reconhecimento, porque sua abrangência, para pacientes possivelmente não infectados, é uma vantagem que aumenta sua sensibilidade quando comparada com a nova definição, possibilitando tratamento precoce (Sprung, Trahtemberg 2017).

A organização mundial da saúde reconheceu em 2017 a sepse como Prioridade em Saúde devido ao seu atual impacto global e as falhas detectadas na sua prevenção, tratamento e diagnóstico. Através dessa medida, a OMS pressiona os líderes dos países participantes a se conscientizar e intensificar seus esforços no seu combate (*Seventieth World Health Assembly* 2017). Sendo assim, a pesquisa nessa área será beneficiada no futuro próximo.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A sepse, em estudos recentes, foi a maior causa de mortes em hospitais, ultrapassando infarto do miocárdio e câncer num estudo dos EUA (Vincent Liu, Escobar, and John D. Greene 2014). No mundo, estima-se que 50 milhões de pessoas são afetadas todos os anos, levando a morte de 14 mil pessoas todos os dias (Fleischmann et al. 2016).

Nos EUA, foram reportados 836.000 casos anuais com taxas de mortalidade de aproximadamente 16% dos casos e o causador de hospitalização com maior custo associado (Elixhauser, Friedman, Stranges 2011). Dados mostram aumento dessa incidência em 8,7% ao ano. (Martin et al. 2003). Um estudo extensivo do tipo coorte, *Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients* (SOAP), analisou dados de 198 UTIs em 24 países na Europa, mostrando 35% de prevalência da condição entre pacientes de UTI e taxa de mortalidade de 27% (Vincent et al. 2006).

No Brasil, um grande estudo recente publicado pelo Instituto Latino Americano da Sepse aponta para números ainda maiores, respondendo por uma incidência de 30.2% dos pacientes em UTI e taxa de mortalidade de 55.7% (Machado et al. 2017).

A taxa de mortalidade brasileira está acima da média mundial, sabendo que certos países desenvolvidos, como a Austrália tem taxa de mortalidade de 18%, sendo a média brasileira de 54.5% e em alguns estados como o da região Centro-oeste, está em 70% (ILAS, 2014).

Estima-se cerca de 400 mil novos casos todos os anos no Brasil que resultam em mais de 240 mil óbitos. Mortes associadas a sepse foram 16,46% de todas as mortes reportadas no Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) para o ano de 2010 (Taniguchi et al. 2014).

Está associada a um custo de aproximadamente R\$20 bilhões anuais para o Sistema Único de Saúde (ILAS, 2014). Representando então um alto custo financeiro, com grande porcentagem dos gastos de UTIs gerados principalmente pelo longo tempo de internação dos pacientes, que é em média 15 dias (Sales Júnior et al. 2006). E que a maior parte desse custo está associada a pacientes que evoluem para óbito, sendo a taxa de mortalidade brasileira maior que 50%.

Sua incidência tem aumentado na última década devido ao envelhecimento da população, maior taxa de intervenções cirúrgicas e o desafio de tratar micro-organismos multiresistentes aos antibióticos disponíveis. Além disso, 72% dos episódios de sepse reportados num trabalho de prospecção de pacientes em UTI, foram relacionados a infecções hospitalares (Carvalho et al. 2010).

Pacientes de idade avançada, imunodeprimidos, com insuficiência respiratória, utilizando cateter intravenoso ou ventilação mecânica tem maior incidência dentre os pacientes em UTI (Vught et al. 2016).

Sepse materna também apresentou aumento recente de incidência devido ao maior número de grávidas acima de 40 anos, com comorbidades como obesidade, diabetes tipo 2 e hipertensão. Inseminação artificial e avanços em medicina fetal contribuem para o aumento da prevalência de casos de gravidez de risco que tem maior prevalência de sepse (Cordioli et al. 2013). O aumento da prática do parto cirúrgico ou cesariana também aumenta o risco de sepse puerperal, que representa pelo menos 75 mil mortes de mães no mundo por ano, principalmente em países subdesenvolvidos (van Dillen et al. 2010).

Sepse neonatal representa uma das 10 principais causas de morte de neonatais, especialmente nos primeiros 3 dias de vida. Ela também pode desencadear perda de audição, convulsões e anormalidades do neurodesenvolvimento (Weston et al. 2012). Esta pode ser causada por transmissão vertical do patógeno pela mãe durante o parto ou transmissão horizontal de patógenos adquiridos após o parto, sendo este segundo caso mais difícil de reconhecer (Shah, Padbury 2014).

As fontes de infecção são majoritariamente o trato respiratório com 69% dos casos e o abdômen com 23,1% (Sales Júnior et al. 2006). Pode ser resultado de uma infecção em qualquer lugar do corpo como pneumonia, apendicite ou infecção do trato urinário.

Os principais causadores reportados têm sido bactérias gram-negativas como *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. No entanto, também pode ser desencadeado pela presença de fungos, vírus e parasitas (Taniguchi et al. 2014).

Outro aspecto que aumenta a importância da sepse é seu impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes após episódio séptico. A maior parte dos pacientes hospitalizados com sepse (62%) são readmitidos em hospitais dentro de 30 dias (Fingar and Washington 2006). Sobreviventes de sepse também tem uma menor expectativa de vida, sofrem do transtorno de estresse pós traumático (TEPT), com perda de mobilidade, dor crônica, fadiga, disfunção de órgãos, alta taxa de necessidade de amputação e têm 42% mais chance de cometer suicídios (Winters et al. 2010).

1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Antes da definição detalhada acima, sepse foi historicamente definida como uma condição difícil de ser identificada. O escritor renascentista Maquiavel, em seu livro *O Príncipe*, descrevia febre héctica, uma complicação de tuberculose pulmonar, como inicialmente difícil de reconhecer e fácil de tratar que, quando progredia sem os devidos cuidados, se tornava fácil de reconhecer e difícil de se tratar.

São sinais clínicos de sepse, apesar de inespecíficos e de se apresentarem de forma muito heterogênea (Levy et al. 2003) :

- Febre acima de 38°C ou hipotermia abaixo de 36 °C que pode levar a tremores ou rigidez;
- Estado mental alterado com confusão, ansiedade ou letargia, fadiga e sonolência;
- Dificuldade de respirar, com frequência respiração acelerada;
- Frequência de batimento cardíaco elevado;
- Contagem de glóbulos brancos abaixo de 4000 células/ μ L ou acima de 12000 células/ μ L de sangue;
- Náusea e vômito;
- Marcadores bioquímicos da resposta inflamatória como proteína C reativa ou pró-calcitonina aumentados.

Para reconhecer a sepse, são analisados além da identificação do foco inicial de infecção, marcadores clínicos para disfunção de órgãos. O SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) da Figura 1 dá uma pontuação para o estado do paciente. Esta pontuação leva em consideração a qualidade da circulação, metabolismo e estado mental. Pacientes com pontuação igual ou maior que 2 são considerados sépticos.

Figura 1 - Pontuação SOFA.

Pontuação SOFA		1	2	3	4
Respiração	PaO ₂ /FIO ₂ (mm Hg)	<400	<300	<220	<100
	SaO ₂ /FIO ₂	221 - 301	142 - 220	67 - 141	<67
Coagulação	Plaquetas x 10 ³ /mm ³	<150	<100	<50	<20
Fígado	Bilirrubina (mg/dL)	1.2 - 1.9	2.0 - 5.9	6.0 - 11.9	>12.0
Rim	Creatinina (mg/dL)	1.2 - 1.9	2.0 - 3.4	3.5 - 4.9	>5.0
	Débito Urinário (mL/d)			<500	<200
Cardiovascular	Hipotensão	PA<70	Dopamina ≤5* ou dobutamina	Dopamina >5* ou Noradrenalina ≤0.1*	Dopamina >5* ou Noradrenalina >0.1*
Sistema Nervoso Central	Escala de Coma de Glasgow	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6

*Vasotativos administrados por pelo menos 1 hora (µmg/kg/min), PA - Pressão Arterial, PaO₂ - Pressão parcial do oxigênio no sangue arterial, SaO₂ - Saturação arterial periférica de oxigênio, FIO₂ - Fração de oxigênio no ar inspirado. Fonte: Adaptado de Jones, Trzeciak, Kline 2010.

Pacientes em choque séptico são aqueles em que é necessário o uso de vasopressores como dopamina para manter a pressão arterial acima de 65mmHg e nos quais o lactato dosado fica acima de 2mmol/L de sangue apesar do uso de ressuscitação fluídica adequada. (Shankar-Hari et al. 2016)

1.4 TRATAMENTO

Uma vez diagnosticada a sepse, inicia-se o tratamento com ressuscitação fluídica, administração de antibióticos, ventilação protetora do pulmão, atenção para o uso de produtos do sangue e estratégias para evitar infecções nosocomiais (Gotts and Matthay 2016).

A ressuscitação fluídica consiste na implementação de 30 ml/kg de fluido, principalmente os cristalóides como solução salina (NaCl 0,9%) que fazem com que haja expansão volêmica, recuperando perfusão tecidual e o conseqüente aumento da oferta de oxigênio aos tecidos (Corrêa et al. 2015).

Também é determinante para impedir a progressão para choque séptico e aumentar a sobrevivência do paciente o controle da fonte de infecção, especialmente quando a penetração de antimicrobiano neste foco é subótimo (Leligdowicz et al. 2014).

A administração de antibiótico apropriado dentro das primeiras 4 horas do início da sepse mostrou diminuir o tempo de hospitalização por 2 dias e uma diminuição da

mortalidade absoluta em 24% além de ultimamente induzir melhor desfecho dos pacientes (Chun et al. 2015).

Estudos mostraram que o tratamento antimicrobiano inicial inadequado ocorre em cerca de 20% dos casos de choque séptico e este resulta em uma redução de cinco vezes na taxa de sobrevivência dos pacientes (Kumar et al. 2009). E a cada hora que o paciente não recebe o tratamento adequado por falta de diagnóstico, seu risco de óbito aumenta em 7.6% (Kumar et al. 2006).

É imprescindível então um método diagnóstico rápido e preciso como é preconizado pelo manual de orientação da *Surviving Sepsis Campaign* que indica que a administração do antibiótico intravenoso adequado deve ocorrer 1 hora após reconhecimento de sepse (Rhodes et al. 2017).

Com informação que possibilite a seleção do agente antimicrobiano correto, evita-se tratamento com antibióticos ineficientes. Isto melhora o prognóstico do paciente, desacelera a aquisição de resistência pelos patógenos e diminui custo geral hospitalar associado (Cleven et al. 2006).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.5.1 DETECÇÃO

Classicamente feita através da hemocultura, que consiste na coleta de amostra do sangue do paciente e sua incubação em meio de cultivo líquido apropriado para que a proliferação dos micro-organismos infectando o paciente seja detectável, tanto anaeróbios quanto aeróbios (Guido et al. 2016). O meio utilizado permite o crescimento das bactérias e fungos com maior importância clínica com limite de detecção de até 1 Unidade Formadora de Colônia numa amostra de 1 ml de sangue (Fenollar, Raoult 2007).

O diagnóstico por hemocultura gera resultados positivos em somente 28 a 60% dos casos de sepse (Vincent et al. 2006) e devido a dificuldade deste teste de detectar micro-organismos fastidiosos este diagnóstico pode levar dias. Pacientes com suspeita da candidemia têm resultados positivos para hemocultura em somente 50% dos casos (Baron et al. 2013).

Um estudo mostrou que em média a hemocultura demanda 15 horas para dar positiva acusando crescimento microbiano, e mais 36 e 11 horas para identificação do patógeno e teste de susceptibilidade a antibióticos, respectivamente. Isso resulta

num tempo para resultado final ou *turn around time* (TaT) a partir da coleta da amostra de 51 horas para identificação e 62 horas para o resultado de padrão de resistência a antimicrobianos (Chun et al. 2015).

A hemocultura então, não é um padrão ouro adequado, seus resultados demandam tempo demais, são incompletos e potencialmente errôneos fazendo com que as recomendações sejam de ignorá-los, em muitos casos. Ainda assim, ela é essencial para executar teste de susceptibilidade antimicrobiana e para confirmar a presença de patógenos viáveis no sangue (Paolucci, Landini, Sambri 2010).

Atualmente é, em sua maior parte, executada de forma automatizada com equipamentos como o Bact/ALERT™ (bioMérieux). Neste método automatizado, a produção de CO₂ decorrente de pequeno crescimento microbiano e metabolização dos substratos do meio de cultivo desencadeia uma mudança de cor de um sensor localizado no fundo da garrafa de cultivo. Essa mudança de cor é medida através do uso do feixe de luz refletido do sensor. A leitura é enviada para um computador com um software que compara a medida com o nível inicial de CO₂ da garrafa podendo acusar uma amostra positiva para crescimento microbiano (Jimenez et al. 2012).

1.5.2 IDENTIFICAÇÃO

Após resultado positivo para hemocultura, amostras são subcultivadas por plaqueamento em meio de cultivo seletivo solidificado e novamente incubadas para permitir isolamento, amplificação e identificação dos patógenos (Engelkirk, Duben-Engelkirk 2008).

Também são feitos testes de coloração para diferenciar Gram-positivos e Gram-negativos e testes bioquímicos para estabelecer a identidade do microrganismo.

Avanços nos métodos clássicos de identificação de micro-organismos também levaram à automatização dos testes bioquímicos e enzimáticos como por exemplo, o equipamento Vitek™ (bioMérieux). Neste, um cartucho contendo diferentes caldos bioquímicos e controle de crescimento e viabilidade do inóculo, recebe uma suspensão microbiana em solução salina com densidade pré determinada. Estas células de reação dão resultados quanto a presença de enzimas para substratos que ajudam na identificação dos micro-organismos através do seu perfil metabólico (Engelkirk, Duben-Engelkirk 2008).

Existem outras alternativas para reduzir o tempo até o resultado final a partir de uma amostra da hemocultura positiva. Por exemplo, a espectrometria de massas (*matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) *time of flight* (TOF)) em que sinais de espectros de massas obtidos de espécie pós cultura são comparados com o perfil proteômico de espectros padrões de referência para se obter a identificação (La Scola, Raoult 2009).

Este tipo de plataforma funciona através da ionização de biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e sacarídeos que são separados num campo elétrico de acordo com sua relação massa/carga (Stevenson, Drake, and Murray 2010).

O Sepsityper Kit™ (Bruker) é um exemplo de teste de espectrometria de massas, estes têm a vantagem de ser mais baratos e menos laboriosos que os métodos convencionais e outros sendo desenvolvidos (Schieffer et al. 2014).

Atualmente, tem limitações quanto a identificação de amostras polimicrobianas e gram-positivas. Este problema deve ser resolvido com melhoras dos bancos de dados e da acurácia da metodologia em si nos próximos anos (Paolucci, Landini, Sambri 2010).

No entanto, a maior limitação é que este método não pode ser aplicado diretamente ao sangue, devido a sua baixa sensibilidade, requerendo um passo de subcultivo que demanda tempo precioso (Mancini et al. 2010).

Outra alternativa são ensaios de hibridização *in situ*, como a técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) que utilizam sondas marcadas para detectar sequências específicas de ácidos nucleicos. QuickFISH é um exemplo deste tipo de teste, com resultado final em 26 minutos. Seu conjunto de sondas tem cobertura para 90% dos patógenos causadores de bacteremia, porém cada teste tem limite de até três patógenos por vez, o que requer múltiplos testes para identificar corretamente o causador da sepse (Jansen et al. 2000).

Métodos também incluem o uso de hibridização do DNA extraído de hemocultura positiva, como no Verigene™ (Nanosphere Inc.) que possui painéis para bactérias gram-positivas e gram-negativas com marcadores de resistência. Tem TaT de 2.5 horas o que diminui o tempo de identificação e resultado final de susceptibilidade a antimicrobianos em até 42h. No entanto tem problemas com infecções polimicrobianas e sensibilidade entre 89 e 92.6% além de não ter painel para fungos (Beal et al. 2013).

O FilmArray (Biomérieux) faz uso de um PCR *nested* com iniciadores pouco específicos seguido de várias reações *singleplex* paralelas e simultâneas em poços com iniciadores para patógenos ou regiões genômicas específicos. Durante esta segunda rodada de PCR, a formação de amplicon de cada poço é monitorada em tempo real por um corante intercalador que constitui um qPCR multiplex (Khlif et al. 2009).

Este apresenta sensibilidade inferior ao Verigene e ambos são limitados pelo seu painel, não podendo identificar todos os patógenos causadores de sepsis e sendo assim, não podendo substituir a hemocultura (Martin 2012).

Microarranjos também foram desenvolvidos para detectar rRNA a partir de hemoculturas positivas para identificação em nível de espécie (Marlowe et al. 2003).

Porém estes métodos não possibilitam a caracterização além do nível de espécie, com informações sobre a cepa e tem limitação quanto a processividade de amostras. Para isso, microarranjos de DNA associados a amplificação multiplex de diferentes genes são estudados (Cleven et al. 2006).

Um exemplo de microarranjo de DNA associado a amplificação multiplex é o teste Prove-it™ Sepsis (Mobidiag, Espoo, Finland), que dá resultado final em 3 horas após hemocultura positiva em 86% das hemoculturas positivas (Tissari et al. 2009). Sua nova versão, o StripArray v2.0 teve seu painel expandido para incluir *Candidas*, o que possivelmente aumentou sua sensibilidade em relação a primeira versão.

No entanto, para promover programas de *stewardship* de antibióticos, métodos de detecção e identificação devem possibilitar resultados em menor tempo do que o demandado para hemocultura. Logo, eles devem ser aplicados nas amostras de sangue total diretamente, sem crescimento prévio, permitindo assim a implementação de terapia específica mais cedo e reduzindo taxa de mortalidade associada (Kothari, Morgan, and Haake 2014).

Para detecção de *Candidas*, o teste T2Candida (T2Biosystems) envolve a amplificação mediada por nanopartículas diretamente do sangue em até 3 horas com limite de detecção de no máximo 3 UFC/mL com sensibilidade de 100% (Neely et al. 2013). O fabricante estuda lançar também um teste com painel para bactérias. Idealmente, a alternativa molecular para sepse deveria cobrir ambos os grupos ao mesmo tempo, na mesma amostra.

O mais promissor entre estes avanços é a detecção por PCR multiplex diretamente do sangue (Paolucci, Landini, and Sambri 2010). O teste mais difundido foi o sistema Light Cycler SeptiFast (Roche Molecular Systems) que consiste em PCR de amplo espectro dos genes que codificam para os rRNAs 16S e 23S de bactérias e 18S de fungos e análise das curvas de *melting* resultantes. Seu limite de detecção é de 3 a 30 UFC/mL e o TaT é de 6 horas. Sua sensibilidade, no entanto, foi reportada como variando de 62 a 70%, sendo este um limitante para sua aplicação clínica (Nieman et al. 2016).

O SeptiFast possui a vantagem de, além de detectar a maior parte de amostras cultura positivas, detecta algumas amostras cultura negativas que possuem significância clínica. Casos estes que não seriam detectados somente pela hemocultura (Ecker et al. 2010). Porém, outros estudos mostram que 20 a 30% de amostras cultura positivas não são detectadas mesmo quando o patógeno é coberto pelo painel do teste (Reinhart et al. 2012).

Outro teste, o SepsiTest™ (Molzym), envolve identificação por sequenciamento pós detecção por amplificação o que totaliza um TaT de 8 a 12 horas com limite de detecção entre 20 e 460 UFC/mL (Mühl et al. 2010).

Em teste com amostras de pacientes com suspeita de sepse, teve sensibilidade de 87% e detectou bacteremia em amostras cultura negativas em que antimicrobianos foram administrados antes da coleta. Isto indica detecção de células não viáveis e uma grande vantagem em relação a hemocultura (Wellinghausen et al. 2009).

O VYOO™ (Analytik Jena) associa PCR multiplex com análise do DNA amplificado em microarranjo com limite de detecção entre 5 e 100 UFC/ml para 34 espécies de bactérias, 7 fungos e 5 marcadores de resistência. Sensibilidade reportada foi de 60% para identificação do agente causador, estudos não foram feitos quanto a sensibilidade dos marcadores (Bloos et al. 2012).

Sequenciamento de nova geração também está sendo aplicado a problemática do diagnóstico da sepse com o exemplo do kit *Credence Genomics Rapid Infection Detection*. Este faz uso da análise metagenômica do 16S rRNA bacteriano e da região ITS1 de fungos com concordância acima de 90%. No entanto, ele apresenta resultados limitados pela sua baixa concordância de amostras negativas (Abayasekara et al. 2017).

Conclui-se que não há ainda um método que substitua a hemocultura e que tenha sensibilidade e especificidade adequada para suplantá-la, ainda que proporcionem resultados em menor tempo. Nenhum dos métodos exemplificados acima possui performance adequada para serem implementados na rotina clínica, seja por baixa sensibilidade, concordância ou a dificuldade e preço de processamento.

Com o crescimento da incidência e mortalidade de sepse, e a menor disponibilidade de antibióticos para tratá-la, é necessário que sejam desenvolvidas ferramentas para aplacar seu impacto.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar e otimizar o sistema de detecção de um multitestes molecular em plataforma Lab-on-a-Chip para diagnóstico dos principais agentes causadores de sepse.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver iniciadores para a amplificação de regiões conservadas entre os micro-organismos cobertos no painel para o teste da sepse;
2. Desenvolver sondas específicas dentro dos amplicons selecionados no objetivo 1;
3. Otimizar o protocolo de PCR e hibridização no biochip;
4. Avaliar a especificidade e a sensibilidade analíticas do teste com micro-organismos isolados a partir de amostras clínicas do HC-UFPR;
5. Formular o próprio mastermix para reação de PCR e compará-lo com produtos comerciais;
6. Realizar avaliação do teste com amostras clínicas de pacientes da UTI do HC-UFPR, contrastando a eficiência do teste com os resultados de hemocultura.

3 MATERIAIS E METÓDOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CEP-HC-UFPR), sob registros CAAE: 03377612.5.0000.0096 e CAAE: 32074614.5.0000.0096 (Anexo1).

3.2 PLATAFORMA

A plataforma adotada para desenvolvimento da estratégia de detecção dos micro-organismos causadores de sepse é uma plataforma miniaturizada tipo lab-on-a-chip chamada In-Check (STMicroelectronics) e esta é composta pelo:

- I. Biochip, que consiste em um MEMS (*Microelectromechanical System*) de silício e possuidor de duas câmaras para PCR independentes integradas a uma área de microarranjo com 126 spots formados por sondas ligadas a sua superfície;
- II. TCS (Temperature Control System) que controla a temperatura do chip;
- III. Reader que captura e interpreta a imagem do microarranjo no chip;
- IV. Leitor de código de barras que identifica o chip e carrega as informações para execução do teste específico;
- V. Computador com softwares para carregar o protocolo do teste, contemplando amplificação e hibridização e interpretação do resultado a partir da captura da imagem do microarranjo.

Estes componentes estão ilustrados na Figura 2 abaixo:

Figura 2 - PLATAFORMA IN-CHECK™ (STMICROELETRONICS)



Disponível em: eenewseurope.com

Fabricada pela Veredus Laboratories, empresa de sede em Singapura que desenvolve plataformas *lab-on-a-chip* que combinam *Micro-Electro Mechanical Systems* (MEMS) com microfluídica para integrar amplificação de DNA *multiplex* com detecção em microarranjo.

Na plataforma já foram desenvolvidos testes para detecção de Influenza, patógenos da indústria alimentícia, tuberculose, armas biológicas, patógenos aviários e Síndrome respiratória por coronavírus do Oriente Médio (“Veredus Laboratories ©” 2016).

3.3 MICRO-ORGANISMOS E CULTIVO

Inicialmente, foi delineado o painel dos patógenos contemplados pelo teste por especialistas na epidemiologia da sepse. Este painel representa os microorganismos com maior importância clínica em infecções da corrente circulatória e está representado na Figura 6.

Isolados clínicos destes micro-organismos foram doados e cultivados pelo departamento de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR). Estes isolados são provenientes de subcultivos de hemoculturas positivas da rotina do hospital para bactérias e fungos caracterizados por ensaios bioquímicos fenotípicos.

Subcultivos foram realizados em meio de cultivo solidificado e incubados a 37°C *overnight* antes de terem seu DNA extraído. O meio utilizado foi o *Plate Count Agar* (PCA) (Merck™) para cultivo de bactérias com exceção de *Streptococcus* spp. beta-hemolíticos para os quais foi utilizado meio *Agar-sangue* (Mbio™). Para as *Candidas* spp. foi utilizado *Ágar Sabouraud* (Merck™) rico em peptonas e com pH ácido que inibe crescimento bacteriano.

Estes isolados também foram preservados numa coleção congelada a -80°C em meio de congelamento líquido acrescido de 25% de glicerol para permitir seu acesso futuro.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

Num estudo prévio do Grupo Sepse, foram comparados diferentes métodos de extração para estabelecer qual proporcionaria DNA de patógenos em sangue de

melhor qualidade para teste em PCR tempo real. Dentre os kits testados, os do fabricante Molzym foi o que obteve melhores resultados (Dalla-Costa et al. 2017).

O DNA dos isolados clínicos da coleção foi então extraído com uso do kit comercial MoYsis™ Complete5 (Molzym, Bremen, Germany) para as amostras bacterianas e o kit UMD-Universal IVD CE (Molzym, Bremen, Germany) para amostras fúngicas. Ambos os kits funcionam como ferramentas pré-analíticas com objetivo de remover excesso de DNA humano e de inibidores de PCR com reagentes livre de DNA contaminante, bem como extração e purificação do DNA microbiano.

Eles proporcionam lise enzimática seletiva prévia das células sanguíneas e tratamento com nucleasse para eliminação do DNA em suspensão, ao passo que as células microbianas são preservadas. Então, em um segundo estágio, um amplo espectro de micro-organismos, gram-negativos, gram-positivos e fungos pode ser lisado e seu DNA extraído e purificado, aumentando a sensibilidade dos testes moleculares de detecção subsequentes (Loonen et al. 2013). Estes kits têm capacidade de processar amostras de 0.2 a 10ml de volume e têm a possibilidade de serem feitos manualmente ou de forma automatizada.

Utilizando estes kits, DNA foi extraído de suspensões de micro-organismos em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) ou sangue em concentrações estabelecidas através do uso do densitômetro Densimat™ (Biomérieux Biotechnology).

3.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Foram selecionados de duas a três cepas de cada um dos integrantes do painel da coleção de isolados clínicos do Hospital de clínicas que tiveram seu DNA extraído. O DNA extraído foi usado para sequenciar estes micro-organismos e possibilitar o desenho de iniciadores e sondas juntamente com uso de sequências retiradas de bancos de dados (Anexo 2).

Para o sequenciamento foram utilizados os iniciadores de amplificação do DNA ribossomal LGMP5 (5'ACTCCTACGGGAGGCAGC3') e LGMP10 (5'CCCGGGAACGTATTCACCG3') para bactérias e LGMP11 (5'CGTAGGTGAACCTGCGGAA G3') e LGMP13 (5'CTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCA GC3') para fungos.

Os produtos amplificados por PCR foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR CleanUp System (Promega) e sequenciados pela empresa

Coreana MacroGen, através do método de Sanger utilizando-se o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Life Technologies).

Os contigs foram montados e a qualidade das sequências foram obtidas com a ferramenta online PHPH (Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

A identificação dos micro-organismos foi feita através da ferramenta BLAST com sequências de nucleotídeos do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

3.6 INICIADORES E SONDAS

3.6.1 PROTÓTIPOS SEPSIS 1.0 E 2.0

Os iniciadores e as sondas foram desenvolvidos com auxílio de alinhamento de sequências no software MEGA6 e análises termodinâmicas para avaliar propriedades de hibridização dos iniciadores e sondas com seus respectivos alvos bem como a interação entre eles, com o auxílio do software Visual OMP (DNA Software). Foram utilizadas sequências disponíveis em bancos de dados genéricos e especializados e também sequências obtidas a partir do sequenciamento dos isolados clínicos para montar um alinhamento e prospectar iniciadores e sondas.

Foram selecionados da literatura candidatos de genes já utilizados na identificação de patógenos com as características desejadas. Áreas conservadas para parear com os iniciadores que flanqueiam áreas variáveis em que as sondas foram desenhadas para distinguir diferentes espécies. Inicialmente nos protótipos 1.0 e 2.0, os alvos foram 16S rDNA de bactérias, ITS1 e ITS2 (*internal transcribed spacer*) do rDNA de fungos, beta-globina humana, utilizado como controle de processamento da amostra (sangue humano) e sequências artificiais AT1 e AT2, as quais são utilizadas como controle das reações de PCR, sendo um controle para amplificação em cada câmara do chip.

As sondas testadas foram avaliadas quanto às intensidades de sinais específicos e inespecíficos frente aos micro-organismos analisados. Os iniciadores reverse são marcados com fluoróforo Cy5 e a hibridização do produto amplificado no microarranjo dá origem a um sinal de intensidade que varia de 257 a 65535 (escala arbitrária). Duas cepas, em média, de cada micro-organismo foram testadas para cada sonda em duplicata de chips independentes.

As reações de PCR multiplex foram primeiramente avaliadas em termocicladores convencionais quanto a sua combinação e distribuição entre as duas câmaras de amplificação seguida por otimização no chip.

Os protótipos foram testados com duas cepas de cada um dos micro-organismos presentes no painel e o DNA foi extraído de suspensão de células em PBS.

3.6.2 PROTÓTIPO SEPSIS 3.0

No protótipo 3.0 novas regiões foram selecionadas para possibilitar a distinção de espécies muito geneticamente semelhantes entre si dentro destes genes anteriormente testados. Dentre estas espécies, principalmente estão as bactérias da família Enterobacteriaceae. Foram elas as regiões codificadoras para os genes Gyrase A, Gyrase B, Tuf e Nuc que é um gene exclusivo de *Staphylococcus aureus*. Estas regiões codificam proteínas do complexo de replicação do DNA, o que explica sua alta taxa de conservação.

Foram construídos alinhamentos para estas regiões com sequências coletadas de bancos de dados do GenBank utilizando o Software MEGA6.

3.6.3 SEPSIDX

Análises foram feitas da compilação dos resultados das sondas testadas nos protótipos anteriores para selecionar as sondas do protótipo final do chip. Este foi utilizado na avaliação laboratorial final com DNA extraído a partir de sangue contaminado com quantidades conhecidas dos micro-organismo contemplados no painel e na avaliação clínica com amostras de pacientes de UTIs cedidas pelo HC-UFPR.

A divisão dos pares de iniciadores entre as câmaras também foi revista para inserir os iniciadores das novas regiões de amplificação providas das sondas selecionadas do protótipo Sepsis 3.0.

3.7 REAÇÃO MULTIPLEX

3.7.1 CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES

Para otimizar a mistura de PCR comparou-se a eficiência de três concentrações dos seguintes reagentes: iniciadores, MgCl₂, dNTPs e enzima Taq DNA Polimerase. As três concentrações utilizadas estão representadas na Tabela 1.

Foram testadas todas as sequências-alvo de ampliações presentes no protótipo laboratorial (AT, 16S1, 16S2, β -globina, ITS2, GyrB e Nuc).

O desenho dos experimentos e a análise dos resultados foram feitas com auxílio do método de Taguchi (Cobb, Clarkson 1994) e do Software MiniTab 7, respectivamente. Este método emprega arranjos ortogonais que permitem fazer análises de múltiplas variáveis combinadas e suprimem informações redundantes, reduzindo assim o número de testes necessários. O arranjo formado está representado na Tabela 1.

TABELA 1 – Experimentos Taguchi

Ensaio	Primer R	MgCl ₂	dNTPs	Taq
1	200mM	3,0 mM	0,2 mM	0,625 U
2	200mM	3,4 mM	0,9 mM	1,25 U
3	200mM	6,0 mM	1,6 mM	2 U
4	400mM	3,0 mM	0,9 mM	2 U
5	400mM	3,4 mM	1,6 mM	0,625 U
6	400mM	6,0 mM	0,2 mM	1,25 U
7	500mM	3,0 mM	1,6 mM	1,25 U
8	500mM	3,4 mM	0,2 mM	2 U
9	500mM	6,0 mM	0,9 mM	0,625 U
Pré	400mM	3,4mM	0,2 mM	2 U

Nota: Arranjo ortogonal L9 com 9 ensaios resultante do desenho experimental por Taguchi com 4 variáveis em 3 níveis cada. Fonte: Elaborado pela autora

3.7.2 CONCENTRAÇÃO E RAZÃO DE INICIADORES

O resultado da leitura do sinal no microarranjo é dependente da marcação com fluoróforo Cy5 do Iniciador R e por esse motivo o iniciador R está em maior concentração na reação sendo ela uma PCR assimétrica, a fim de enriquecer a fita complementar à sonda presente no microarranjo.

Em uma fase anterior deste projeto foram testadas diferentes razões de assimetria de iniciadores. Naquela ocasião, definiu-se como razão ótima entre

iniciador F e R = 1:8 com concentração do iniciador R = 400 nM. Com a adoção de novos alvos de amplificação (*gyrB*, *nuc* e *ITS2*), novas combinações nas reações multiplex e novos iniciadores, foram necessários novos testes de razão entre os iniciadores. Foram testados assimetria de 1:8 contrastada com 1:6 e 1:4.

Também foi testado o aumento de concentração dos iniciadores *GyrB*, sendo que este é degenerado e por isso se encontra em menor concentração em relação a um alvo específico que os iniciadores não degenerados. Dessa forma, foram testadas as concentrações de 200 nM; 400 nM; 600 nM e 800 nM para o iniciador R.

3.7.3 PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO

Considerando que a temperatura utilizada previamente era de 53 °C e os novos iniciadores inseridos no teste têm temperaturas de melting acima desta, foram testadas as seguintes temperaturas de anelamento (T_a): 53 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C e 59 °C.

Foram testados também novos protocolos de PCR para garantir uma melhor performance considerando a grande divergência de T_m dos iniciadores na reação multiplex. Os que se mostraram mais promissores na literatura foram os TouchDown. Foi utilizada T_A inicial em 65°C e diminuída 1 °C/ciclo até 56 °C seguido de 30, 35 ou 40 ciclos (95°C 30 s; 56°C 30 s; 72°C 30 s).

Além do TouchDown, foi testado um StepDown com T_A de 65 °C (5 ciclos), seguido por T_A de 60 °C (5 ciclos), seguido de 30 ou 40 ciclos a 56 °C. Step-up de T_A inicial 40 °C (10 ciclos), seguido de 30 ciclos (95°C 30 s; 56°C 30 s; 72°C 30 s). Todos os protocolos testados iniciaram com um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 300 s e finalizaram com um ciclo de extensão final a 72°C por 600 s.

Foram também testados os seguintes tempos de extensão final: 0 s, 60 s, 300 s e 600 s. O tempo indicado pelo fabricante é de 600 s, porém existe a necessidade do diagnóstico rápido, por isso testes foram feitos com tempos menores a fim de reduzir o tempo total do teste.

Os tempos de hibridização de 25, 20, 15 e 10 minutos foram contrastados quanto a sua eficiência aos 30 minutos utilizados como sugestão do fabricante, também num esforço de diminuir o tempo total do teste.

3.7.4 MÓDULO DE AMPLIFICAÇÃO IBMP

Num esforço de nacionalizar os insumos do teste diagnóstico para sepse, a mistura de PCR comercial estabelecida pelo protocolo (HotStarTaq Plus DNA Polymerase - QIAGEN) até então foi testada em contraste com a produzida pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), variando-se o sal de magnésio ($MgCl_2$ ou $MgSO_4$) e sua concentração (1,5 mM até 6 mM) na Mistura de PCR 2X do IBMP.

3.7.5 ESTABILIDADE DO MASTERMIX

Para viabilizar a logística e possível comercialização do teste, foram executados ensaios preliminares para se determinar a estabilidade da reação armazenada uma vez que todos os iniciadores e demais reagentes do PCR estivessem combinados no MasterMix de reação. Para isso a reação foi montada e alíquotas foram feitas e mantidas congeladas para testes em diferentes tempos de estocagem com o mesmo DNA de amostra.

O mastermix com todos seus componentes de reação, com exceção da Taq DNA Polimerase foi testado com DNA molde para todas as regiões de amplificação com amostras de *C. albicans* (ITS2), *S. aureus* (NUC e 16S) e *K. oxytoca* (GyrB e 16S). Comparou-se o desempenho das sondas quando utilizado o mastermix armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 dias com o mix feito no dia do experimento. Ao mix foi adicionado somente a enzima e o DNA molde do controle de amplificação AT.

3.8 VALIDAÇÃO LABORATORIAL

3.8.1 SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Foram conduzidos testes para estabelecer a sensibilidade analítica do teste, uma vez que os protocolos de amplificação e hibridização foram otimizados e estabelecidos. Estes esforços ocorreram nos laboratórios de microbiologia e biologia molecular estruturados no Hospital de Clínicas, laboratórios estes frutos do Programa Sepsis coordenado pelo IBMP, onde há acesso ao repositório de isolados clínicos e amostras de sangue de doadores saudáveis coletadas com termo de consentimento dos doadores do Biobanco do HC-UFPR.

Para determinar a sensibilidade analítica do teste para cada uma das espécies de micro-organismos, foi contaminado artificialmente, sangue com

quantidades conhecidas dos micro-organismos e estas amostras foram submetidas à extração de DNA e testadas no chip. Processo é exemplificado nas Figuras 3 e 4 abaixo.

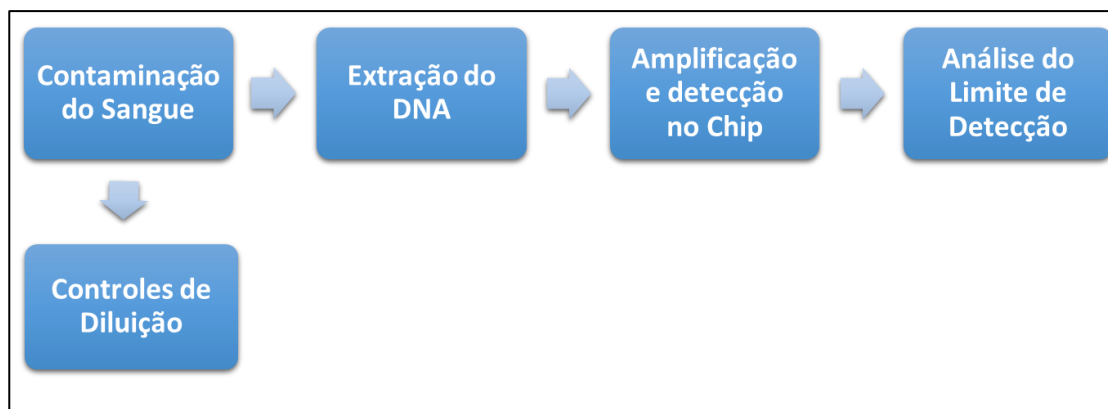
Para quantificar as unidades formadoras de colônia por volume (UFC/mL) utilizadas na contaminação, foi utilizado o densitômetro Densimat (Biomérieux Biotechnology™) que tem uma leitura em unidades de McFarland para turbidez causada pelas células em suspensão.

Foi utilizado o padrão de 0.5 Mcfarland em solução de PBS 1X adicionada de 0.01% de Tween 20 (Sigma Aldrich™) para 1×10^7 UFC/mL para bactérias e 1×10^6 UFC/mL para *Candida* spp.. Esta solução garante a homogeneização e dispersão das células em suspensão.

Esse padrão foi estabelecido previamente no Programa Sepsis e é confirmado a cada experimento através da contagem de colônias formadas em placa de *Plate Count Agar* (Merck™). Foi feita uma curva de diluição entre 1×10^6 UFC/mL e 1×10^2 UFC/mL em PBS1X + 0,01% Tween que foi então diluída em sangue, numa razão 1:10 para que o DNA total desta suspensão seja extraído simulando a amostra de um paciente séptico.

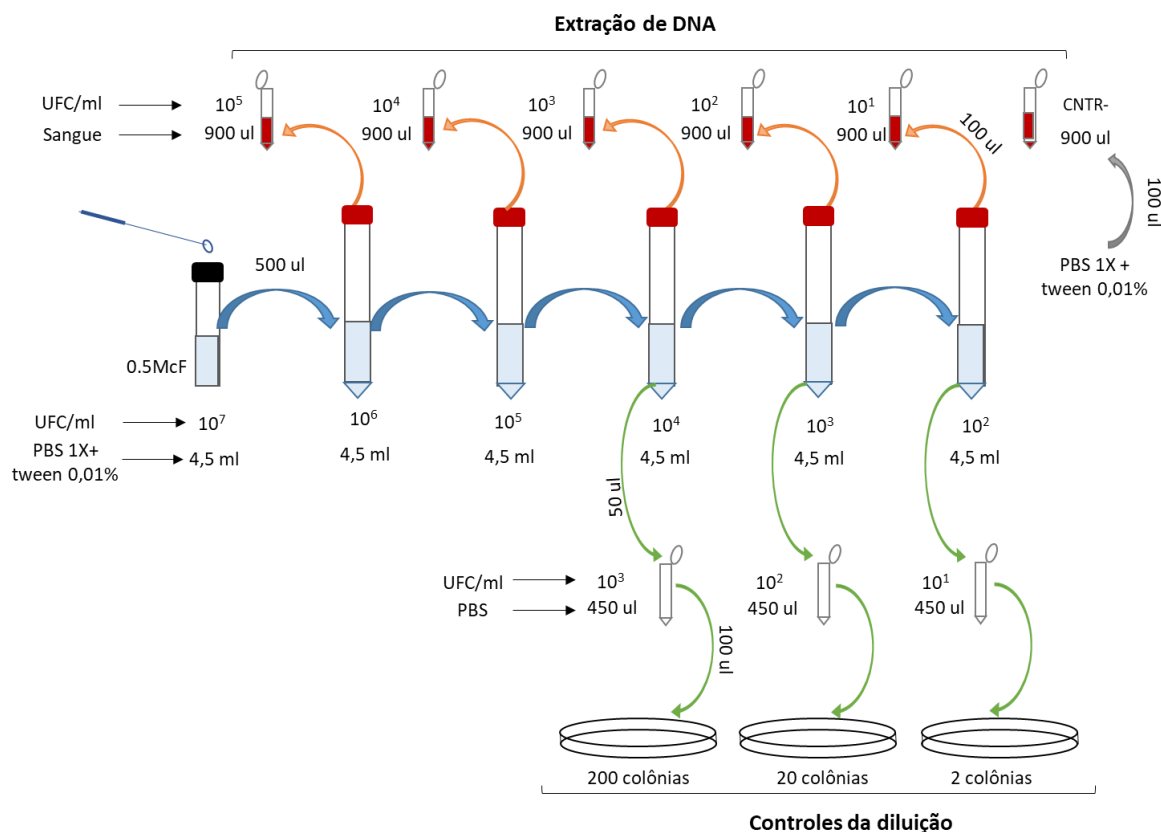
Das diluições de 1×10^4 a 1×10^2 UFC/mL foi retirada uma amostra que foi diluída em PBS 1X e plaqueada para controle de diluição. As placas foram incubadas a 37 °C overnight e as colônias formadas foram contadas para avaliar a precisão da quantificação inicial e diluições posteriores da curva.

Figura 3 - Fluxograma do procedimento de contaminação artificial do sangue.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 4 - Procedimento da contaminação artificial com *spread plate*.



Nota: Esquema de contaminação artificial do sangue com curva de diluição de uma suspensão de concentrações conhecida de patógenos. Controle da concentração feito através do plaqueamento das concentrações contáveis em placa. Fonte: Elaborado pela autora

O kit de extração de DNA utilizado para bactérias é o MolYsis™ Complete 5 (Molzym), que é específico para extração de ácidos nucleicos de micro-organismos em amostra de sangue, removendo grande parte do DNA humano presente. Para as *Candidas* foi utilizado o kit UMD-Universal IDV CE (Molzym) baseado em resultados prévios obtidos pelo grupo em que este kit apresentava melhor performance para os fungos.

3.8.2 ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Nestes teste o sangue é contaminado com 10⁶ UFC/mL no caso das bactérias e 10⁵ UFC/mL nos fungos como apresentado na Figura 4, e esta

concentração de contaminação é submetida ao processamento para extração e purificação de DNA.

As sondas presentes no microarranjo foram confrontadas com todos os micro-organismos do painel e os resultados referentes a estes experimentos são compilados numa figura que contrasta a espécie microbiana testada frente às sondas presentes no biochip em um heatmap.

3.8.3 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

Após a padronização das condições do ensaio, foi avaliada a performance do SepseDx num ambiente real de amostras de pacientes com suspeita de sepse, em um estudo clínico preliminar com 200 amostras em que o resultado do teste molecular foi comparado com o resultado da hemocultura e testes de identificação de rotina do Departamento de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

Este estudo foi realizado com devida autorização do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, como consta no Anexo 1.

Pacientes encaminhados para coleta de amostra para hemocultura, entre os dias 25/09/17 e 04/12/17 também tiveram sangue coletado em tubos EDTA até que fossem totalizadas 200 amostras. Foi feita coleta em todos os plantões, de todas as clínicas e estas foram agrupadas e armazenadas a 4°C.

Duas vezes ao dia, no início da manhã e no início da tarde, as amostras foram encaminhadas por uma colaboradora do Hospital de Clínicas para processamento no Biobanco, onde foi executado o teste molecular. Esta mesma colaboradora ficou responsável por compilar os resultados da hemocultura de acordo com seu número de registro.

Estas amostras foram extraídas com kit UMD-Universal IVD CE (Molzym) e o DNA resultante foi testado subsequentemente no chip SepseDx nas condições otimizadas previamente descritas.

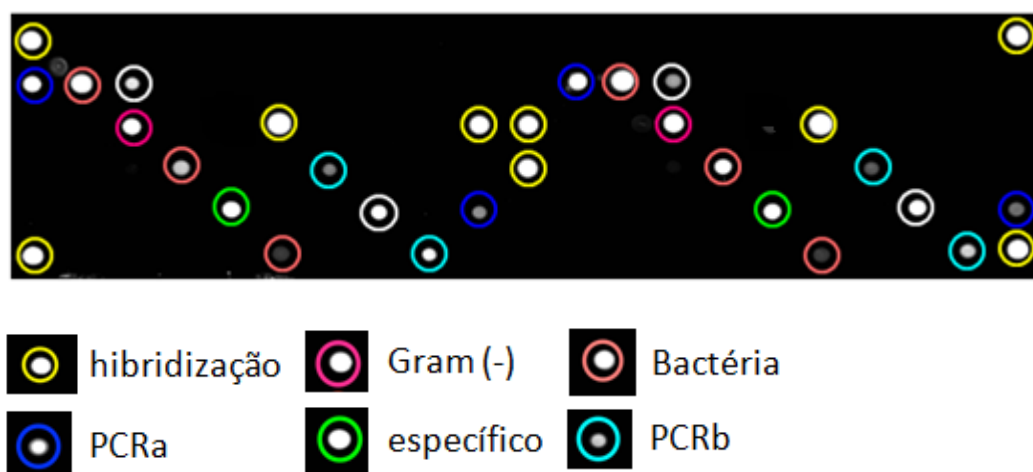
Foi considerado positivo o resultado no chip, qualquer intensidade de sinal indetectável não presente na extração do controle negativo da PCR em que em vez do molde de DNA foi inserido água ultrapura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PLATAFORMA

A plataforma, operada como delimitado pelo fabricante, proporciona resultados como ilustrado na Figura 5 abaixo, que interpretados pelo software de análise de imagens do microarranjo dá valores de intensidade de sinal entre 257 e 65535 que são transformados em porcentagem de sinal para as análises de otimização.

FIGURA 5 - Representação esquemática do resultado da hibridização do Protótipo Sepsis1.0.



Fonte: Elaborado pela autora

4.2 MICRO-ORGANISMOS E CULTIVO

Na Figura 6 abaixo estão os micro-organismos selecionados como de maior importância clínica que formam o painel para o teste, subdivididos em diferentes níveis de identificação.

FIGURA 6 - Painel de micro-organismos do teste

Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5
Triagem	Grupos	Grupos	Gêneros	Espécie
Bactérias	Gram- negativos	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
			<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
				<i>Klebsiella oxytoca</i>
			<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
				<i>Enterobacter aerogenes</i>
			<i>Serratia spp.</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Proteus spp.</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
			<i>Proteus vulgaris</i>	
		<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	
		Não fermentadores	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Acinetobacter spp.</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i>	
	<i>Stenotrophomonas spp.</i>		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	<i>Burkholderia spp.</i>		Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	
	Gram-positivos	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
			<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
		<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
			<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>				
<i>Enterococcus spp.</i>		<i>Enterococcus faecium</i>		
		<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>Listeria spp.</i>	<i>Listeria monocitogenes</i>			
Fungos			<i>Candida spp.</i>	<i>Candida albicans</i>
				<i>Candida tropicalis</i>
				<i>Candida parapsilosis</i>
				<i>Candida glabrata</i>
				<i>Candida krusei</i>

Fonte: Elaborado pela autora

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de micro-organismos em cultivo foram extraídas com os kits comerciais da Molzym seguindo as instruções do fabricante com pequenas alterações que mostraram ter benefícios para a qualidade do DNA extraído.

Foi adicionado um passo de centrifugação após a lavagem com álcool para garantir que não houvesse resíduo do mesmo na amostra final eluída da coluna. Isto foi realizado após observar que algumas amostras de DNA não congelavam quando armazenadas a -20 °C, indicando possível presença de álcool.

Também foi evitado o descongelamento da amostra antes da amplificação. Assim, optou-se por armazená-las em geladeira antes do teste no chip e só então elas foram congeladas em freezer.

4.4 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os contigs montados a partir dos dados de sequenciamento foram contrastados com sequências depositadas no NCBI e todas as amostras foram confirmadas como sendo da espécie descrita pela caracterização fenotípica.

Estas cepas isoladas devidamente caracterizadas com identidade confirmada foram então utilizadas no desenho de iniciadores e sondas e validação dos protótipos do chip. Estas estão enumeradas no Anexo 2 como Isolados HC.

4.5 INICIADORES E SONDAS

4.5.1 SEPSIS 1.0 E 2.0

Abaixo, na Figura 7 e 8 a lista de iniciadores utilizados para os dois primeiros protótipos do chip, incluindo os iniciadores relacionados aos controles do teste. No Anexo 3 e 4 estão relacionadas as sondas referentes a estes protótipos.

Nestes protótipos as sondas são ligadas a superfície do microarranjo em pares de *spots* espelhados para cada sonda. Isso faz com que uniformidade de hibridização possa ser observada em toda superfície do microarranjo.

FIGURA 7 - Iniciadores utilizados na reação multiplex de amplificação do protótipo Sepsis1.0.

Primers Sepsis 1.0			
Alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Fonte
16S1	LGM-P61	TCCTACGGGAGGCAGCAG	Os Autores
16S1	LGM-P146	GTATTACCGCGGCTGCTGG-Cy5	Os Autores
16S2	LGM-P63	AGGATTAGATACCCTGGTAGTCC	Os Autores
16S2	LGM-P147	CACRACACGAGCTGACGAC-Cy5	Os Autores
16S3	LGM-P65	TCCCGYAACGAGCGCAAC	Os Autores
16S3	LGM-P148	GTGACGGGCGGTGTGTAC-Cy5	Os Autores
ITS1	LGM-P97	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al, 1990
ITS1	LGM-P113	TCCTCCGCTTATTGATATGC-Cy5	White et al, 1990
β-globina	LGM-P101	GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG	Clontech
β-globina	LGM-P111	TGCTAGTGAACACAGTTGTG-Cy5	Clontech
AT	LGM-P71	CTCATGTGAGAGCCAAATTGTGAAG	STMicroelectronics
AT	LGM-P149	GGACACTAATGGGATCAAATCTTTTATACC-Cy5	STMicroelectronics

Fonte: Elaborado pela autora

FIGURA 8 - Iniciadores utilizados na reação multiplex de amplificação do protótipo Sepsis2.0.

Primers Sepsis 2.0			
Alvo	Primer	Sequence (5'-3')	Fonte
16S1	LGM-P61	TCCTACGGGAGGCAGCAG	Os Autores
16S1	LGM-P146	GTATTACCGCGGCTGCTGG-Cy5	Os Autores
16S2	LGM-P63	AGGATTAGATACCCTGGTAGTCC	Os Autores
16S2	LGM-P147	CACRACACGAGCTGACGAC-Cy5	Os Autores
16S3	LGM-P65	TCCCGYAACGAGCGCAAC	Os Autores
16S3	LGM-P148	GTGACGGGCGGTGTGTAC-Cy5	Os Autores
ITS2	LGM-P67	GGTGAACCTGCGGAAGGATC	White et al, 1990
ITS2	LGM-P112	GCTGCGTTCTTCATCGATGC-Cy5	White et al, 1990
β-globina	LGM-P101	GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG	Clontech
β-globina	LGM-P111	TGCTAGTGAACACAGTTGTG-Cy5	Clontech
AT	LGM-P71	CTCATGTGAGAGCCAAATTGTGAAG	STMicroelectronics
AT	LGM-P149	GGACACTAATGGGATCAAATCTTTTATACC-Cy5	STMicroelectronics

Fonte: Elaborado pela autora

4.5.2 SEPSIS 3.0

Abaixo, na Figura 9, a lista de iniciadores utilizados para o terceiro protótipo do chip, incluindo os iniciadores dos novos alvos de amplificação. Para desenho de sondas dos novos alvos de amplificação, foram coletadas sequências do Genbank para cada um deles, presentes no Anexo 5 (GyrB), Anexo 6 (GyrA), Anexo 7 (NUC) e Anexo 8 (TUF).

Este protótipo teve a particularidade de não ter sondas duplicadas no microarranjo, garantindo o dobro de espaços para sondas em testes. Isto possibilitou a expansão para as novas regiões de amplificação. No Anexo 9 estão relacionadas as sondas referentes a estes protótipos.

FIGURA 9 - Iniciadores utilizados na reação multiplex de amplificação do protótipo Sepsis3.0.

Alvo	Primer	Sequence (5'-3')	Fonte
16S1	LGM-P61	TCCTACGGGAGGCAGCAG	Este Estudo
16S1	LGM-P146	GTATTACCGCGGCTGCTGG-Cy5	Este Estudo
GyrA	LGM-216	GCATGTAACGCAGCGAGAAYG-Cy5	Este Estudo
GyrA	LGM-P203	CGACCTTGCGAGAGAAAT	US 6706475 B1
GyrA	LGM-P204	GTTCCATCAGCCCTCAA-Cy5	US 6706475 B1
GyrB	LGM-P196	CGICCIGGKATGTAYATHGG	EP2716770A2
GyrB	LGM-P197	RMICCWACICCRTGYAGICCICC-Cy5	EP2716770A2
GyrB	LGM-P198	RMNCCHACDCCRTGHAVNCCDCC-Cy5	Este Estudo
GyrB	LGM-P199	RMNCCHACDCCRTGHARDCCDCC-Cy5	Este Estudo
GyrB	LGM-P229	CGMCCKGGYATGTATATCGG	Este Estudo
GyrB	LGM-P230	CCTACKCCRTGMAGDCCRCC-Cy5	Este Estudo
Nuc1	LGM-P205	AAGCGATTGATGGTGATACG	Este Estudo
Nuc1	LGM-P206	TTTACCATTTTCCATCAGCA-Cy5	Este Estudo
Nuc2	LGM-P207	TGAAGCAAGTGCATTTACGA	Este Estudo
Nuc2	LGM-P208	GACCTGAATCAGCGTTGTCT-Cy5	Este Estudo
Tuf	LGM-P200	ACIKKIACIGGIGTIGARARGTT	EP2336366A1
Tuf	LGM-P201	CCTTSHARHGCTTTHARHGCDGAACC-Cy5	Este Estudo
Tuf	LGM-P202	GGNRBRTCRCCHGGGAADTC -Cy5	Este Estudo
Tuf	LGM-P209	ACTGGIGTIGARATGTTCCGYAA	EP2660335A2
Tuf	LGM-P210	ACGTCIGTIGTICKGAARTARAA-Cy5	EP2660335A2
Tuf	LGM-P215	AAYATGATNACNGGNGCNGCNCARATGGA	Este Estudo

Fonte: Elaborado pela autora

4.5.3 SESPSEDX

Abaixo, na Figura 10, a lista de iniciadores utilizados para o quarto e último protótipo do chip, com os iniciadores dos alvos de amplificação selecionados por englobar todas as sondas escolhidas. No Anexo 10 estão relacionadas as sondas referentes a estes protótipos.

FIGURA 10 - Iniciadores utilizados na reação multiplex de amplificação do protótipo final, SepseDx.

Alvo	Primer	Sequence (5'-3')	Fonte
GyrB	LGM-P229	CGMCCKGGYATGTATATCGG	Os Autores
GyrB	LGM-P230	CCTACKCCRTGMAGDCCRCC	Os Autores
Nuc	LGM-P205	AAGCGATTGATGGTGATACG	Os Autores
Nuc	LGM-P206	TTTACCATTTTTCCATCAGCA	Os Autores
16S1	LGM-P61	TCCTACGGGAGGCAGCAG	Os Autores
16S1	LGM-P146	GTATTACCGCGGCTGCTGG	Os Autores
AT	LGM-P71	CTCATGTGAGAGCCAATTGTGAAG	STM
AT	LGM-P149	GGACACTAATGGGATCAAATCTTTTATAACC	STM
β-globina	LGM-P101	GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG	Clontech
β-globina	LGM-P111	TGCTAGTGAACACAGTTGTG	Clontech
16S2	LGM-P63	AGGATTAGATACCCTGGTAGTCC	Os Autores
16S2	LGM-P147	CACRACACGAGCTGACGAC	Os Autores
ITS2	LGM-P97	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al, 1990
ITS2	LGM-P113	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al, 1990

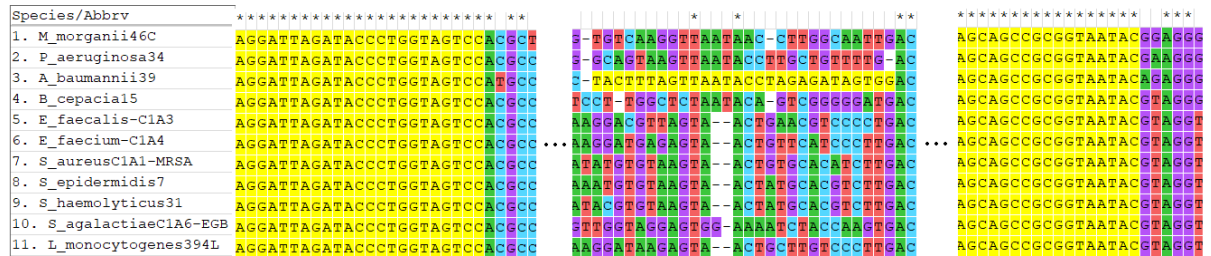
Fonte: Elaborado pela autora

Foram desenhadas e testadas 46 sondas no protótipo Sepsis 1.0 e 84 no Sepsis 2.0 para os 28 micro-organismos contemplados pelo painel selecionado. Elas foram selecionadas dentro dos alinhamentos criados, que continham sequências de cada micro-organismo coletadas do bancos de dados públicos, e filtradas para eliminar redundâncias, bem como sequências obtidas a partir do sequenciamento de isolados clínicos disponíveis na coleção microbiológica do HC-UFPR.

As sondas desenhadas foram selecionadas quanto a sua temperatura de anelamento, seu conteúdo CG, estrutura secundária e número de bases. As sondas deveriam possuir pelo menos um nucleotídeo diferente para distinguí-las de todas as

outras sequências e cerca de 25 nucleotídeos de extensão, como pode ser observado em amarelo no exemplo da Figura 11.

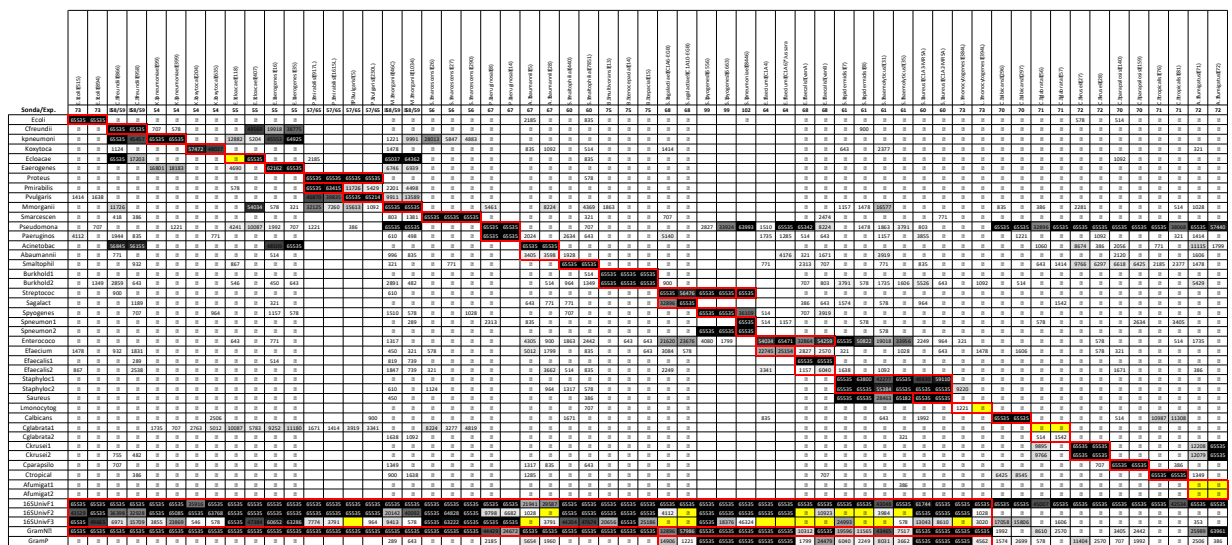
Figura 11 - Representação do alinhamento de uma região do rDNA 16S bacteriano e exemplo de iniciadores e sonda.



Nota: Iniciadores e sonda destacados em amarelo utilizando-se o software MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Fonte: Elaborado pela autora.

Os testes conduzidos com o primeiro e segundo protótipos com todos os micro-organismos isolados de cultivo, presentes no painel, estão resumidos no heatmap construído nas Figuras 12 e 13. Os resultados numéricos de intensidade de sinal detectados no microarranjo em chips com amostra de 10^6 cópias de genomas equivalentes para cada micro-organismo avaliado são plotados em função das sondas presentes no array.

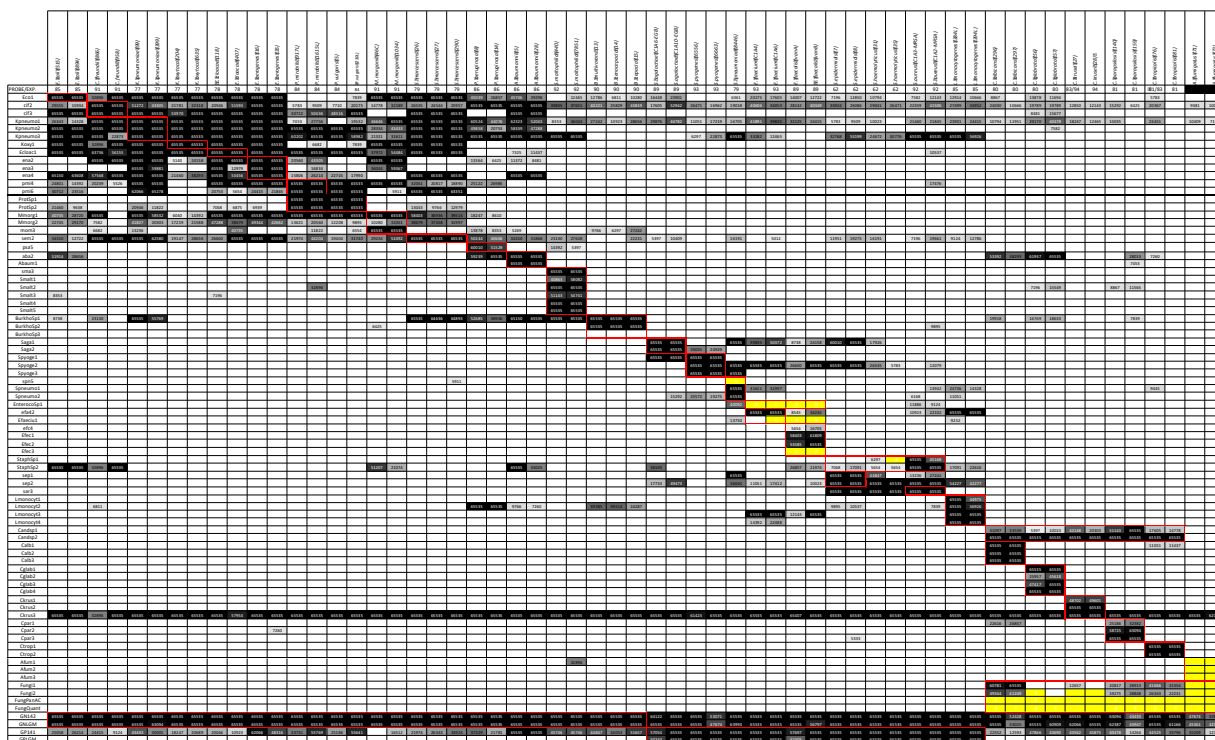
FIGURA 12 - Testes do protótipo Sepsis1.0.



Nota: Nas linhas estão representados as sondas e nas colunas as espécies de microorganismos. Valores representam a média aritmética dos valores de intensidade de sinal entre duplicatas de chip e dos pares das sondas. Estão circundadas em vermelho as células das sondas específicas que deveriam ter sinal, as células estão sombreadas de branco até preto de acordo com intensidade do valor do sinal. Em amarelo, sinais que deveriam ser positivos e não resultaram em sinal algum.

Fonte: Elaborado pela autora

FIGURA 13 - Testes protótipo Sepsis2.0.



Nota: Representados valores das duplicatas de chips e tratados como a Figura 12.

Fonte: Elaborado pela autora.

Dentre essas sondas testadas, 15 do Sepsis 1.0 e 22 do Sepsis 2.0 foram selecionadas, o que cobria 20 dos 28 micro-organismos do painel. Para os micro-organismos não resolvidos nos testes com os protótipos 1 e 2 do chip, foi desenvolvido o protótipo Sepsis 3.0. Como as sondas possíveis de serem desenhadas dentro das regiões amplificadas do rDNA 16S foram esgotadas de possibilidades, novos genes foram explorados.

Foram desenhadas sondas somente nas regiões chamadas de 16S-1 e 16S-2 do gene 16S rDNA bacteriano, eliminou-se o 16S-3 já que este não apresentava amplificação satisfatória. E da literatura foram selecionados *gyrA* e *gyrB*, que codificam para as subunidades A e B da girase do DNA, respectivamente; *tuf*, que codifica para o fator de alongação TU; *nuc*, que codifica para a nucleasse termoestável de *Staphylococcus aureus* e *mecA* que codifica para uma forma alterada de proteína ligadora de penicilina com menor afinidade por antibióticos beta-lactâmicos, que gera uma resistência à esses compostos (Ubukata et al. 1992).

Os testes com o chip Sepsis 3.0 são mostrados na Figura 14. Os resultados do Sepsis 3.0 diferem dos anteriores, por não contemplarem todo o painel, logo

foram feitos testes com somente uma das cepas dos patógenos já resolvidos, que seriam os controles inespecíficos e os testes não foram feitos em multiplex. Ele contempla sondas *gyrB* para integrantes da família *Enterobacteriaceae*, que possuem baixa variabilidade dentro da região do rDNA 16S (Dauga 2002).

O sepsis 3.0, com 104 sondas totais, também possui sondas para duas regiões do gene NUC que conferiu ao teste a habilidade de discriminar *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus* spp. não produtores de coagulase que ainda não havia sido solucionado nos protótipos anteriores (Brakstad, Aasbakk, and Maeland 1992). Sendo esta uma espécie de alta relevância clínica, justifica-se os esforços em singularizá-la.

Com a contribuição deste último protótipo, mais quatro espécies foram resolvidas, e para aquelas não resolvidas por uma única sonda, regras com análise combinatória de sondas foram desenvolvidas. Novamente foi utilizado DNA de amostra extraído em suspensão de PBS.

FIGURA 15 - Painel de micro-organismos.

Triagem	Grupo	Gênero	Espécie
Bactéria	Gram+	<i>Escherichia spp</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Klebsiella spp</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
			<i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Enterobacter spp</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
			<i>Enterobacter aerogenes</i>
		<i>Serratia spp</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Proteus spp</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
		<i>Proteus vulgaris</i>	
		<i>Morganella spp</i>	<i>Morganella morganii</i>
	<i>Citrobacter spp</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	
	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
	<i>Stenotrophomonas spp</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
		<i>Burkholderia spp</i>	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
Gram-	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
	<i>Streptococcus spp</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>		
<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>		
	<i>Enterococcus faecium</i>		
	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria monocitogenes</i>	
Fungo		<i>Candida spp</i>	<i>Candida albicans</i>
			<i>Candida tropicalis</i>
			<i>Candida parapsilosis</i>
			<i>Candida glabrata</i>
			<i>Candida krusei</i>

Chip de origem da sonda
Sepsis1.0 Sepsis2.0 Sepsis3A

Nota: Coordenado pela cor do protótipo de origem da sonda escolhida para cada espécie ou grupo.
 Fonte: Elaborado pela autora.

A compilação das sondas selecionadas para o protótipo final do chip (SepseDx) está apresentada na Figura 16 assim como o resultado que eles obtiveram nos testes anteriores em PBS. Refletindo o resultado que era esperado nas próximas análises feitas com este último protótipo. A organização do teste no array está apresentada na Figura 17, sendo que cada quadrado da tabela está identificado com a sonda que será ligada nessa posição do microarranjo.

Figura 16 - Compilação dos resultados numéricos obtidos para as sondas selecionadas a partir dos protótipos Sepsis1.0, Sepsis2.0 e Sepsis3.0.

Nota: Na abscissa estão os micro-organismos do painel e, na ordenada as sondas selecionadas para o chip SepseDx. Os valores representam as médias de replicas técnicas ou experimentais descritas nas Figuras 12, 13 e 14. Fonte: Elaborado pela Autora.

Figura 17 - Representação esquemática do microarranjo de hibridização do protótipo SepseDx.

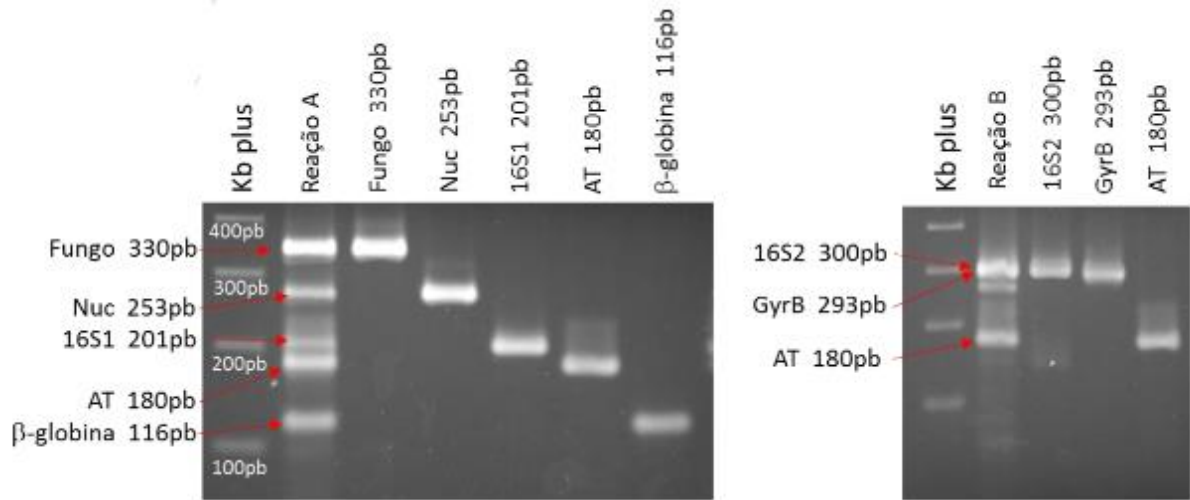
SepseDx																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	AT809	Ctrop1	CKpKoEc	Sagalact	Kpn3	AT776	Cglab1	Efaecalis1	Paerugin	empty	AT809	empty	Ctrop1	CKpKoEc	Sagalact	Kpn3	AT776	Cglab1	Efaecalis1	Paerugin	AT809
2	Calb2	Abaum1	GPLGM	Cfreugb	Cknu2	Spneumon1	BurkSp	KlebsSp3	AT1_1	Kpn6	empty	Calb2	Abaum1	GPLGM	Cfreugb	Cknu2	Spneumon1	BurkSp	KlebsSp3	AT1_1	Kpn6
3	empty	Pmirabilis	Saurenc3	Cglab4	AT809	Ctrop2	KlebsSp1	SmaI4	Kpn4	Efec2	empty	Efec2	Pmirabilis	Saurenc3	Cglab4	AT809	Ctrop2	KlebsSp1	SmaI4	Kpn4	empty
4	Kpn7	AT1_5	Calb3	Eaerogen	Lmon2	Edoagb1	Cparap	Spyoagelac	Koxytoca	Kpn1	empty	Kpn7	AT1_5	Calb3	Eaerogen	Lmon2	Edoagb1	Cparap	Spyoagelac	Koxytoca	Kpn1
5	GNLGM	Kpn5	BG1	Smarces	Saurenc5	Cknu1	BG2	Saurenc9	KlebsSp2	Spyopneum	empty	GNLGM	Kpn5	BG1	Smarces	Saurenc5	Cknu1	BG2	Saurenc9	KlebsSp2	Spyopneum
6	AT809	Proteus	Kpn2	AT730	Candsp2	Ecoli	Mmor3	Efaecugb1	Cpar3	StaphySp	AT809	StaphySp	Proteus	Kpn2	AT730	Candsp2	Ecoli	Mmor3	Efaecugb1	Cpar3	AT809

Nota: Descrição da sonda contida em cada spot e sua posição do microarranjo. Em branco: sondas para os micro-organismos; vermelho: controles de hibridização; azul: controles da reação de PCR; bege: controle de processamento da amostra; amarelo: espaço vazio para controle do background; preto: controle negativo. Fonte: Elaborado pela Autora.

4.6 REAÇÃO MULTIPLEX

Para a inserção de novos amplicons com sondas selecionados, Nuc e GyrB, e eliminação do 16S3 foram feitos novos testes do multiplex que originaram uma nova combinação otimizada de iniciadores para cada câmara. Esta está exemplificada na Figura 18.

FIGURA 18 - Multiplex das reações das câmaras A e B.

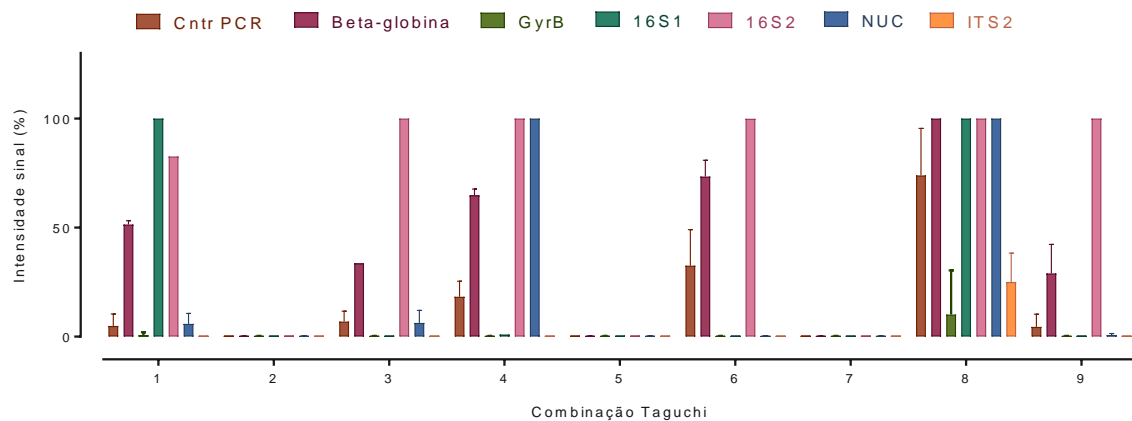


Nota: Gel de agarose 2% com marcador 1 Kb plus Thermo Fisher. Produto de PCR do protocolo otimizado e corado com brometo de etídio. Fonte: Elaborado pela autora.

4.6.1 CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES

A combinação Taguchi com melhores resultados para as 7 regiões amplificadas foi a de número 8, como pode ser observado na Figura 19 abaixo:

FIGURA 19 - Otimização das condições da reação (método Taguchi).

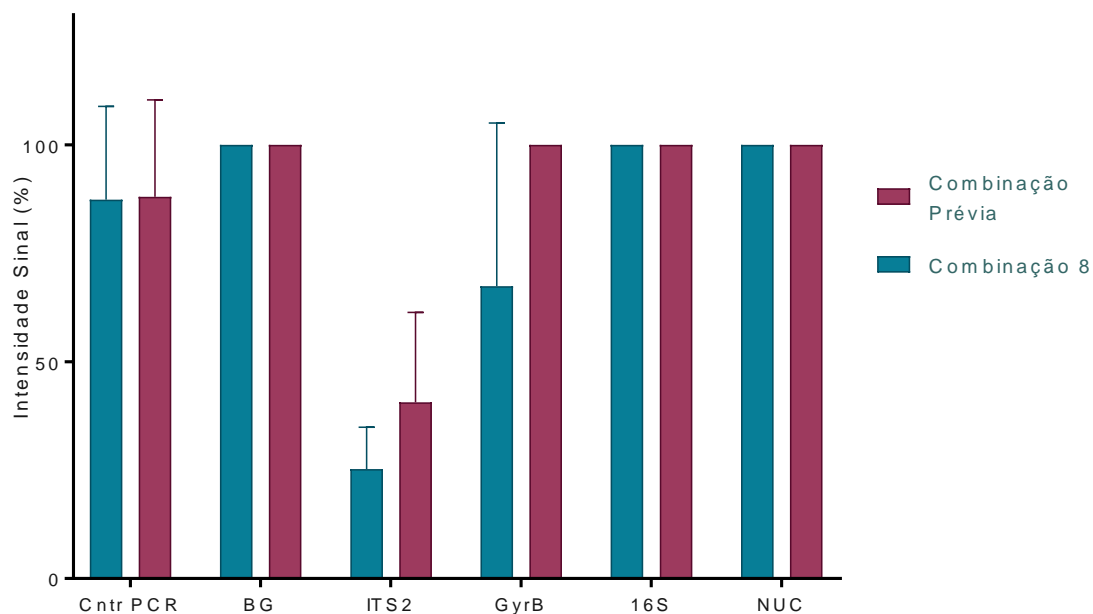


Nota: Barras representam em percentagem de intensidade do sinal detectado no microarranjo após testes de amplificação de diferentes combinações Taguchi para *K. oxytoca*, *S. aureus* e *C. albicans*. Cada resultado representa a média dos pares de sonda no chip e duplicatas de chip. Fonte: Elaborado pela autora.

A melhor combinação foi então contrastada com a condição utilizada previamente, a qual foi sugerida pela empresa detentora da tecnologia que já

comercializa outros testes nos mesmos moldes nesta plataforma. Os resultados indicam que o desempenho da condição utilizada previamente é superior ao desempenho da combinação 8 do método Taguchi (Figura 20).

FIGURA 20 - Comparação da combinação prévia com a combinação proposta pelo método Taguchi.



Notas: Teste de amplificação com *K. oxytoca*, *S. aureus* e *C. Albicans*. Cada resultado representa a média dos pares de sonda no chip e duplicatas de chip.

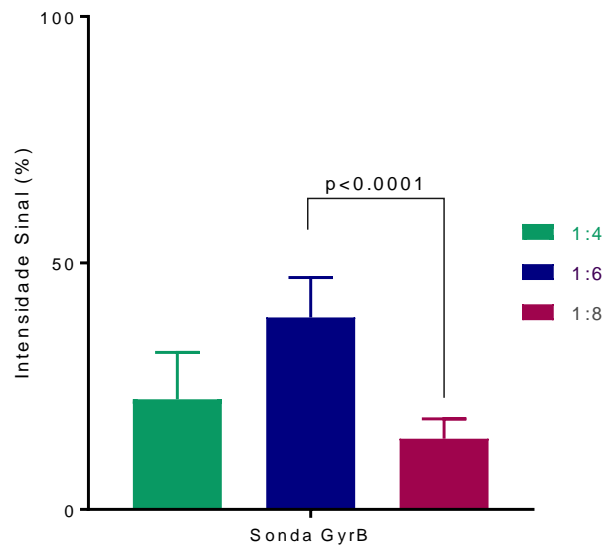
Fonte: Elaborado pela autora.

A condição 8 é a mais parecida com a utilizada anteriormente, sendo a única diferença a concentração de iniciador (500 nM no lugar de 400 nM anterior). Visando melhorar as duas regiões (ITS2 e GyrB) ainda subótimas, novos testes envolvendo a razão e concentração destes iniciadores foram realizados.

4.6.2 RAZÃO E CONCENTRAÇÃO DE INICIADORES

Abaixo a comparação de outras razões de assimetria de iniciador F e R testados para o gyrB na Figura 21.

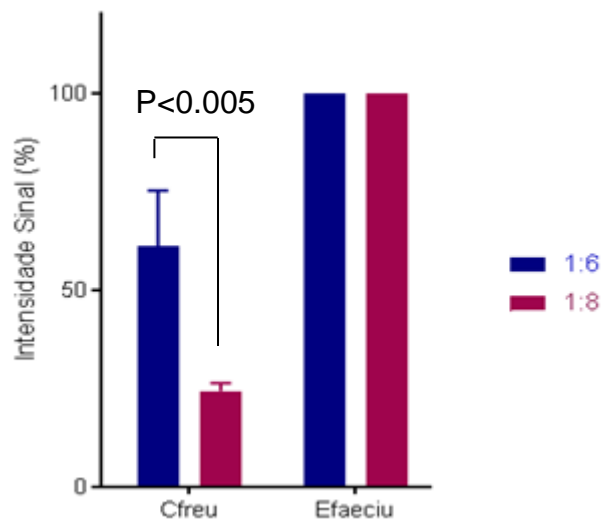
Figura 21 - Teste de assimetria de iniciadores GyrB.



Nota: Amplificação de *K oxytoca*. A razão 1:6 apresenta diferença estatisticamente significativa com 1:8. Quantidade de DNA molde utilizada de 10^4 cópias de genoma-equivalentes. Cada resultado representa a média dos pares de sonda no chip e duplicatas de chip. Teste estatístico T student. Fonte: elaborado pela autora.

A razão 1:6 foi então testada para todos os micro-organismos que possuem sonda no GyrB para confirmar que a nova assimetria proporciona ganho no sinal (Figura 22).

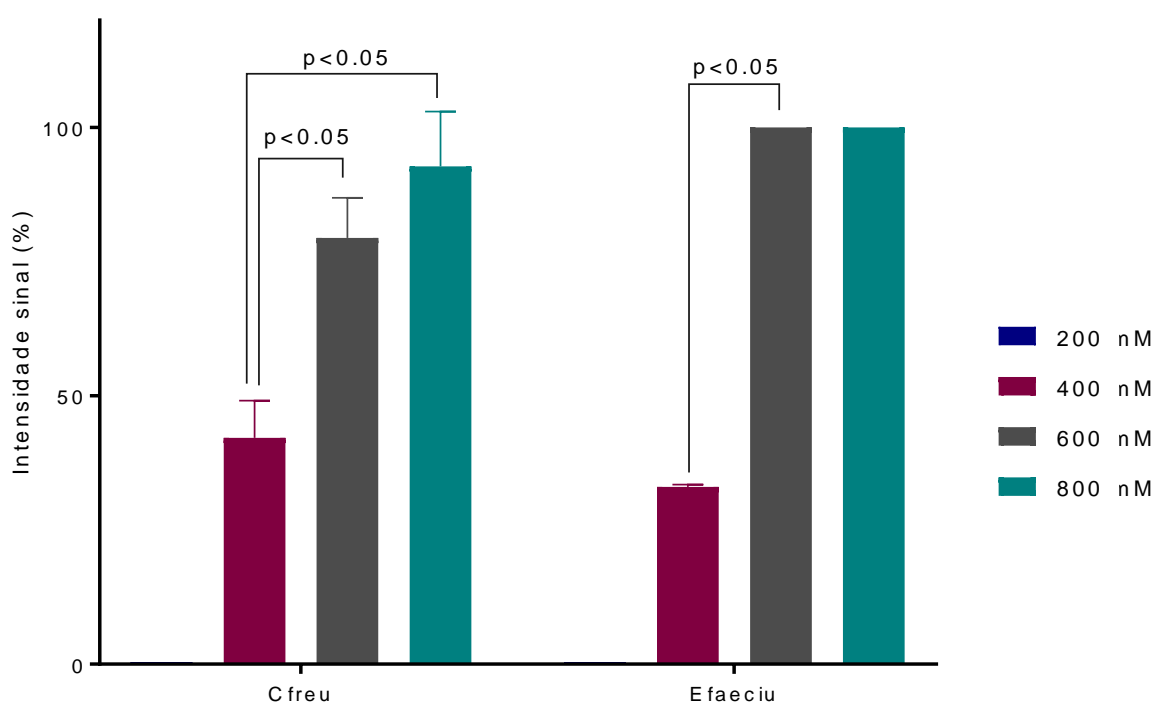
FIGURA 22 - Teste de assimetria de iniciadores GyrB.



Nota: Amplificação de *Oxytoca*, *C. freundii* e *E. faecium*. Cada resultado representa a média dos pares de sonda no chip e duplicatas de chip. Teste estatístico T student.
 Fonte: Elaborado pela autora.

Um dos motivos para a amplificação ainda insatisfatória do GyrB especulado, é a presença de degenerações nas sequências dos seus iniciadores. Por isso, foi testado a variação de concentração (R= 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 μM) com a nova razão de 1:6 (Figura 23).

FIGURA 23 - Teste de concentração de iniciadores.



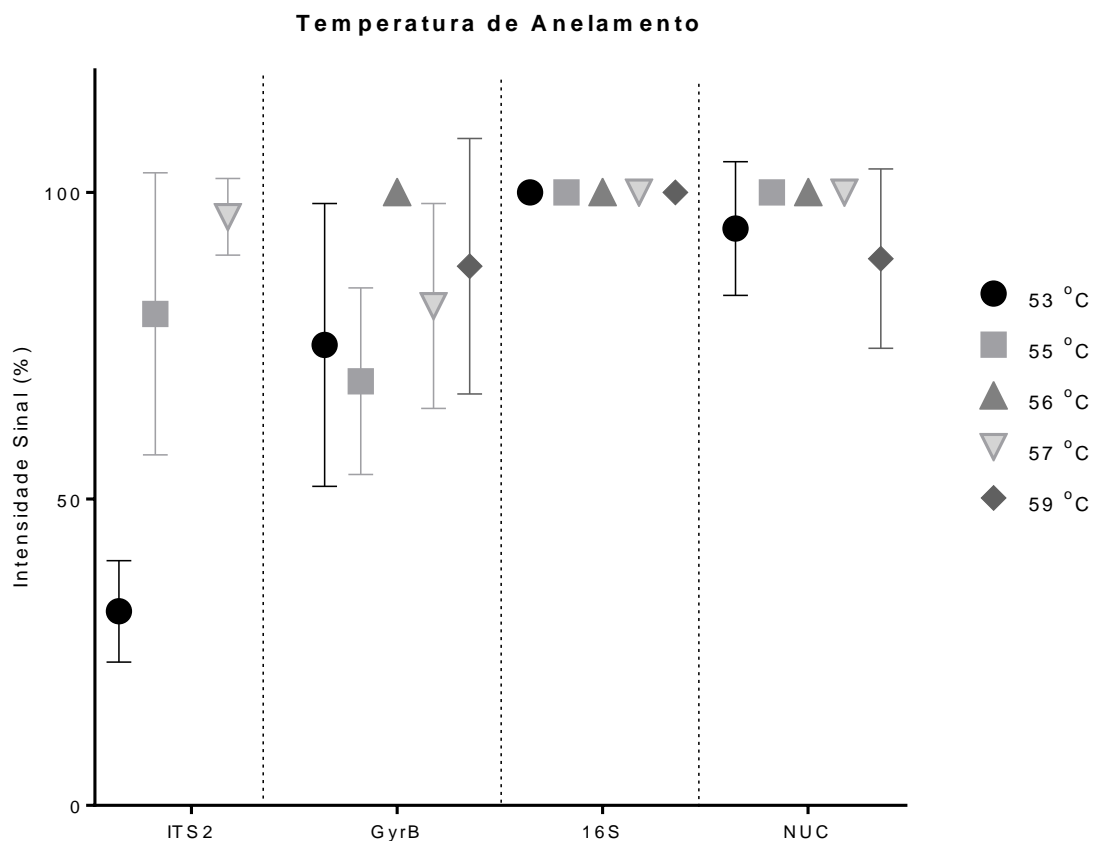
Nota: Amplificação de *C. freundii* e *E. faecium*. Cada resultado representa a média dos pares de sonda no chip e duplicatas de chip. Em relação a 400nM, há diferença significativa para 600nM com $p=0.0116$ e para 800nM com $p=0.0075$. Teste estatístico T student.
 Fonte: Elaborado pela autora.

Foi observado entretanto, que quanto maior a concentração de iniciadores GyrB, maior a eficiência da amplificação deste gene. Porém, a maior concentração testada (800 nM) prejudica a amplificação dos produtos 16S2 e AT, amplificados na mesma reação multiplex além de gerar aumento nos sinais inespecíficos em número absoluto e intensidade (dados não apresentados). Por isso a concentração final selecionada para o iniciador R Gyrb ficou em 600 nM e o F de 100 nM, com a nova assimetria de 1:6. Os outros iniciadores continuam F 50 nM e R 400 nM, seguindo a razão 1:8.

4.6.3 PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO

Resultados das novas temperaturas de anelamento testadas estão abaixo na Figura 24:

FIGURA 24 - Teste de temperatura de anelamento.

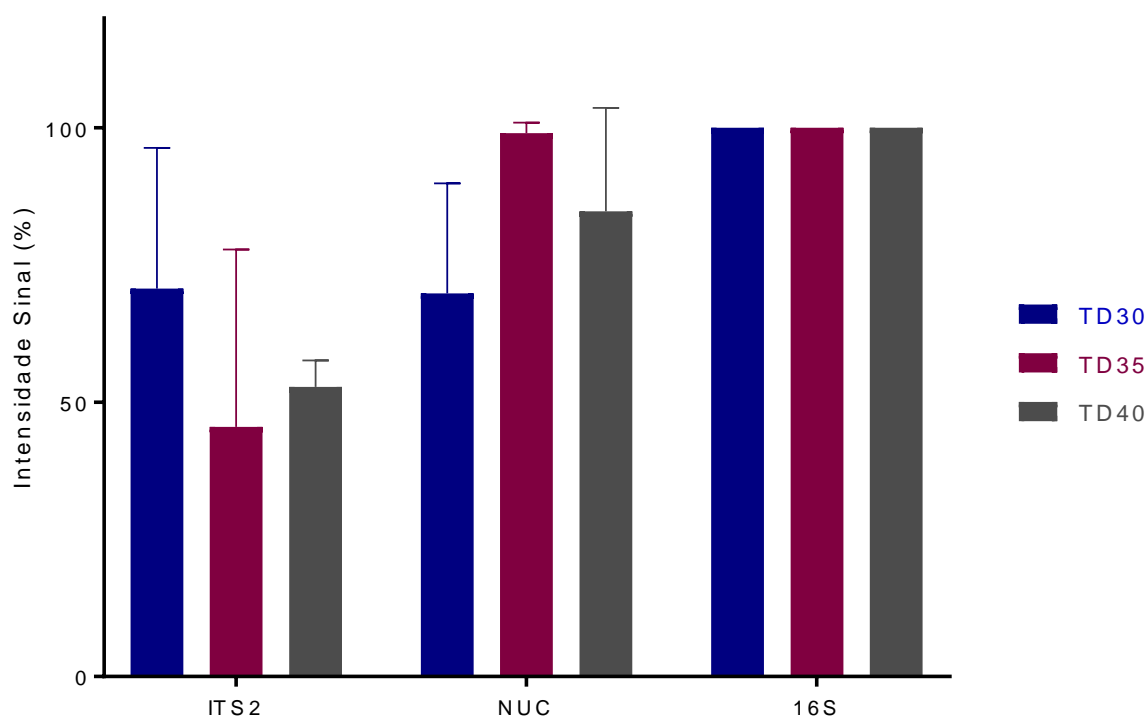


Nota: Amplificação de *K. oxytoca*, *S. aureus* e *C. albicans*. Cada resultado representa a média dos pares de sonda no chip e duplicatas de chip.
Fonte: Elaborado pela autora.

A temperatura de anelamento ótima foi a de 56 °C, que teve um ganho considerável no Gyrb e pode ser inferida como melhor que 53 °C pela tendência de aumento nas temperaturas testadas para o ITS2.

O teste de protocolos de PCR Touchdown seguidos de 30, 35 e 40 ciclos estão na Figura 25 abaixo:

FIGURA 25 - Teste de protocolo de amplificação.



Nota: Amplificação de *K. oxytoca*, *S aureus* e *C. albicans*. Cada resultado representa a média dos pares de sonda no chip e duplicatas de chip.
Fonte: Elaborado pela autora.

O protocolo escolhido foi o Touchdown seguido de 35 ciclos que não apresenta diferença significativa do 40, porém representa tempo menor para o resultado.

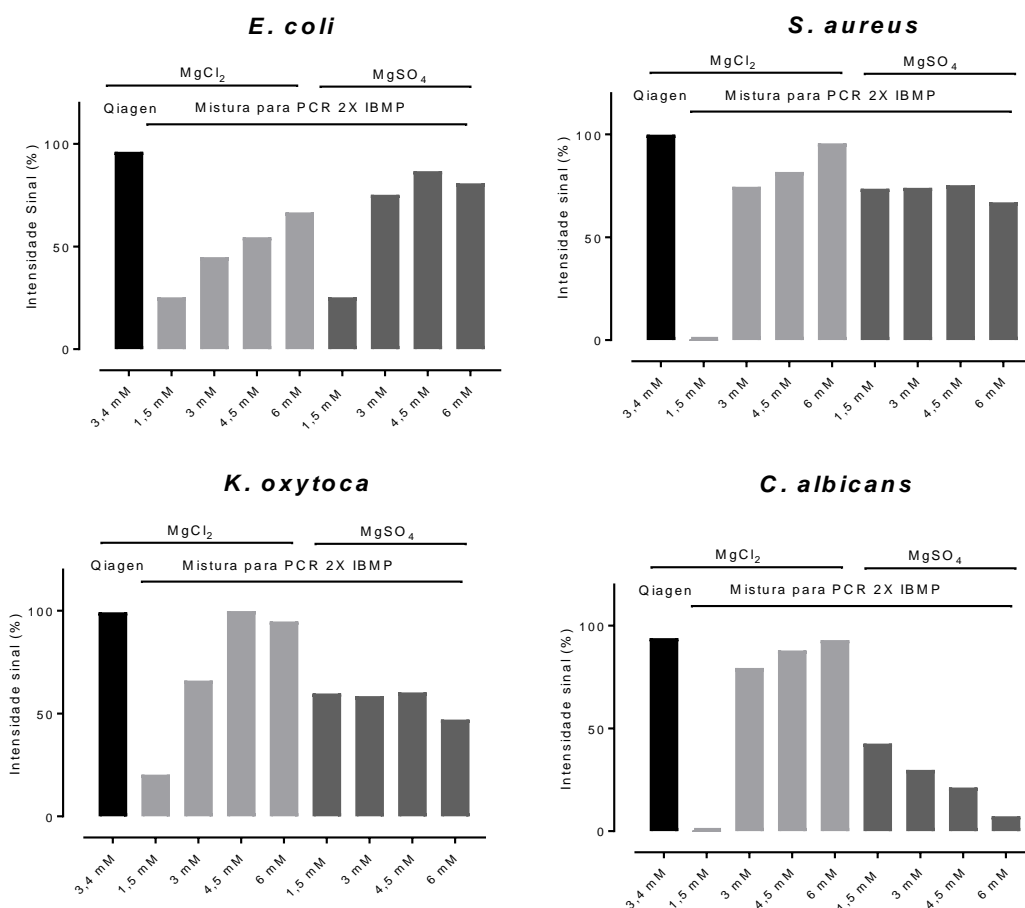
Os protocolos Stepdown e Stepup não apresentaram aumento do sinal considerável. Assim como o aumento no tempo de extensão final também não apresentou ganho algum (dados não apresentados). A melhor eficiência de amplificação foi obtida com 600 s de extensão final, esta já era utilizada anteriormente e foi mantida.

O tempo de hibridização menor, no entanto, acarretou em perda de sinal e este foi mantido para garantir sinal máximo (dados não mostrados).

4.6.4 MÓDULO DE AMPLIFICAÇÃO IBMP

A comparação do módulo de amplificação Qiagen e IBMP está representada na Figura 26 abaixo:

FIGURA 26 - Testes de concentração de sais de magnésio na mistura de PCR IBMP 2X.



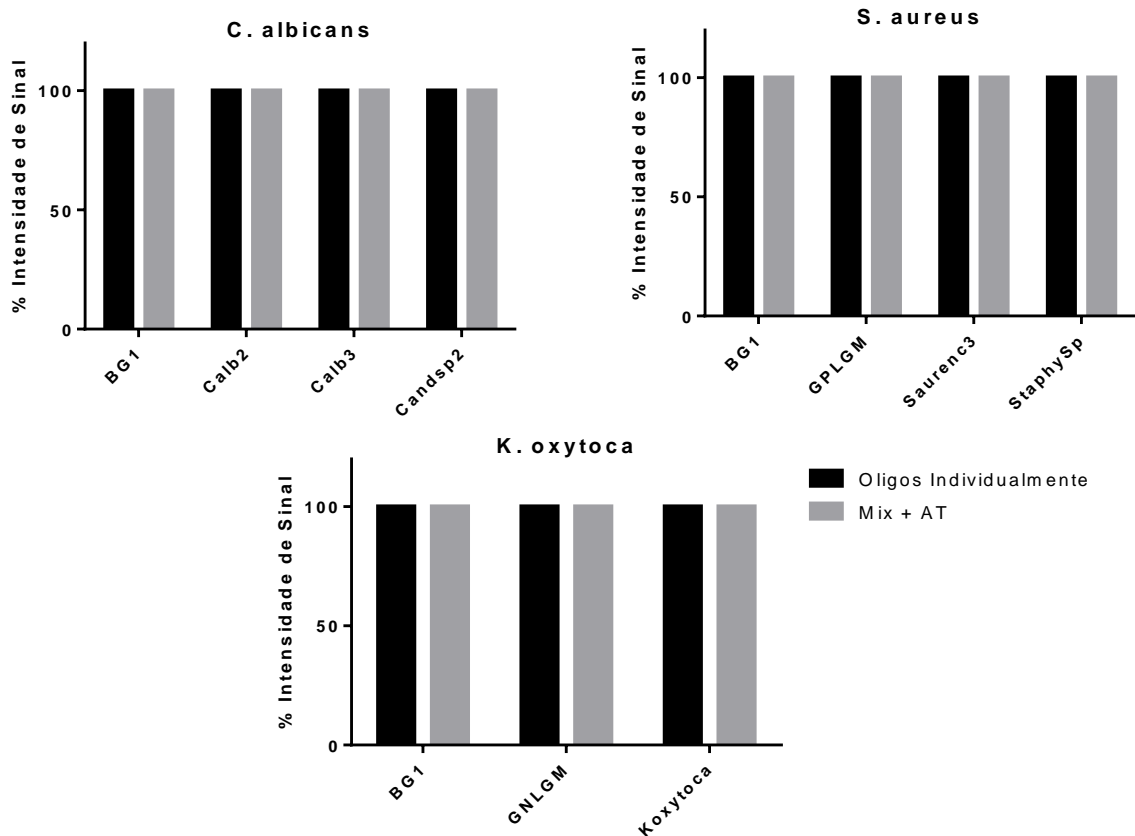
Nota: Kit de amplificação Qiagen HotStarTaq Plus DNA Polymerase foi utilizado como referência. Cada resultado representa a média dos pares de sonda no chip e duplicatas de chip.
 Fonte: Elaborado pela autora.

O sal de magnésio adicionado na forma de MgCl₂ parece apresentar melhores resultados que o MgSO₄, inclusive elevando a mistura de PCR 2X IBMP a sinais equivalentes ao comercial na concentração de 6 mM indicando seu potencial como substituto. Novos testes serão feitos para avaliar a consistência e reprodutibilidade.

4.6.5 ESTABILIDADE DO MASTERMIX

O mastermix armazenado foi testado após 1, 2 e 4 semanas no freezer a -20°C e não apresentou perdas na qualidade da amplificação, como pode ser observado no teste pós 30 dias de estocagem da Figura 27 abaixo:

FIGURA 27 - Testes de estabilidade de MasterMix 1 mês a -20°C.



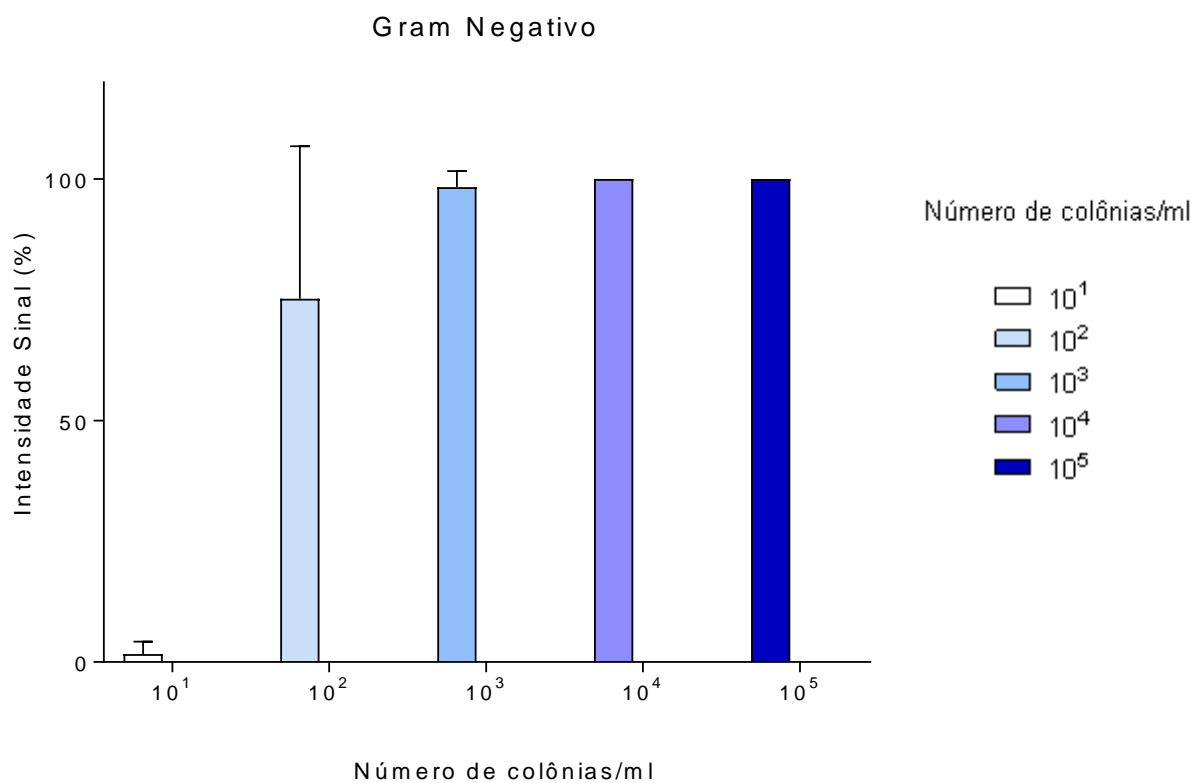
Nota: Resultados representam a média do valor de intensidade de duas sondas duplicadas no microarranjo e da duplicata experimental do chip. Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 VALIDAÇÃO LABORATORIAL

4.7.1 SENSIBILIDADE ANALÍTICA

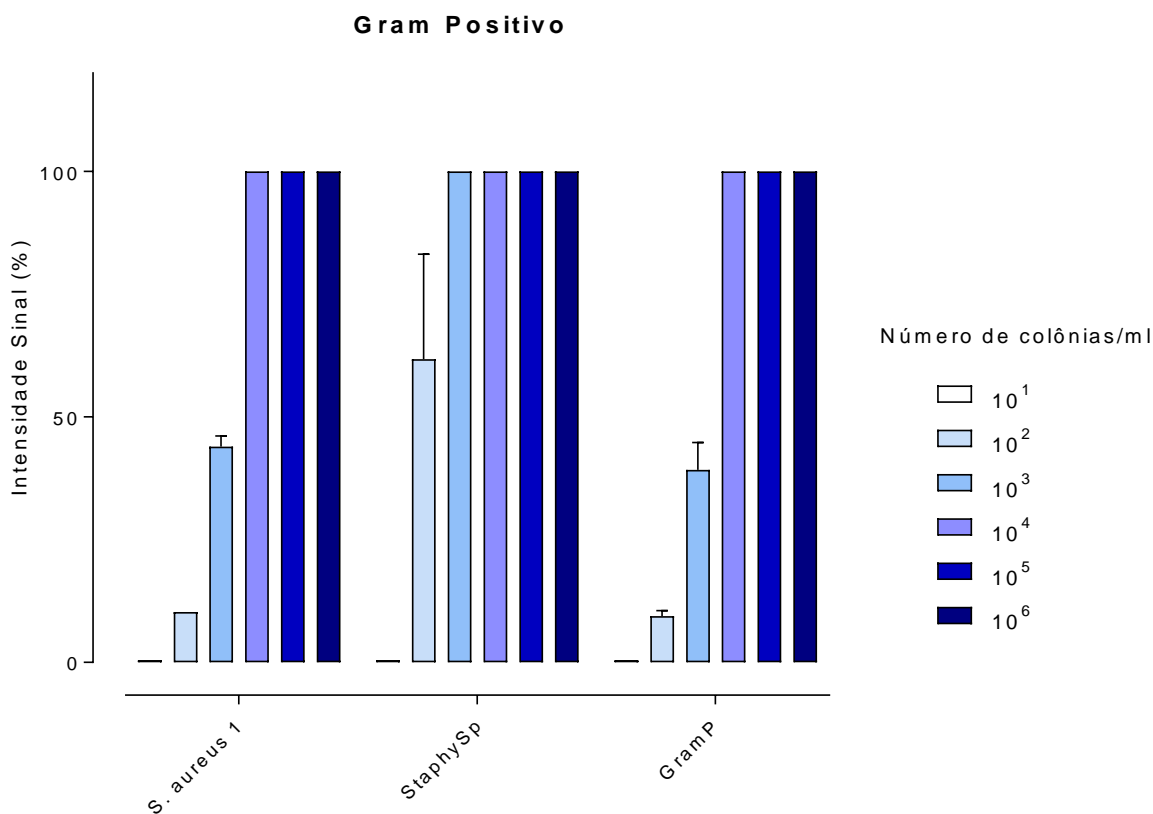
Inicialmente foi feita avaliação do limite de detecção através de uma curva de concentração de contaminações para *E. coli* e *S. aureus*. Nesta fase, o DNA foi extraído no substrato final do teste, o sangue total. Os resultados destes testes estão apresentados nas Figuras 28 e 29 respectivamente.

Figura 28 – Curva de contaminação com *E. coli*.



Nota: Resultado representa a média do valor de intensidade da sonda específica de *E. coli* duplicada no microarranjo e da duplicata experimental do chip. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 29 - Curva de contaminação com *S. aureus*.

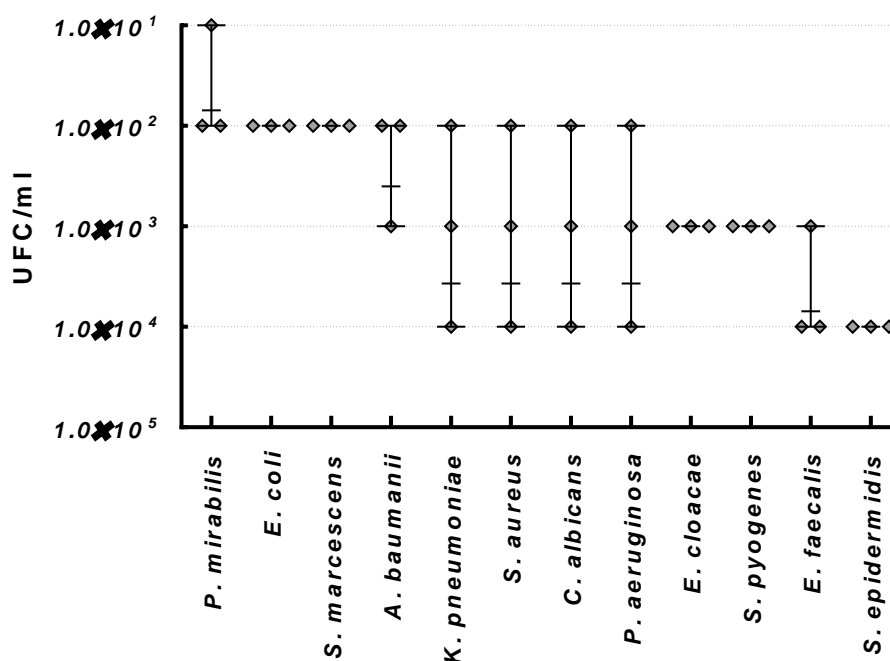


Nota: Resultado representa a média do valor de intensidade da sondas para *S. aureus* duplicadas no microarranjo e da duplicata experimental do chip. Fonte: Elaborado pela autora.

A sensibilidade analítica ou limite de detecção que pode ser inferido a partir das curvas acima é de 10² UFC/mL de sangue para ambas as bactérias testadas, onde *E. coli* representa o grupo Gram-Negativo e *S. aureus* representa o grupo Gram-Positivo.

Outros representantes do painel foram selecionados para cobrir todas as regiões de amplificação do teste e exemplos de bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos. Seus resultados de limite de detecção da curva de sensibilidade testada no chip em triplicada experimental estão compilados na Figura 30 abaixo.

Figura 30 - Limites de detecção dos representantes escolhidos do painel.



Nota: Limite de detecção em UFC/ml de triplicata de extração, considerando intensidade de sinal acima de 10% ou 6.535 em valor absoluto como positivo tendo-se um controle negativo com sinal nulo. Fonte: Elaborado pela autora.

As representantes de bactérias gram-negativas (*P. mirabilis*, *E. coli*, *S. marcescens*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*) têm limites de detecção menores. Isso pode ser explicado pela sua parede celular com menor concentração de peptidoglicanos, que lisa com maior facilidade potencializando a extração do seu DNA.

Em contraste as representantes gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* e *E. faecium*), com uma densa rede de peptidoglicanos em sua parede celular e os fungos com sua camada de polissacarídeos como quitina, β -glucanos e mananas, possuem maior resistência a lise o que explicaria seus limites de detecção superiores (Brown et al. 2015).

Também foi testada a reprodutibilidade do limite de detecção encontrado nos experimentos em triplicata acima. Foram extraídos seis amostras das três diluições mais próximas do limite de detecção estabelecido para cada um dos microrganismos com resultados mostrados na Figura 31 abaixo.

FIGURA 31 - Reprodutibilidade do limite de detecção

MO	% chips positivos				
	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
<i>S. marcescens</i>			100	100	50
<i>P. mirabilis</i>			100	91	67
<i>A. baumannii</i>			100	100	33
<i>E. coli</i>		100	100	67	
<i>E. cloacae</i>		100	100	33	
<i>E. faecalis</i>		100	33	0	
<i>S. epidermidis</i>	100	50	0		

Nota: Reprodutibilidade do limite de detecção em UFC/ml de seis chips referentes a seis amostras extraídas da mesma curva de contaminação, considerando intensidade de sinal acima de 10% ou 6.535 em valor absoluto como positivo tendo-se um controle negativo com sinal nulo. MO - micro-organismo. Fonte: Elaborado pela autora.

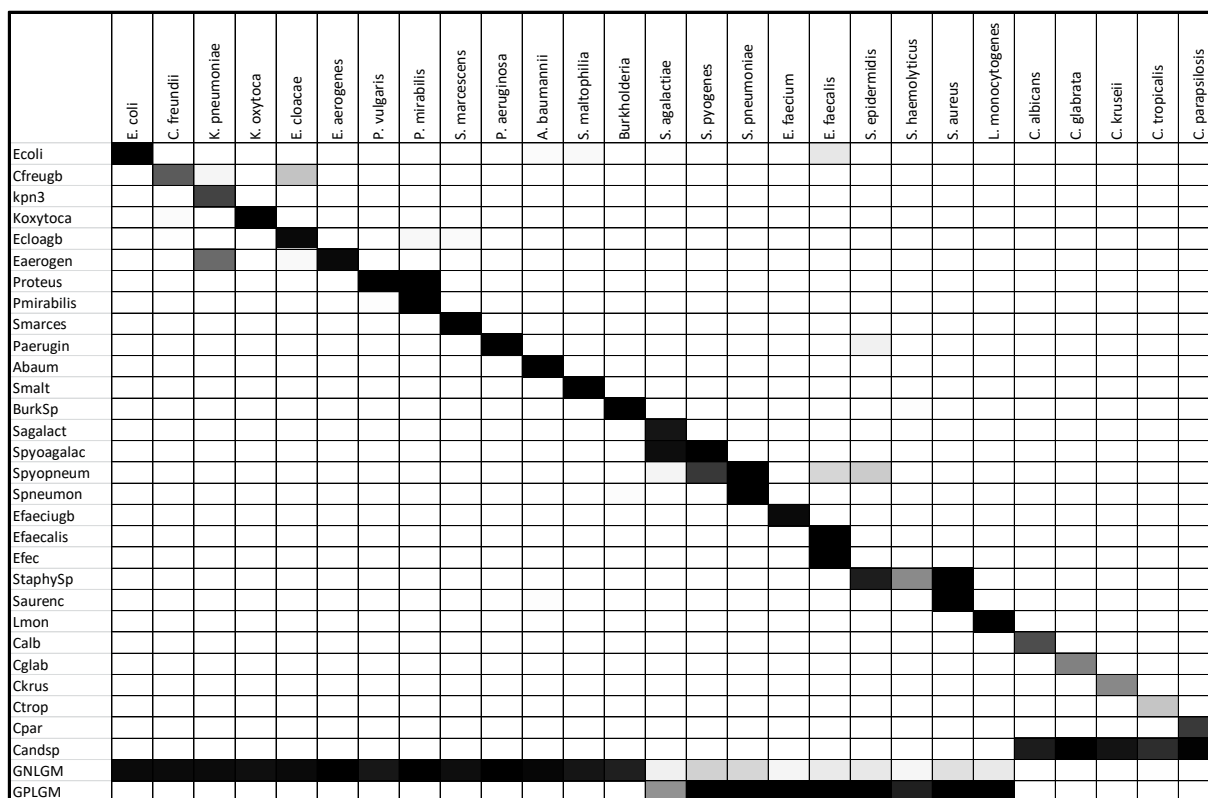
Há variabilidade dos resultados para limite de detecção, uma vez que o ensaio molecular é sensível a pequenas mudanças de concentração do DNA molde e também dos reagentes da PCR. No entanto, houve reprodução geral dos resultados previamente obtidos.

4.7.2 ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

O protótipo final foi por fim testado com diferentes isolados de todos os representantes do painel do teste artificialmente contaminados em sangue para analisar a especificidade de cada uma das sondas.

O objetivo do teste de especificidade é que somente uma diagonal seja formada, representando a sonda positiva somente para seu micro-organismo alvo respectivo como pode ser observado na Figura 32.

Figura 32 – Heatmap de especificidade do SepseDx.



Nota: Acima os micro-organismos que foram artificialmente contaminados no sangue a 10^6 cópias de genoma/ml e na esquerda as sondas presentes no chip. Intensidade de sinal representada em escala de cinza, com sinal máximo em preto. Retrata 3 isolados diferentes para cada um dos micro-organismos testados em duplicatas de chip. Fonte: Elaborado pela autora.

Foram obtidos resultados condizentes com os relativos aos do PBS, com pelo menos uma sonda específica para cada um dos micro-organismos do painel, com excessão de *M. morgani*, cuja sonda deu sinal detectável para outros isolados e por isso foi eliminada do teste.

A partir deste heatmap foi possível criar as regras de interpretação para que o software acuse o patógeno ou patógenos presentes na amostra testada de forma automática.

4.7.3 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

Das 200 amostras avaliadas foi encontrada uma alta taxa de positividade em ambos os testes, coincidentemente de 19%, ainda que esta taxa não se refira as

amostras positivas para ambos os testes. Sendo a taxa de concordância de somente cerca de um terço delas. A taxa de hemocultura positiv reportada no ano anterior de 2016 no Hospital de Clínicas foi de 10%, isto sugere uma tendência para coleta de pacientes com mais chance de desenvolver sepse dentro do estudo. Uma das causas dessa tendência pode ser a diferença de equipes trabalhando na coleta nos três turnos, assim como a aderência de cada uma delas ao procedimento de coleta adicional (Anexo 11).

Foram detectadas na hemocultura as seguintes bactérias gram-positivas: *B.cereus*, *Corynebacterium* spp., *Clostridium* spp., *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. agalactiae*, *S. aureus* e *P. acnes*. As seguintes espécies Gram-negativas: *A. baumannii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*. Para *Candida* spp., apenas *C. albicans* foi detectada.

No chip foram identificadas as gram-positivas: *E. faecalis*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. Gram-negativas: *A. baumannii*, *E. coli*, *Burkholderia* spp., *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*.

A compilação dos resultados do estudo está exemplificado na Figura 33 abaixo:

FIGURA 33 - Comparação do teste SepseDx com a hemocultura

	Hemocultura	SepseDx
Positivo	37	37
Negativo	163	163
Turn-around-time médio	> 48 h	5,4 h
Porcentagem de Positivos	19%	19%
Taxa de Concordância	29.73%	

Nota: Positivos na hemocultura desconsideraram aqueles relacionados a contaminação e no SepseDx aqueles que apresentaram intensidade de sinal não presente no controle negativo da reação.

Cada um dos métodos obteve 26 amostras positivas que o outro não detectou, 11 amostras foram detectadas por ambos os métodos com concordância da identificação da espécie.

Foram detectadas na hemocultura quatro amostras com espécies não presentes no painel do chip, são elas: *P. acnes*, *B. cereus*, *Corynebacterium* spp. e *Clostridium* spp., bactérias estas que não são comuns causadoras de sepse e por isso não foram selecionadas para o painel do teste. Sendo *P. acnes*, *Clostridium* spp. e *Corynebacterium* comumente associados a contaminação e que apresentam valor preditivo positivo abaixo de 5% (Pien et al. 2010).

Um estudo mostrou que o uso de métodos moleculares com sangue total proporciona menor taxa de mortalidade por antecipar terapia com anfotericina B e também o descalonamento da terapia em 55% dos casos. O rápido diagnóstico por PCR mostrou vantagem estatística para terapia antimicrobiana adequada ($p < 0001$) (Stoneking et al. 2013).

Apesar da taxa de concordância obtida, os resultados encontrados poderiam proporcionar benefícios similares aos pacientes, por fornecer informação vital, algumas vezes não alcançada com a hemocultura e com maior tempo de direcionar o tratamento.

5 CONCLUSÃO

A partir da compilação dos resultados dos protótipos desenvolvidos, foram selecionadas sondas para detecção e identificação dos principais micro-organismos causadores de sepse;

A otimização do protocolo de amplificação por PCR multiplex foi finalizada com inserção bem sucedida das novas regiões de amplificação por meio de ajustes que facilitaram a incorporação dos novos iniciadores apesar de suas características de alta degeneração e Tm elevada;

A especificidade das sondas selecionadas foi confirmada por meio de utilização de DNA extraído de sangue artificialmente contaminado;

Os limites de detecção foram estabelecidos e estão dentro da realidade clínica observada na condição real dos pacientes, reportados com uma densidade bacteriana de até 1000 UFC/mL no sangue periférico (Yagupsky, Nolte, 1990) ainda que densidades inferiores a 10 UFC/mL sejam comuns, especialmente em crianças (Kellogg, Manzella, Bankert, 2000);

O protocolo de execução do teste foi cerca de 9 vezes mais rápido que o método standard (razão entre o tempo final de identificação/teste SepseDx);

Finalmente, podemos concluir que o teste apresenta resultados promissores de se tornar uma alternativa de diagnóstico rápido, sensível e preciso dos principais micro-organismos causadores de sepse.

O desenvolvimento de tecnologia nacional neste sentido é então importante para viabilizar seu acesso em larga escala dentro do contexto de saúde pública. Por isso, o resultado deste projeto encontra-se em análise de viabilidade patentária.

6 PERSPECTIVAS

O estudo com amostras clínicas aponta para o potencial uso do teste de forma complementar à hemocultura. O uso de diagnóstico molecular associado a cultura já é indicado por *guidelines* com objetivo de melhorar o uso de antibióticos (Barlam et al. 2016) e seus benefícios estão sendo observados em estudos recentes (Timbrook et al. 2017) com diminuição de mortalidade e tempo de internação.

Nesse sentido, mais investigações precisam ser feitas para melhor entender os resultados do estudo clínico com estudo das informações disponíveis nos prontuários dos pacientes. Sequenciamento das amostras extraídas também poderá confirmar resultados positivos somente do teste molecular. Também será necessária a realização de estudos em outros centros.

7 REFERÊNCIAS

- Abayasekara, Lalanika M., Jennifer Perera, Vishvanath Chandrasekharan, Vaz S. Gnanam, Nisala A. Udunuwara, Dileepa S. Liyanage, Nuwani E. Bulathsinhala, et al. 2017. "Detection of Bacterial Pathogens from Clinical Specimens Using Conventional Microbial Culture and 16S Metagenomics: A Comparative Study." *BMC Infectious Diseases* 17 (1). BMC Infectious Diseases: 1–11. doi:10.1186/s12879-017-2727-8.
- Barlam, Tamar F., Sara E. Cosgrove, Lilian M. Abbo, Conan Macdougall, Audrey N. Schuetz, Edward J. Septimus, Arjun Srinivasan, et al. 2016. "Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America." *Clinical Infectious Diseases* 62 (10): 1197–1202. doi:10.1093/cid/ciw217.
- Baron, Ellen Jo, J. Michael Miller, Melvin P. Weinstein, Sandra S. Richter, Peter H. Gilligan, Richard B. Thomson, Paul Bourbeau, et al. 2013. "A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)." *Clinical Infectious Diseases* 57 (4): 485–88. doi:10.1093/cid/cit441.
- Beal, Stacy G., Jane Ciurca, Jeremy Smith, Jeffrey John, Francesca Lee, Christopher D. Doern, and Rita M. Gander. 2013. "Evaluation of the Nanosphere Verigene Gram-Positive Blood Culture Assay with the versaTREK Blood Culture System and Assessment of Possible Impact on Selected Patients." *Journal of Clinical Microbiology* 51 (12): 3988–92. doi:10.1128/JCM.01889-13.
- Bloos, Frank, Svea Sachse, Andreas Kortgen, Mathias W. Pletz, Marc Lehmann, Eberhard Straube, Niels C. Riedemann, Konrad Reinhart, and Michael Bauer. 2012. "Evaluation of a Polymerase Chain Reaction Assay for Pathogen Detection in Septic Patients under Routine Condition: An Observational Study." *PLoS ONE* 7 (9): 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0046003.
- Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M H Schein, and W. J. Sibbald. 1992. "Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis." *Chest* 101 (6): 1644–

55. doi:10.1378/chest.101.6.1644.
- Brakstad, O G, K Aasbakk, and J A Maeland. 1992. "Detection of Staphylococcus Aureus by Polymerase Chain Reaction Amplification of the Nuc Gene." *J. Clin. Microbiol.* 30 (7): 1654–60. <http://jcm.asm.org/cgi/content/long/30/7/1654>.
- Brown, Lisa, Julie M Wolf, Rafael Prados-Rosales, and Arturo Casadevall. 2015. "Through the Wall: Extracellular Vesicles in Gram-Positive Bacteria, Mycobacteria and Fungi." *Nature Reviews. Microbiology* 13 (10). Nature Publishing Group: 620–30. doi:10.1038/nrmicro3480.
- Carvalho, Renan Henrique de, Janaína Fernandes Vieira, Paulo Pinto Gontijo Filho, and Rosineide Marques Ribas. 2010. "Sepse, Sepse Grave E Choque Séptico: Aspectos Clínicos, Epidemiológicos E Prognóstico Em Pacientes de Unidade de Terapia Intensiva de Um Hospital Universitário." *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43 (5): 591–93. doi:10.1590/S0037-86822010000500025.
- Chun, Katy, Chas Syndergaard, Carlos Damas, Richard Trubey, Amruthavani Mukindaraj, Shenyu Qian, Xin Jin, Scott Breslow, and Angelika Niemz. 2015. "Sepsis Pathogen Identification." *Journal of Laboratory Automation* 5: 539–61.
- Cleven, Berit E E, Maria Palka-Santini, Jörg Gielen, Salima Meembor, Martin Krönke, and Oleg Krut. 2006. "Identification and Characterization of Bacterial Pathogens Causing Bloodstream Infections by DNA Microarray." *Journal of Clinical Microbiology* 44 (7): 2389–97. doi:10.1128/JCM.02291-05.
- Cobb, Benjamin D, and John M Clarkson. 1994. "A Simple Procedure for Optimising the Polymerase Chain Reaction (PCR) Using Modified Taguchi Methods." *Nucleic Acids Research* 22 (18): 3801–5.
- Cordioli, Ricardo Luiz, Eduardo Cordioli, Romulo Negrini, and Eliezer Silva. 2013. "Sepse E Gravidez: Sabemos Tratar?" *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 25 (4): 334–44. doi:10.5935/0103-507X.20130056.
- Corrêa, Thiago Domingos, Leonardo Lima Rocha, Camila Menezes Souza Pessoa, Eliézer Silva, and Murillo Santucci Cesar de Assuncao. 2015. "Fluid Therapy for Septic Shock Resuscitation: Which Fluid Should Be Used?" *Einstein (São Paulo)* 13 (3): 462–68. doi:10.1590/S1679-45082015RW3273.
- Dalla-Costa, Libera M, Luis G Morello, Danieli Conte, Luciane A Pereira, Jussara K Palmeiro, Altair Ambrosio, Dayane Cardozo, Marco A Krieger, and Sonia M

- Raboni. 2017. "Comparison of DNA Extraction Methods Used to Detect Bacterial and Yeast DNA from Spiked Whole Blood by Real-Time PCR," no. April.
- Dauga, Catherine. 2002. "Evolution of the *gyrB* Gene and the Molecular Phylogeny of Enterobacteriaceae: A Model Molecule for Molecular Systematic Studies." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (2): 531–47. doi:10.1099/ijs.0.01926-0.
- Dillen, Jeroen van, Joost Zwart, Joke Schutte, and Jos van Roosmalen. 2010. "Maternal Sepsis: Epidemiology, Etiology and Outcome." *Current Opinion in Infectious Diseases* 23: 249–54. doi:10.1097/QCO.0b013e328339257c.
- Ecker, D J, R Sampath, H Li, C Massire, H E Matthews, D Toleno, T A Hall, et al. 2010. "New Technology for Rapid Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections." *Expert Rev Mol Diagn* 10 (4): 399–415. doi:10.1586/erm.10.24.
- Elixhauser, Anne, Bernard Friedman, and Elizabeth Stranges. 2011. "Septicemia in US Hospitals, 2009." *Agency for Healthcare Research and Quality* 348 (62): 1–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65391/>.
- Engelkirk, Paul G., and Janet Duben-Engelkirk. 2008. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases : Essentials of Diagnostic Microbiology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fenollar, Florence, and Didier Raoult. 2007. "Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections Caused by Non-Cultivable Bacteria." *International Journal of Antimicrobial Agents* 30: 7–15. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.06.024.
- Fingar, Kathryn, and Raynard Washington. 2006. "Trends in Hospital Readmissions for Four High-Volume Conditions, 2009-2013." *HCUP Statistical Brief #196*, 1–17.
- Fleischmann, Carolin, Andre Scherag, Neill K.J. Adhikari, Christiane S. Hartog, Thomas Tsaganos, Peter Schlattmann, Derek C. Angus, and Konrad Reinhart. 2016. "Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-Treated Sepsis Current Estimates and Limitations." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193 (3): 259–72. doi:10.1164/rccm.201504-0781OC.
- Fracasso, J F. 2008. "Contribuição Ao Entendimento Da Patogenia Da Sepsis." *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 29 (2): 119–27.
- Gotts, Jeffrey E, and Michael A Matthay. 2016. "Sepsis: Pathophysiology and Clinical Management." *BMJ* 353. BMJ Publishing Group Ltd. doi:10.1136/bmj.i1585.

- Guido, Marcello, Maria Rosaria Tumolo, Antonella De Donno, Francesca Serio, Francesco Bagordo, and Antonella Zizza. 2016. "In Vitro Diagnosis of Sepsis: A Review." *Pathology and Laboratory Medicine International* 8: 1–14. doi:10.2147/PLMI.S49800.
- Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse (ILAS). 2014. *Sepse: Um Problema de Saúde Pública*. doi:10.13140/RG.2.2.29934.82243.
- Jansen, G. J., M. Mooibroek, J. Idema, H. J M Harmsen, G. W. Welling, and J. E. Degener. 2000. "Rapid Identification of Bacteria in Blood Cultures by Using Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2): 814–17.
- Jimenez, Luis, Narendra Rana, Joseph Amalraj, Kimberly Walker, and Kasey Travers. 2012. "Validation of the BacT/ALERT(R) 3D System for Rapid Sterility Testing of Biopharmaceutical Samples." *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology / PDA* 66 (1): 38–54. doi:10.5731/pdajpst.2012.00790.
- Jones, Alan E., Stephen Trzeciak, and Jeffrey A. Kline. 2010. "The Sequential Organ Failure Assessment Score for Predicting Outcome in Patients with Severe Sepsis and Evidence of Hypoperfusion at the Time of Emergency Department Presentation*." *Critical Care* 37 (5): 1649–54. doi:10.1097/CCM.0b013e31819def97.The.
- Kellogg, James A., John P. Manzella, and David A. Bankert. 2000. "Frequency of Low-Level Bacteremia in Children from Birth to Fifteen Years of Age." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (6): 2181–85. doi:10.1111/j.1469-0691.1999.tb00444.x.
- Khlif, M, C Mary, H Sellami, A Sellami, H Dumon, A Ayadi, and S Ranque. 2009. "Evaluation of Nested and Real-Time PCR Assays in the Diagnosis of Candidaemia." *European Society of Clinical Infectious Diseases* 15 (7). European Society of Clinical Infectious Diseases: 656–61. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02762.x.
- Kothari, Atul, Margie Morgan, and David A. Haake. 2014. "Emerging Technologies for Rapid Identification of Bloodstream Pathogens." *Clinical Infectious Diseases* 59: 272–78. doi:10.1093/cid/ciu292.
- Kumar, A, D Roberts, K E Wood, B Light, J E Parrillo, S Sharma, R Suppes, et al. 2006. "Duration of Hypotension before Initiation of Effective Antimicrobial Therapy Is the Critical Determinant of Survival in Human Septic Shock." *Critical*

- Care Medicine* 34 (6): 1589–96. doi:10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9.
- Kumar, Anand, Paul Ellis, Yaseen Arabi, Dan Roberts, Bruce Light, Joseph E. Parrillo, Peter Dodek, et al. 2009. “Initiation of Inappropriate Antimicrobial Therapy Results in a Fivefold Reduction of Survival in Human Septic Shock.” *Chest* 136 (5). The American College of Chest Physicians: 1237–48. doi:10.1378/chest.09-0087.
- Leligdowicz, Aleksandra, Peter M. Dodek, Monica Norena, Hubert Wong, Aseem Kumar, and Anand Kumar. 2014. “Association between Source of Infection and Hospital Mortality in Patients Who Have Septic Shock.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189 (10): 1204–13. doi:10.1164/rccm.201310-1875OC.
- Levy, M M, M P Fink, J C Marshall, E Abraham, D Angus, D Cook, J Cohen, S M Opal, J L Vincent, and G Ramsay. 2003. “2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.” *Crit Care Med.* 29 (0090–3493 (Print)): 530–38. doi:10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B.
- Loonen, Anne J M, Martine P. Bos, Bart van Meerbergen, Sigi Neerken, Arnold Catsburg, Irene Dobbelaer, Roel Penterman, et al. 2013. “Comparison of Pathogen DNA Isolation Methods from Large Volumes of Whole Blood to Improve Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections.” *PLoS ONE* 8 (8): 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0072349.
- Machado, Flavia R., Alexandre Biasi Cavalcanti, Fernando Augusto Bozza, Elaine M. Ferreira, Fernanda Sousa Angotti Carrara, Juliana Lubarino Sousa, Noemi Caixeta, Reinaldo Salomao, Derek C. Angus, and Luciano Cesar Pontes Azevedo. 2017. “The Epidemiology of Sepsis in Brazilian Intensive Care Units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): An Observational Study.” *The Lancet Infectious Diseases* 3099 (17): 1–10. doi:10.1016/S1473-3099(17)30322-5.
- Mancini, Nicasio, Silvia Carletti, Nadia Ghidoli, Paola Cichero, Roberto Burioni, and Massimo Clementi. 2010. “The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis.” *Clinical Microbiology Reviews* 23 (1): 235–51. doi:10.1128/CMR.00043-09.
- Marlowe, Elizabeth M., James J. Hogan, Janet F. Hindler, Irene Andruszkiewicz, Pat Gordon, and David A. Bruckner. 2003. “Application of an rRNA Probe Matrix for

- Rapid Identification of Bacteria and Fungi from Routine Blood Cultures.” *Journal of Clinical Microbiology* 41 (11): 5127–33. doi:10.1128/JCM.41.11.5127-5133.2003.
- Martin, Greg S. 2012. “Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock: Changes in Incidence, Pathogens and Outcomes.” *Expert Rev Anti Infect Ther* 10 (6): 701–6. doi:10.1586/eri.12.50.Sepsis.
- Martin, Greg S, David M Mannino, Stephanie Eaton, and Marc Moss. 2003. “The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000.” *The New England Journal of Medicine* 348 (16): 1546–54. doi:10.1056/NEJMoa022139.
- Mühl, Helge, Anna-Julia Kochem, Claudia Disqué, and Samir G. Sakka. 2010. “Activity and DNA Contamination of Commercial Polymerase Chain Reaction Reagents for the Universal 16S rDNA Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of Bacterial Pathogens in Blood.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66 (1). Elsevier Inc.: 41–49. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.011.
- Neely, Lori a, Mark Audeh, Nu Ai Phung, Michael Min, Adam Suchocki, Daniella Plourde, Matthew Blanco, et al. 2013. “T2 Magnetic Resonance Enables Nanoparticle-Mediated Rapid Detection of Candidemia in Whole Blood.” *Science Translational Medicine* 5 (182): 182ra54. doi:10.1126/scitranslmed.3005377.
- Nieman, A E, P H M Savelkoul, A Beishuizen, B Henrich, B Lamik, C R Mackenzie, D Kindgen-Milles, et al. 2016. “A Prospective Multicenter Evaluation of Direct Molecular Detection of Blood Stream Infection from a Clinical Perspective.” *BMC Infectious Diseases* 16: 314. doi:10.1186/s12879-016-1646-4.
- Paolucci, Michela, Maria Paola Landini, and Vittorio Sambri. 2010. “Conventional and Molecular Techniques for the Early Diagnosis of Bacteraemia.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 36 (SUPPL. 2). Elsevier B.V.: S6–16. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.11.010.
- Pien, Brian C., Punidha Sundaram, Natalia Raof, Sylvia F. Costa, Stanley Mirrett, Christopher W. Woods, L. Barth Reller, and Melvin P. Weinstein. 2010. “The Clinical and Prognostic Importance of Positive Blood Cultures in Adults.” *American Journal of Medicine* 123 (9). Elsevier Inc.: 819–28. doi:10.1016/j.amjmed.2010.03.021.
- Reinhart, Konrad, Michael Bauer, Niels C. Riedemann, and Christiane S. Hartog.

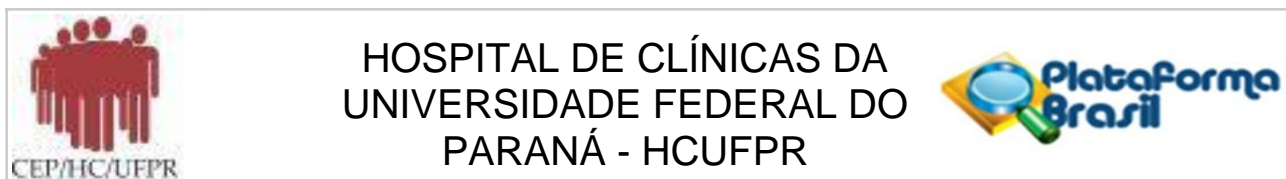
2012. "New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers." *Clinical Microbiology Reviews* 25 (4): 609–34. doi:10.1128/CMR.00016-12.
- Rhodes, Andrew, Laura E. Evans, Waleed Alhazzani, Mitchell M. Levy, Massimo Antonelli, Ricard Ferrer, Anand Kumar, et al. 2017. *Surviving Sepsis Campaign. Critical Care Medicine*. doi:10.1097/CCM.0000000000002255.
- Sales Júnior, João Andrade L., Cid Marcos David, Rodrigo Hatum, Paulo César, S P Souza, André Japiassú, Cleovaldo T S Pinheiro, et al. 2006. "Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico Da Sepse Em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras." *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 18 (1): 9–17. doi:10.1590/S0103-507X2006000100003.
- Schieffer, K. M., K. E. Tan, P. D. Stamper, A. Somogyi, S. B. Andrea, T. Wakefield, M. Romagnoli, K. C. Chapin, D. M. Wolk, and K. C. Carroll. 2014. "Multicenter Evaluation of the Sepsityper Extraction Kit and MALDI-TOF MS for Direct Identification of Positive Blood Culture Isolates Using the BD BACTEC??? FX and VersaTREK?? Diagnostic Blood Culture Systems." *Journal of Applied Microbiology* 116 (4): 934–41. doi:10.1111/jam.12434.
- Scola, Bernard La, and Didier Raoult. 2009. "Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry." *PLoS ONE* 4 (11). doi:10.1371/journal.pone.0008041.
- Seventieth World Health Assembly. 2017. "Improving the Prevention, Diagnosis and Clinical Management of Sepsis." http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA70/A70_R7-en.pdf.
- Shah, Birju A, and James F Padbury. 2014. "Neonatal Sepsis: An Old Problem with New Insights." *Virulence* 5 (1): 170–78. doi:10.4161/viru.26906.
- Shankar-Hari, M, GS Phillips, ML Levy, CW Seymour, VX Liu, CS Deutschman, DC Angus, GD Rubenfeld, and M Singer. 2016. "Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock." *Jama* 315 (8): 775. doi:10.1001/jama.2016.0289.
- Singer, M., et al., Rinaldo Bellomo, Gordon R Bernard, Jean-daniel Chiche, M Craig, Richard S Hotchkiss, Mitchell M Levy, et al. 2016. "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." *Jama* 315 (8): 801–10. doi:10.1001/jama.2016.0287.The.

- Sprung, Charles L., and Uriel Trahtemberg. 2017. "What Definition Should We Use for Sepsis and Septic Shock?*" *Critical Care Medicine* 45 (9): 1564–67. doi:10.1097/CCM.0000000000002544.
- Stevenson, Lindsay G., Steven K. Drake, and Patrick R. Murray. 2010. "Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (2): 444–47. doi:10.1128/JCM.01541-09.
- Stoneking, Lisa R., Asad E. Patanwala, John P. Winkler, Albert B. Fiorello, Elizabeth S. Lee, Daniel P. Olson, and Donna M. Wolk. 2013. "Would Earlier Microbe Identification Alter Antibiotic Therapy in Bacteremic Emergency Department Patients?" *Journal of Emergency Medicine* 44 (1). Elsevier Ltd: 1–8. doi:10.1016/j.jemermed.2012.02.036.
- Taniguchi, Leandro U, Ana Luiza Bierrenbach, Cristiana M Toscano, Guilherme P P Schettino, and Luciano C P Azevedo. 2014. "Sepsis-Related Deaths in Brazil: An Analysis of the National Mortality Registry from 2002 to 2010." *Critical Care (London, England)* 18 (6): 608. doi:10.1186/s13054-014-0608-8.
- Timbrook, Tristan T., Jacob B. Morton, Kevin W. Mcconeghy, Aisling R. Caffrey, Eleftherios Mylonakis, and Kerry L. LaPlante. 2017. "The Effect of Molecular Rapid Diagnostic Testing on Clinical Outcomes in Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clinical Infectious Diseases* 64 (1): 15–23. doi:10.1093/cid/ciw649.
- Tissari, Päivi, Alimuddin Zumla, Eveliina Tarkka, Sointu Mero, Laura Savolainen, Martti Vaara, Anne Aittakorpi, et al. 2009. "Accurate and Rapid Identification of Bacterial Species from Positive Blood Cultures with a DNA-Based Microarray Platform: An Observational Study." *Lancet (London, England)* 375: 224–30. doi:10.1016/S0140.
- Togawa, R.C. and Brigido, M.M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi 14th to 16th May 2003. Ribeirão Preto. (2003) - <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>
- Ubukata, K., S. Nakagami, A. Nitta, A. Yamane, S. Kawakami, M. Sugiura, and M. Konno. 1992. "Rapid Detection of the *mecA* Gene in Methicillin-Resistant Staphylococci by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction Products."

- Journal of Clinical Microbiology* 30 (7): 1728–33.
- “Veredus Laboratories ©.” 2016. <http://vereduslabs.com/>.
- Vincent, Jean-Louis, Yasser Sakr, Charles L Sprung, V Marco Ranieri, Konrad Reinhart, Herwig Gerlach, Rui Moreno, Jean Carlet, Jean-Roger Le Gall, and Didier Payen. 2006. “Sepsis in European Intensive Care Units: Results of the SOAP Study.” *Critical Care Medicine* 34 (2): 344–53. doi:10.1097/01.CCM.0000194725.48928.3A.
- Vincent Liu, Gabriel J. Escobar, and et al John D. Greene. 2014. “Hospital Deaths in Patients with Sepsis from 2 Independent Cohorts.” *JAMA Pediatrics* 312 (1): 90–92. doi:10.1001/jama.2014.5804.Author.
- Vught, Lonneke A. van, Peter M. C. Klein Klouwenberg, Cristian Spitoni, Brendon P. Scicluna, Maryse A. Wiewel, Janneke Horn, Marcus J. Schultz, et al. 2016. “Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis.” *Jama* 315 (14): 1469. doi:10.1001/jama.2016.2691.
- Wellinghausen, Nele, Anna Julia Kochem, Claudia Disqué, Helge Mühl, Susanne Gebert, Juliane Winter, Jens Matten, and Samir G. Sakka. 2009. “Diagnosis of Bacteremia in Whole-Blood Samples by Use of a Commercial Universal 16S rRNA Gene-Based PCR and Sequence Analysis.” *Journal of Clinical Microbiology* 47 (9): 2759–65. doi:10.1128/JCM.00567-09.
- Weston, Emily J, Tracy Pondo, Melissa M Lewis, Pat Martell-cleary, Craig Morin, Brenda Jewell, Pam Daily, et al. 2012. “The Burden of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis in the United States, 2005–2008.” *Pediatr Infect Dis J.* 30 (11): 937–41. doi:10.1097/INF.0b013e318223bad2.The.
- Winters, Bradford D, Michael Eberlein, Janice Leung, Dale M Needham, Peter J Pronovost, and Jonathan E Sevransky. 2010. “Long-Term Mortality and Quality of Life in Sepsis: A Systematic Review.” *Critical Care Medicine* 38 (5): 1276–83. doi:10.1097/CCM.0b013e3181d8cc1d.
- Yagupsky, Pablo, and Frederick S. Nolte. 1990. “Quantitative Aspects of Septicemia.” *Clinical Microbiology Reviews* 3 (3): 269–79. doi:10.1128/CMR.00043-09.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo piloto para validação clínica de método molecular para a detecção de patógenos em pacientes com septicemia

Pesquisador: Sonia Mara Raboni

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 32074614.5.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 765.009

Data da Relatoria: 07/07/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer do CEP nº 702.962 de 09/06/2014.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer do CEP nº 702.962 de 09/06/2014.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer do CEP nº 702.962 de 09/06/2014.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer do CEP nº 702.962 de 09/06/2014.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

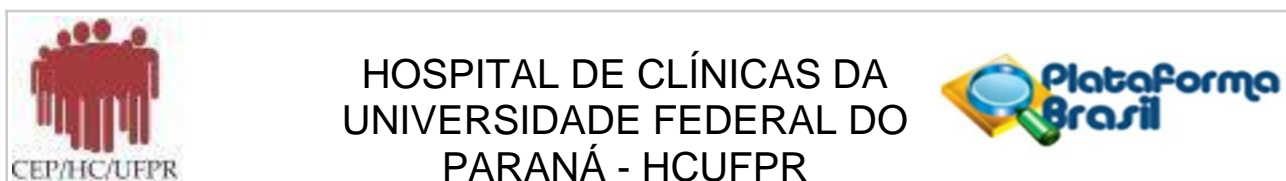
Pesquisador atendeu as pendências do CEP e os TCLEs estão de acordo com as normas éticas.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas adequadamente. Projeto considerado aprovado.

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****SITUAÇÃO DO PARECER:**

Aprovado

NECESSITA APRECIÇÃO DA CONEP:

Não

CONSIDERAÇÕES FINAIS A CRITÉRIO DO CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa. O pesquisador deve manter os documentos arquivados sob sua responsabilidade, pelo prazo de cinco anos após o término da pesquisa.

CURITIBA, 26 de Agosto de 2014

Assinado por:

Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Anexo 2 - Sequências da região 16S e ITS1 coletadas do Genbank e obtidas através de sequenciamento de isolados clínicos do Hospital de Clínicas da UFPR

Espécie	Accession Number	Espécie	Accession Number
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CP000521.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JN412064.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	JN644533.1	<i>Pseudomonas fluorescen</i>	AB680968.1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	AY800383.1	<i>Pseudomonas luteola</i>	AB681955.1
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	AY586400.2	<i>Proteus mirabilis</i> .ATCC.29906	MF541400.1
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	GU991530.1	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AB727359.1
<i>Acinetobacter junii</i>	AJ785004.1	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	HQ331135.1
<i>Acinetobacter junii</i>	KY418004.1	<i>Pseudomonas putida</i>	AF094743.1
<i>Acinetobacter baumannii</i> 28	Isolado HC	<i>Pseudomonas putida</i>	AB008001.1
<i>Acinetobacter baumannii</i> 39	Isolado HC	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DQ059546.1
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5	Isolado HC	<i>Proteus vulgaris</i>	X07652.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	CP000458.1	<i>Proteus vulgaris</i>	DQ453959.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	CP000959.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 14	Isolado HC
<i>Burkholderia cepacia</i>	AY741334.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 34	Isolado HC
<i>Burkholderia cepacia</i>	AY741351.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8	Isolado HC
<i>Burkholderia cepacia</i>	AB051408.1	<i>Proteus mirabilis</i> 1031L	Isolado HC
<i>Burkholderia mallei</i>	CP017176.1	<i>Proteus mirabilis</i> 1615L	Isolado HC
<i>Burkholderia multivorans</i>	CP013432.1	<i>Proteus mirabilis</i> 259C	Isolado HC
<i>Burkholderia multivorans</i>	FJ932759.1	<i>Proteus mirabilis</i> 294C	Isolado HC
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	MF523223.1	<i>Proteus mirabilis</i> 341	Isolado HC
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	AB568119.1	<i>Proteus mirabilis</i> 344C	Isolado HC
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Isolado HC	<i>Proteus mirabilis</i> 43L	Isolado HC
<i>Burkholderia cepacia</i>	Isolado HC	<i>Proteus mirabilis</i> 475	Isolado HC
<i>Burkholderia multivorans</i>	Isolado HC	<i>Proteus mirabilis</i> 660L	Isolado HC
<i>Citrobacter freundii</i>	AB210978.1	<i>Proteus mirabilis</i> 917L	Isolado HC
<i>Citrobacter freundii</i> 866	Isolado HC	<i>Proteus mirabilis</i> 95	Isolado HC
<i>Citrobacter freundii</i> 958	Isolado HC	<i>Proteus vulgaris</i> 1272L	Isolado HC
<i>Enterobacter cloacae</i>	CP001918.1	<i>Proteus vulgaris</i> 230L	Isolado HC
<i>Enterobacter cloacae</i>	CP003737.1	<i>Proteus vulgaris</i> 5	Isolado HC
<i>Escherichia coli</i>	CP000946.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CP000029.1
<i>Escherichia coli</i>	CP022689.1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AP006716.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	AE016830.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AM743169.1
<i>Enterococcus faecium</i>	CP003351.1	<i>Serratia marcescens</i>	AJ233431.1
<i>Enterococcus faecium</i>	CP003583.1	<i>Serratia marcescens</i>	GU826156.1
<i>Enterobacter aerogenes</i> 119	Isolado HC	<i>Serratia marcescens</i>	JN896750.1
<i>Enterobacter aerogenes</i> 16	Isolado HC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CP002176.1
<i>Enterobacter aerogenes</i> 35	Isolado HC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CP002121.1
<i>Enterobacter cloacae</i> 254	Isolado HC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CP000919.1
<i>Enterobacter cloacae</i> 407	Isolado HC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AE007317.1
<i>Enterobacter cloacae</i> 118	Isolado HC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CP003121.1
<i>Escherichia coli</i> 515	Isolado HC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	AE014074.1
<i>Escherichia coli</i> 894	Isolado HC	<i>Streptococcus agalactiae</i> C1A10	Isolado HC
<i>Escherichia coli</i> C1B2	Isolado HC	<i>Streptococcus agalactiae</i> C1A6	Isolado HC
<i>Enterococcus faecalis</i> -C1A3	Isolado HC	<i>Staphylococcus aureus</i> C1A2-MRSA	Isolado HC
<i>Enterococcus faecalis</i> -vanA	Isolado HC	<i>Staphylococcus aureus</i> C1A3-MRSA	Isolado HC
<i>Enterococcus faecalis</i> -vanB	Isolado HC	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 7	Isolado HC
<i>Enterococcus faecium</i> -C1A4	Isolado HC	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 8	Isolado HC
<i>Enterococcus faecium</i> -C1A6	Isolado HC	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 31	Isolado HC
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CP003218.1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 35	Isolado HC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AP006725.1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 42	Isolado HC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP003200.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 440	Isolado HC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP000647.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 6430	Isolado HC
<i>Klebsiella oxytoca</i> 204	Isolado HC	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 7851	Isolado HC
<i>Klebsiella oxytoca</i> 635	Isolado HC	<i>Serratia marcescens</i> 26	Isolado HC
<i>Klebsiella oxytoca</i> 906	Isolado HC	<i>Serratia marcescens</i> 27	Isolado HC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 19	Isolado HC	<i>Serratia marcescens</i> 290	Isolado HC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 349	Isolado HC	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 8446	Isolado HC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 399	Isolado HC	<i>Streptococcus pyogenes</i> 6378	Isolado HC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 99	Isolado HC	<i>Streptococcus pyogenes</i> 6556	Isolado HC
<i>Listeria monocytogenes</i>	CP002004.1	<i>Streptococcus pyogenes</i> 6663	Isolado HC
<i>Listeria monocytogenes</i>	CP002001.1	<i>Candida albicans</i>	JN606308.1
<i>Listeria monocytogenes</i> 1771L	Isolado HC	<i>Candida albicans</i>	JN606304.1
<i>Listeria monocytogenes</i> 3593L	Isolado HC	<i>Candida albicans</i>	JN606296.1
<i>Listeria monocytogenes</i> 384L	Isolado HC	<i>Candida tropicalis</i>	GQ376071.1
<i>Listeria monocytogenes</i> 394L	Isolado HC	<i>Candida parapsilosis</i>	KC777378.1
<i>Morganella morganii</i>	CP004345.1	<i>Candida glabrata</i>	FN652301.1
<i>Morganella morganii</i> 1034	Isolado HC	<i>Candida krusei</i>	JF715197.1
<i>Morganella morganii</i> 46C	Isolado HC	<i>Aspergillus fumigatus</i>	JF729022.1

Anexo 3 - Sondas presentes no microarranjo do protótipo Sepsis1.0

Alvo	Sonda	Sequência (5'-3')	Fonte	Alvo	Sonda	Sequência (5'-3')	Fonte
16S1	16SUnivF1	TTTTTTTCTACGGGAGGCAGCAG	Este Estudo	16S3	Efaecium	TTGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATC	Este Estudo
16S2	16SUnivF2	TTAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC	Este Estudo	16S3	Staphyloc1	TGGACAATACAAAGGGCAGCGAAAC	Este Estudo
16S3	16SUnivF3	TTTTTTTCCCGYAACGAGCGCAAC	Este Estudo	16S3	Staphyloc2	GCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCCG	Este Estudo
16S2	GramP	TTTTTCGCATTAAGCACTCCGCCTG	Este Estudo	16S1	Saureus	CATATGTGTAAGTAAGTGTGCACAT	Este Estudo
16S2	GramN	TTTTTGCTGCTGATGGCTGCTGCTCA	Este Estudo	16S3	Streptococ	TTTGGTGACGGCAAGCTAATCTCTT	Este Estudo
16S1	Ecoli	GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG	Este Estudo	16S3	Sagalact	TGGCTTTCTCTCGGAGCAGAAGTG	Este Estudo
16S1	kpneumoni	TTTTTTTAGGAAGGCGGTGAGGTTA	Este Estudo	16S1	Spneumon1	GTAAGAGAAGAACGAGTGTGAGAGTGG	Este Estudo
16S2	Koxytoca	TTTTTTGTGTTCCTTGAGGAGTG	Este Estudo	16S2	Spneumon2	TGTTTTCTTCGGACAGAGGTGAC	Este Estudo
16S1	Ecloacae	TTTTTAATAACCGCAGCAATTGAC	Este Estudo	16S2	Spyogenes	AGAGTTTTACTTCGGTACATCGGTGAC	Este Estudo
16S1	Eaerogenes	TTTTCGTTAAGGTTAATAACCTTGG	Este Estudo	16S3	Lmonocytog	TTTTAAAGTACTGCCGGTGCAAGC	Este Estudo
16S1	Smarcescer	GGTGGTGAGCTTAATACGTTCAATTTG	Este Estudo	ITS1	Calbicans	TTTTTGCCGCCAGAGGTCTAAACTT	Este Estudo
16S2	Proteus	CTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAG	Este Estudo	ITS1	Cglabrata1	TTTTGGGAGTTCTCCCAGTGGATGC	Este Estudo
16S1	Pmirabilis	GTGATAAGGTTAATACCTTGTAATTG	Este Estudo	ITS1	Cglabrata2	CTTTACTACTATTCTTTTGTTCGTTGGGGAA	Este Estudo
16S1	Pvulgaris	AAGTTAATACCTTTATCAATTGACG	Este Estudo	ITS1	Ckrusei1	GAACGAAAACAACAACCTAAAATGTGG	Este Estudo
16S1	Mmorganii	TTTTTAGTCGGGAGGAAGGTGCAA	Este Estudo	ITS1	Ckrusei2	GCATATAGTCGACAAGAGAAATCTACG	Este Estudo
16S1	Cfreundii	TTTTGAAGGCGTTGTGGTTAATAAC	Este Estudo	ITS1	Cparapsilo	TTTTTCTATATGGGGCCTGCCAGAG	Este Estudo
16S1	Pseudomon	TTTTCACTTTAAGTTGGGAGGAAGG	Este Estudo	ITS1	Ctropical	TTTTGAGCAATCCTACCGCCAGAGG	Este Estudo
16S1	Paeruginos	GGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTTTTTG	Este Estudo	ITS1	Afumigat1	TCCGTGTCTATCGTACCTTGTGCT	Este Estudo
16S1	Acinetobac	TTTTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACT	Este Estudo	ITS1	Afumigat2	CCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTAT	Este Estudo
16S3	Abaumannii	TCCTTACTTGCCAGCATTTCCGGATG	Este Estudo	β-globina	hB-globin	TTTGGTGCATCTGACTCCTGAGGAG	Este Estudo
16S1	Smaltophil	GTTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCT	Este Estudo	AT	AT683	AGTGAGGGAGGAGATGGAACCATCT	Este Estudo
16S2	Burkhold1	AGTTGTTGGGATTCAATTTCTTAGTAAC	Este Estudo	AT	AT730	CACAACACAAGTACCTGACATGGCG	Este Estudo
16S2	Burkhold2	TTTTTTCGAAAGAGAACCGGCGCAC	Este Estudo	AT	AT776	TGGTCTTCTTAAAGATTAGTAGGT	Este Estudo
16S1	Enterococo	TTTTTCTCTCAGTTCGGATTGCAG	Este Estudo	AT	AT809	GGCAAAGGAGCTGCTAAGGGATTTTC	Este Estudo
16S1	Efaecalis1	TTTTCTGAACGTCCCTGACGGTAT	Este Estudo	AT	AT1_1	ATTTCAATTTCTTTTGTGTAATTTGCAT	Este Estudo
16S3	Efaecalis2	TTTTTTTGAGTCGCTAGACCGCGAG	Este Estudo	AT	AT1_5	GATATTGATTGGTGTTCGAGGAT	Este Estudo

Anexo 4 - Sondas presentes no microarranjo do protótipo Sepsis2.0

Alvo	Sonda	Sequência (5'-3')	Fonte	Alvo	Sonda	Sequência (5'-3')	Fonte
16S1	GP141	CTGAYSSAGCAACGCCGCG	Este Estudo	16S1	ena4	GGCGATTGACGTTACTCGCAGA	Este Estudo
16S1	GPLGM	CTGACSGAGCAACGCCGCG	Este Estudo	16S1	mom3	AGTCGGGAGGAAGGTGTCAAG	Este Estudo
16S1	GN142	CCTGAYSCAGCMATGCCGCG	Este Estudo	16S1	pmi4	GGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCC	Este Estudo
16S1	GNLGM	CCTGATSCAGCMATGCCGCG	Este Estudo	16S2	pmi6	GTCCGATTTAGAGGTTGTGCTTGAAC	Este Estudo
16S2	Eco1	GATGTCGACTTGAGGTTGTCCTTGAG	Este Estudo	16S3	psa5	CGGGTGGCACTTAAGGAGA	Este Estudo
16S1	Kpneumo1	GGAGGAAGGCGKTGAGGTTAATAAC	Este Estudo	16S1	sem2	CAGCGAGGAGGAAGGTGGTG	Este Estudo
16S1	Kpneumo2	TAACTCRTCAGATTGACGTTACCCGAG	Este Estudo	16S3	sma3	GCGACGGTAAGCCAATCCCA	Este Estudo
16S3	Kpneumo3	CTTACGACCAAGGCTACACACGTGC	Este Estudo	16S1	spn5	CTTTGGAACTGTTAACTTGAGTGCAAGA	Este Estudo
16S2	Koxy1	TTGGAGGTTGTCCTTGAGGATGGCTT	Este Estudo	16S1	efa42	GAAGAACAAGGATGAGAGTAAGTTCATCCCTGACGG	Este Estudo
16S3	Ecloac1	GTCCTCAAATGGCGCATACAAAGAGAACCG	Este Estudo	16S1	sar3	ACATATGTGTAAAGTAAGTGTCA	Este Estudo
16S3	ProtSp1	TCCTTTAGAGATAGAGGATGCCTT	Este Estudo	16S2	sep1	TAGAGATAGAGTTTTCCCTT	Este Estudo
16S2	ProtSp2	ATTTAGAGGTTGTGCTTGAAC	Este Estudo	16S2	sep2	CCAAATCTTGACATCCCTGACCC	Este Estudo
16S1	Mmorg1	TAACTTGGCAAATGACGTTACCG	Este Estudo	16S1	efc4	CAAGGACGTTAGTAAGTGAAC	Este Estudo
16S3	Mmorg2	CAAAGGGAAGCGACCCCGCAGG	Este Estudo	ITS2	Fungi1	TCTTTGAACGCACATTGCGCCC	Este Estudo
16S1	Abaum1	TACTTTAGTTAAACCTAGAGATAGTGG	Este Estudo	ITS2	Fungi2	TCTTTGAACGCACATTGCG	Este Estudo
16S2	Small1	GTGCAATTTGGCAGCAGTA	Este Estudo	ITS2	Candsp1	GGGCATGCCTGTTTGACGCTC	Este Estudo
16S2	Small2	ATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGG	Este Estudo	ITS2	Candsp2	TTTGACCTCAAATCAGGTAGG	Este Estudo
16S2	Small3	CAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAG	Este Estudo	ITS2	Calb1	GGTGTGAGCAATACGACTTGGG	Este Estudo
16S2	Small4	GCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGC	Este Estudo	ITS2	Calb2	GATCGCTTTGCAATGCGTTAGGTC	Este Estudo
16S3	Small5	CGGCGACGGTAAGCCAATCC	Este Estudo	ITS2	Calb3	GTCCACCAGCATATCTTCAAAC	Este Estudo
16S1	BurkhoSp1	GGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGG	Este Estudo	ITS2	Cglab1	AGTTAACTGAAATGTTAGGCCATATC	Este Estudo
16S2	BurkhoSp2	CTCGAAAGAAAGCGCGCAG	Este Estudo	ITS2	Cglab2	GCTTCTTAATTAATCTGCTCTCG	Este Estudo
16S3	BurkhoSp3	GTTGCTACGCAAGACACTCTAAG	Este Estudo	ITS2	Cglab3	CTGTATTAGGTTTTACCAACTC	Este Estudo
16S3	EnterocoSp1	CAACCCATTATGTTAGTTGCCATCATT	Este Estudo	ITS2	Cglab4	GTGCTGGGCAGACAGACGTC	Este Estudo
16S1	Efec1	GAAGAACAAGGACGTTAGTAAGTGAAC	Este Estudo	ITS2	Cpar1	TTTGGTGTGAGCGATAC	Este Estudo
16S1	Efec2	GACGTTAGTAAGTGAACGTTCCCTG	Este Estudo	ITS2	Cpar2	GGAGATAAACTAATGGATAGG	Este Estudo
16S3	Efec3	CGAGTCGCTAGACCCGAG	Este Estudo	ITS2	Cpar3	CCAAAACCTTCTCCAAATTCG	Este Estudo
16S3	Efaeiu1	ATTGAGTTGGCACTCTAGCAAGAC	Este Estudo	ITS2	Ctrop1	GAAAACCTATTTAAGCGACTTAGG	Este Estudo
16S3	StaphSp1	AACCCTTAAGCTTAGTTGCCAT	Este Estudo	ITS2	Ctrop2	CCACCACAAATTTATTCATAAC	Este Estudo
16S3	StaphSp2	TCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAA	Este Estudo	ITS2	Ckrus1	CGGACGACGTGTAAGAGCGG	Este Estudo
16S2	Saga1	GACATCCTTCTGACCCGCCTAGAGATAG	Este Estudo	ITS2	Ckrus2	CTGGCCGAGCGAACTAGAC	Este Estudo
16S1	Saga2	GAACGTTGGTAGGAGTGGAAAATCTACC	Este Estudo	ITS2	Ckrus3	GAGAGCGAGTGTGCGAGA	Este Estudo
16S1	Spneumo1	AAAGTTCACACTGTGACGGTATCTTACC	Este Estudo	ITS2	Afum1	TTGTGTGTTGGCCCCCGTC	Este Estudo
16S2	Spneumo2	GGTTTAGTCCCTAGCTAACGCAATTAAG	Este Estudo	ITS2	Afum2	TCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG	Este Estudo
16S1	Spyoge1	GAATGATGGTGGAGTGGAAAATCC	Este Estudo	ITS2	Afum3	GACACCCAACTTTATTTTCTAAG	Este Estudo
16S2	Spyoge2	GACATCCCGATGCCCGCTAGAGATAGAG	Este Estudo	ITS2	FungQuant	TGGTGCAATGGCCGTT	Este Estudo
16S2	Spyoge3	AGATAGAGTTTACTTCGGTACATCGGTTG	Este Estudo	ITS2	FungPanAC	ACTTGTGCGCTATCGGTCTCYSGCC	Este Estudo
16S3	Lmonocy11	GGATAGTACAAAGGGTCGCGAAG	Este Estudo	RNAseP	RNAseP	TTCTGACCTGAAGGCTGCGCG	Este Estudo
16S3	Lmonocy12	GAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATC	Este Estudo	AT	AT1_1	ATTTCAATTTCTTTTGTGTAATTTGCAT	Este Estudo
16S2	Lmonocy13	TTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTT	Este Estudo	AT	AT1_5	GATA TTGATTTGGTGTGTTGCAAGAT	Este Estudo
16S1	Lmonocy14	CAAGGATAAGAGTAATGCTTGCCCTTG	Este Estudo	AT	AT683	AGTGAGGGAGGAGATGGAACCATCT	Este Estudo
16S1	aba2	CTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTAC	Este Estudo	AT	AT730	CACAACACAAGTACCTGACATGGCG	Este Estudo
16S1	ci12	CGAGGAGAAAGCGTTGTGG	Este Estudo	AT	AT776	TGGTCTTCTTAAAGATTAGTGGT	Este Estudo
16S1	ci13	CAGCGATTGACGTTACTCGCAGA	Este Estudo	AT	AT809	GGCAAAGGAGCTGCTAAGGGATTTTC	Este Estudo
16S1	ena2	AGGAGGAAGCGTTAAGGTTAATAACC	Este Estudo	β-globina	BG1	GCAGAGCCATCTATTGCTTAC	Este Estudo
16S1	ena3	GTTAATAACCTTGGCGATTG	Este Estudo	β-globina	BG2	CTAGGGTTGGCCAATCTACTC	Este Estudo

Anexo 5 - Sequências do gene GyrB coletadas do Genbank utilizadas no alinhamento

Espécie	Accession Number	Espécie	Accession Number
<i>Citrobacter freundii</i>	CP007557.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	COP003683.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP011612.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	CP004887.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP011657.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP003200.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP016952.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP020847.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP012554.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP017289.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP022311.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP008700.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CP001918.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP009274.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	CP016906.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	AE004092.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	CP009756.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CP003068.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CP003678.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CP003901.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CP017475.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CP007241.1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CP002824.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	FQ312044.2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	FO203355.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CP002121.1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CP011574.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	FQ312041.2
<i>Enterococcus faecalis</i>	CP002491.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AE007317.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	CP004081.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	AE009948.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	AB059405.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CP006910.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	AE016830.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CP007631.2
<i>Enterococcus faecalis</i>	CP003726.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CP007572.1
<i>Enterococcus faecium</i>	CP003351.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CP007571.1
<i>Enterococcus faecium</i>	CP003583.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	CP000046.1
<i>Enterococcus faecium</i>	CP006030.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	X71437.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CP011597.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	CP010944.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CP011636.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	CP010952.1
-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	CP007674.1

Anexo 6 - Sequências do gene GyrA coletadas do Genbank utilizadas no alinhamento

Espécie	Accession Number
<i>Escherichia coli</i>	U00096.3
<i>Citrobacter freundii</i>	CP011657.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP011612.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP016952.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP022151.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP022273.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP000964.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP001891.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP008700.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP012300.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AP014950.1

Anexo 7 - Sequências do gene NUC coletadas do Genbank utilizadas no alinhamento

Espécie	Accession Number
<i>Staphylococcus aureus</i>	BA000017.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	CP010941.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	GU186372.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	CP012119.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	AP014652.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	CP010298.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	CP007499.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	CP007670.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	CP006044.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	DQ399678.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	DQ507382.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JN626286.1
<i>Citrobacter freundii</i>	AF550415.2
<i>Burkholderia mallei</i>	CP000010.1
<i>Burkholderia cepacia</i>	CP011301.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	JX101693.1
<i>Escherichia coli</i>	EU935740.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	AB715422.2
<i>Escherichia coli</i>	HG428756.1
<i>Salmonella enterica</i>	AB366441.1

Anexo 8 - Sequências do gene TUF coletadas do Genbank utilizadas no alinhamento

Espécie	Accession Number	Espécie	Accession Number
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CP009257.1	<i>Enterococcus faecium</i>	CP006620.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CP003967.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	AE016830.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CP009534.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	CP002621.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CP010781.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	CP003726.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	LN865143.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	CP004081.1
<i>Burkholderia xenovorans</i>	CP000270.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	AE016830.1
<i>Burkholderia cepacia</i>	KN150857.1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CP011574.1
<i>Burkholderia cepacia</i>	KI635560.1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KK736189.1
<i>Burkholderia cepacia</i>	CP007787.1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	FO203355.1
<i>Burkholderia cepacia</i>	CP012981.1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KB911089.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	CP000958.1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KI973110.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	CP013398.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	CP011650.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	HG938370.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	KQ089956.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	AM747720.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	CP021749.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	CP019674.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	CP011584.1
<i>Burkholderia multivorans</i>	CP008730.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	CP011581.1
<i>Burkholderia multivorans</i>	CP000868.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP009208.1
<i>Burkholderia multivorans</i>	CP008730.1	<i>Klebsiella pneumonia</i>	CP011985.1
<i>Burkholderia multivorans</i>	CP009832.1	<i>Klebsiella pneumonia</i>	CP006738.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP007557.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	CP003683.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP012554.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	CP004887.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP016762.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP013722.1
<i>Citrobacter freundii</i>	CP007557.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP013724.1
<i>Escherichia coli</i>	BA000007.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP009258.1
<i>Escherichia coli</i>	CP022689.1	<i>Morganella morganii</i>	CP014026.1
<i>Escherichia coli</i>	CP003109.1	<i>Morganella morganii</i>	CP004345.1
<i>Enterococcus ssp.</i>	FP929058.1	<i>Morganella morganii</i>	LT630458.1
<i>Enterococcus faecium</i>	CP006620.1	<i>Proteus mirabilis strain</i>	AM942759.1
<i>Enterococcus faecium</i>	CP006030.1	<i>Proteus mirabilis</i>	KN150749.1
<i>Enterococcus faecium</i>	CP003583.1	<i>Proteus mirabilis</i>	AM942759.1
<i>Enterococcus faecium</i>	CP004063.1	<i>Proteus mirabilis</i>	CP021550.1
-	-	<i>Staphylococcus warneri</i>	CP003668.1

Anexo 9 - Sondas presentes no microarranjo do protótipo Sepsis3.0

Alvo	Sonda	Sequência (5'-3')	Fonte	Alvo	Sonda	Sequência (5'-3')	Fonte
GyrA	Cfreuga	TGGGCAACGACTGGAATAAAGCC	US6706475	16S1	Mmor2	TTTCAGTCGGGAGGAAGGTG	Ferrario et al, 2012
GyrB	Cfreugb1	AAGCGCTCGCGGTCACCTGTAAAGAT	Este Estudo	16S1	Mmor3	GTCGGGAGGAAGGTGTCAAGGTAA	Este Estudo
GyrB	Cfreugb2	TTACCGATGATGGCCGTGGTATCCCA	Este Estudo	16S1	Mmor4	TGCAAGGTTAATAACCTGGCAATT	Este Estudo
GyrB	Cfreugb3	ATGATAACTCCTATAAAGTTTCCGGT	Este Estudo	16S1	Mmor5	ACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGA	Este Estudo
Tuf	Cfreutf	TAGAAATGGAAAGTTCGTGAACCTCT	Este Estudo	16S1	Saure1	TGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACC	US 8080381 B2
16S1	EaeCfreu1	AAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGG	Este Estudo	16S1	Saure2	TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAG	US 8080381 B2
16S1	EaeCfreu2	CGATTGACGTTACTCGCAGAAGAA	Este Estudo	GyrB	Sauregb1	CGACTCAGAGAGAGGTTTGAC	WO2004046379 A9
GyrB	EaeKoxygb1	TTACTGTAAAGACATCGTTGTTAC	EP2716770A3	GyrB	Sauregb2	AGTGTGGGAAATGTGCGATAATA	Pasanen et al. 2010
GyrB	EaeKoxygb2	ACTGTAAAGACATCGTTGTTACG	EP2716770A3	GyrB	Sauregb3	AATAGTATCGTGAAGCATTAGCTG	3US 8080381 B2
GyrB	EaeKoxygb3	CGACGAAGCGCTCGCAGGTTACTGT	Este Estudo	GyrB	Sauregb4	TGAAGTTGTTATTGAAAAAGATAAC	WO2004046379 A9
GyrB	EaeKoxygb4	AAAGACATCGTTGTTACTATCCACAGCG	Este Estudo	GyrB	Sauregb5	GGATTAAGTAAACGGATAACGGA	WO2004046379 A9
GyrB	Eaegb1	TCTGCACCACATGGTATTCGAGGTT	Este Estudo	GyrB	Sauregb6	AACGGACGTGGTATCCAGT	EP2716770A3
GyrB	Eaegb2	CGGGCATCCCAACCGCATTAC	Este Estudo	GyrB	Sauregb7	GGACGTGGTATCCCAAGTTGATAT	EP2716770A3
GyrB	Eaegb3	GGAAGTTATCATGACCGTCTGCACGCC	Este Estudo	GyrB	Sauregb8	GACGTCCAGCTGTGCAAGTTATT	Pasanen et al. 2010
GyrB	Eaegb4	GATGATAACTCCTATAAAGTGTCCGC	Este Estudo	GyrB	Sauregb9	TCCAGCTGTGCAAGTTATTTTAA	3US 8080381 B2
Tuf	Eaetf1	CGGTGCTGCTCAGATGGATGGCGCG	Este Estudo	GyrB	Sauregb10	CTGTGCAAGTTATTTTAACTGTTT	3US 8080381 B2
Tuf	Eaetf2	GCTGGAACGTGTTGAGATGGAAG	Este Estudo	GyrB	Sauregb11	TATTTTAACTGTTTTACATGCTGGTG	3US 8080381 B2
GyrB	Ecloagb1	AGAGGGCGTATCTGCTGCG	EP2716770A3	Nuc	Saurenc1	AAATGGTAAACGAARCTT	Pasanen et al. 2010
GyrB	Ecloagb2	GGTACGATCCATGCGGACAA	EP2716770A3	Nuc	Saurenc2	TGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATG	US 5582974
GyrB	Ecloagb3	CTGTAAAGACATTAATCGTCACCATCC	Este Estudo	Nuc	Saurenc3	GGGTAGAGAAATATGGYCCTGAAGCAAGTGA	Brakstad et al, 1992
GyrB	Ecloagb4	GTTCCGTACAGGATGACGGCCGTG	Este Estudo	Nuc	Saurenc4	CGTCAAGGCTTGCTAAAGTTGCTTATGTT	US20130338036
GyrB	Ecloagb5	CGGCCGTGGTATCCCGACCCGGTATC	Este Estudo	Nuc	Saurenc5	AGGTGTAGAGAAATATGGYCCTGAAGC	CN103421898
GyrB	Ecloagb6	CCGGAAGAGGGCGTGTCTGCTGCAG	Este Estudo	Nuc	Saurenc6	AAGTGWAGCACAAAGCVA	CN103421898
Tuf	Ecloatf1	TGTGCTCGACTGACGGCCCT	Este Estudo	Nuc	Saurenc7	GCGATTGATGGTGATACGGTT	Sun et al. 2015
Tuf	Ecloatf2	TCAGGTAGGGCTTCCCTACATCATC	Este Estudo	Nuc	Saurenc8	AAAGGTGTAGAGAAATATGG	Este Estudo
GyrB	Enterbfgb1	GGATGACGGCACCGGTCT	EP2716770A3	Nuc	Saurenc9	GTTGATACACCTGAACAAAGCATCCTA	Este Estudo
GyrB	Enterbfgb2	CTATCGACGAAAGCGCTCGC	EP2716770A3	Tuf	Sauretf1	ACCACATACTGAATTCAAAG	EP2660335A2
GyrB	Efaeciugb1	ACTAGTTCTGAGGGTCTGCATCA	EP2716770A3	Tuf	Sauretf2	CGTATTATCAAAGACGGA	Martineau et al. 2001
GyrB	Efaeciugb2	TCGATCGATGAAGTATTAGCA	EP2716770A3	Tuf	Sauretf3	CAGAAGTATACGTATTATCA	Este Estudo
GyrB	Efaeciugb3	TATCACCGTATTGACGACGGTC	EP2716770A3	Tuf	Sauretf4	CACATCCATCTCTCTCAAAC	US20050059030
GyrB	Efaeciugb4	GGATACCTGTAGATATCCAGGCA	EP2716770A3	Tuf	Sauretf5	CCATCTCTCTCAAACATCTCGT	US20050059030
GyrB	Efaeciugb5	TATCCAGGCAAAACTGACGCTC	EP2716770A3	GyrB	Spyogb1	GCAGGTTTTGCCTCTCATATAAAGTCTT	EP2716770A3
GyrA	Kpneuga	GTGCGTATGGCGCAGCCGTTCTCGCTG	US6706475	GyrB	Spyogb2	GTTTTGCCTCTCATATAAAGTC	WO2004046379 A9
GyrB	Kpneugb1	CGCTCGCGGTTACTGCAAAAGATA	Este Estudo	GyrB	Spyogb3	TCTTTATTGAAGCAGATAATTCC	WO2004046379 A9
GyrB	Kpneugb2	TACTGCAAAGATAATCGTTGCA	EP2716770A3	GyrB	Spyogb4	GTCCCGCGTTGAAACAGTT	EP2716770A3
GyrB	Kpneugb3	CTGCAAAGATATCGTTGTAC	EP2716770A3	GyrB	Spyogb5	CGTTGAAACAGTTTTTACAGTCT	WO2004046379 A9
GyrB	Kpneugb4	GGCGTCTCCGACGGGAAGTTATC	Este Estudo	GyrB	Spyogb6	TTTTTACAGTCTTACACGAGGT	EP2716770A3
16S1	Kpneu	CGGAGCTAACCGCTTAAATCGAC	Este Estudo	GyrB	Spyogb7	TTACAGTCTTACACGAGGTGG	EP2716770A3
Tuf	Kneutf1	TGAGATGGAAGTTCGTGAACCTG	Este Estudo	16S1	Spyo1	AGAAGAATGATGGTGGGAGTGGAAA	Este Estudo
Tuf	Kneutf2	CCCCATCGTTCGTGGTTCTGCTC	Este Estudo	16S1	Spyo2	AAAATCCACCAAGTGACGGTAACTA	Este Estudo
16S1	Lmon1	CGTGATGAAGAAGTTTTTCGGA	Este Estudo	16S1	Spyo3	GTCTTGACATCCCGATGCCGCTCT	Este Estudo
16S1	Lmon2	GATAAGAGTAAGTCTGTGCCCTT	Este Estudo	16S1	Spyotf1	CGTGTTCATGAACAAAGTTGACCTT	Este Estudo
16S1	Lmon3	CCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGC	Este Estudo	16S1	Spyotf2	TTGACCTTGTGTGATGACGAAGAG	Este Estudo
16S1	Lmon4	CAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAG	Este Estudo	16S1	Spyotf3	AAGAGTTGCTGAAATTAGTTGAG	Este Estudo
GyrB	Lmongb1	GCAATTGATGAAGCACTTGCT	Este Estudo	16S1	Spyotf4	AGTTGAGATGGAAATTCGTGACCTTC	Este Estudo
GyrB	Lmongb2	GAAATTGAAATTACAATTGAAGCTG	Este Estudo	16S1	Spyotf5	CGTGACCTCTTTTCAAGAATACGATT	Este Estudo
GyrB	Lmongb3	TAAACAGCATTACTGTTCGCGATAACGGA	Este Estudo	16S1	Streptsp	GTGTTGAAAATGTTCCGTAACA	EP2660335A2
GyrB	Lmongb4	GGTCGTCCACAGTAGAAGT	Este Estudo	AT	AT1_1	ATTTCATTTCTTTTGTGTAATTGCAT	Este Estudo
Tuf	Lmontf	AGCTATCTTAGATGATCTGCTGCTGAT	Este Estudo	AT	AT1_5	GATATTGATTTGGTGTTCGAGGAT	Este Estudo
Tuf	Mmortf1	ACAGATGGACGGCGCTATCCTGGTT	Este Estudo	AT	AT683	AGTGAGGGAGGAGATGGAACCATCT	Este Estudo
Tuf	Mmortf2	ACAGACCCGTGAGCACATCCTGTTAG	Este Estudo	AT	AT730	CACAACACAAGTACCTGACATGGCG	Este Estudo
16S1	Mmor1	GTACTTTCACTCGGGAGGAAGGTG	Este Estudo	AT	AT776	TGGTCTTCTTAAAGATTAGTAGGT	Este Estudo
-	-	-	-	AT	AT809	GGCAAAGGAGCTGCTAAGGGATTTC	Este Estudo

Anexo 10 - Sondas presentes no microarranjo do protótipo SepseDX

Sondas SepseDX			
Alvo	Sonda	Sequência (5'-3')	Fonte
16S1	Abaum1	TACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGG	Os Autores
16S2	BurkSp	AGTTGTTGGGGATTCATTTCTTAGTAAC	Os Autores
ITS2	Calb2	GATCGCTTTGACAATGGCTTAGGTC	Os Autores
ITS2	Calb3	GTCCACCACGTATATCTTCAAAC	Os Autores
ITS2	Candsp2	TTTGACCTCAAATCAGGTAGG	Os Autores
GyrB	Cfreugb	CGGCCGTGGTATCCCGACCGGTATC	Os Autores
ITS2	Cglab1	AGTTAACTTGAAATTGTAGGCCATATC	Os Autores
ITS2	Cglab4	GTGCTGGGCAGACAGACGTC	Os Autores
ITS2	Ckrus1	CGGACGACGTGTAAGAGCG	Os Autores
ITS2	Ckrus2	CTGGCCGAGCGAACTAGAC	Os Autores
ITS1	Cparap	TTTTCTATATGGGGCCTGCCAGAG	Os Autores
ITS2	Cpar3	CCAAAACCTCTTCCAAATTCG	Os Autores
ITS2	Ctrop1	GAAACTTATTTAAGCGACTTAGG	Os Autores
ITS2	Ctrop2	CCACCACAATTTATTCATAAC	Os Autores
16S1	Eaerogen	TTTGCCTAAGGTTAATAACCTTGG	Os Autores
GyrB	Ecloagb1	AGAGGGCGTATCTGCTGCG	EP2716770A3
16S1	Ecoli	GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG	Os Autores
16S1	Efaecalis1	TTTTCTGAACGTCCCCTGACGGTAT	Os Autores
GyrB	Efaeciugb1	ACTAGTTCTGAGGGTCTGCATCA	EP2716770A3
16S1	Efec2	GACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTG	Os Autores
GyrB	CfKpKoEc	ATGATAACTCCTATAAAGTTTCCGGT	Os Autores
16S1	GNLGM	CCTGATSCAGCMATGCCGCG	Os Autores
16S1	GPLGM	CTGACSGAGCAACGCCGCG	Os Autores
GyrB	KlebsSp1	GAGGTTGTGGATAACGCTATCGACGAAG	Os Autores
GyrB	KlebsSp2	GGTCTGCACCACATGGTATTCGAGG	Os Autores
GyrB	KlebsSp3	ATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGC	Os Autores
16S2	Koxytoca	TTTTTTGTTGTTCCCTTGAGGAGTG	Os Autores
GyrB	Kpn1	GCTCGCGGGTACTGCAAAGATATCG	Os Autores
GyrB	Kpn2	CGTCTCCGACGCGGAAGTTATCATGAC	Os Autores
GyrB	Kpn3	GGGTTACTGCAAAGATATCGTTGTAC	Os Autores
GyrB	Kpn4	TCGCGGCATCCCAACCGGC	Os Autores
GyrB	Kpn5	AGCGGAAGTTATCATGACCGTC	Os Autores
GyrB	Kpn6	TCGCGGCATCCCAACCGGCAT	Os Autores
GyrB	Kpn7	CTCCGACGCGGAAGTTAT	Os Autores
16S1	Lmon2	GATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTT	Os Autores
16S1	Mmor3	GTCGGGAGGAAGGTGCAAGGTAA	Os Autores
16S1	Paerugin	GGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTG	Os Autores
16S1	Pmirabilis	GTGATAAGGTTAATACCCTTGCAATTG	Os Autores
16S2	Proteus	CTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAG	Os Autores
16S2	Sagalact	TGGCTTTCTCTTCGGAGCAGAAGTG	Os Autores
Nuc1	Saurenc3	GGGTAGAGAAAATATGGYCCTGAAGCAAGTGA	Brakstad et al. 1992
Nuc1	Saurenc5	AGGTGTAGAGAAAATATGGYCCTGAAGC	CN 103421898 A
Nuc1	Saurenc9	GTTGATACACCTGAAACAAAGCATCCTA	Os Autores
16S2	Smalt4	GCAATTTGGCACGCGATATCGAAGC	Os Autores
16S1	Smarces	GGTGGTGAGCTTAATACGTTTCATCAATTG	Os Autores
16S1	Spneumon1	GTAAGAGAAGAACGAGTGTGAGAGTGG	Os Autores
16S1	Spyoagalac	AAAATCCACCAAGTGACGGTAACTA	Os Autores
16S2	Spyopneum	TGTTTTCTTCGGGACAGAGGTGAC	Os Autores
16S1	StaphySp	ACATATGTGTAAGTAACTGTGCA	Os Autores
AT	AT1_1	ATTTCATTTCCTTTTGTGTAATTTGCAT	Os Autores
AT	AT1_5	GATATTGATTTGGTGTTCGAGGAT	Os Autores
AT	AT683	AGTGAGGGAGGAGATGGAACCATCT	Os Autores
AT	AT730	CACAACACAAGTACCTGACATGGCG	Os Autores
AT	AT776	TGGTCTTCTTAAAAGATTAGTAGGT	Os Autores
AT	AT809	GGCAAAGGAGCTGCTAAGGGATTTTC	Os Autores
BG	BG1	GCAGAGCCA TCTATTGCTTAC	Os Autores
BG	BG2	CTAGGGTTGGCCAATCTACTC	Os Autores

Anexo 11 – Resultados do estudo clínico

Resultado Estudo Clínico		
Número amostra	Resultado Vitek	Resultado SepseDx
001	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>
002	Negativo	Negativo
003	<i>Staphylococcus CoNS</i>	Negativo
004	Negativo	Negativo
005	Negativo	Negativo
006	Negativo	Negativo
007	Negativo	Negativo
008	Negativo	Negativo
009	Negativo	Negativo
010	Negativo	Negativo
011	Negativo	Negativo
012	Negativo	Negativo
013	<i>C. albicans</i>	Negativo
014	<i>S. aureus</i>	Negativo
015	<i>S. aureus</i>	Negativo
016	Negativo	Negativo
017	Negativo	Negativo
018	Negativo	Negativo
019	Negativo	Negativo
020	Negativo	Negativo
021	Negativo	<i>S. pyogenes/S. pneumoniae</i>
022	Negativo	Negativo
023	Negativo	Negativo
024	<i>K. pneumoniae</i>	Negativo
025	Negativo	Negativo
026	Negativo	Negativo
027	Negativo	Negativo
028	Negativo	Negativo
029	<i>Staphylococcus CoNS</i>	Negativo
030	Negativo	Negativo
031	Negativo	Negativo
032	Negativo	Negativo
033	Negativo	Negativo
034	Negativo	Negativo
035	Negativo	Negativo
036	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>
037	Negativo	Negativo
038	Negativo	Negativo
039	Negativo	Negativo
040	Negativo	Negativo

041	Negativo	Negativo
042	Negativo	Negativo
043	Negativo	Negativo
044	Negativo	Negativo
045	<i>P. acnes</i>	Negativo
046	<i>E. faecium</i>	Negativo
047	Negativo	Negativo
048	Negativo	<i>S. pyogenes /S. pneumoniae</i>
049	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Negativo
050	Negativo	Negativo
051	Negativo	Negativo
052	Negativo	Negativo
053	<i>E. coli</i>	Negativo
054	Negativo	<i>E. coli</i>
055	Negativo	Negativo
056	Negativo	Negativo
057	Negativo	Negativo
058	Negativo	Negativo
059	Negativo	Negativo
060	<i>P. mirabilis</i>	Negativo
061	Negativo	Negativo
062	Negativo	Negativo
063	Negativo	Negativo
064	Negativo	Negativo
065	<i>B. cereus</i>	Negativo
066	<i>K. pneumoniae</i>	Negativo
067	Negativo	Negativo
068	Negativo	Negativo
069	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Negativo
070	Negativo	<i>S. pyogenes/S. pneumoniae</i>
071	Negativo	Negativo
072	Negativo	Negativo
073	Negativo	Negativo
074	Negativo	<i>S. pyogenes /S. pneumoniae</i>
075	<i>C. albicans</i>	Negativo
076	Negativo	Negativo
077	Negativo	Negativo
078	Negativo	<i>S. pneumoniae</i>
079	Negativo	Negativo
080	Negativo	Negativo

081	Negativo	Negativo
082	Negativo	Negativo
083	Negativo	Negativo
084	Negativo	P. aeruginosa
085	Negativo	Negativo
086	Negativo	P. aeruginosa
087	Negativo	E. coli
088	Negativo	Negativo
089	Negativo	Negativo
090	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Negativo
091	Negativo	Negativo
092	Negativo	Negativo
093	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Negativo
094	Negativo	Negativo
095	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
096	Negativo	P. aeruginosa/S. pneumoniae
097	Negativo	Negativo
098	Negativo	Negativo
099	<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>E. coli</i>
100	Negativo	<i>A. baumannii</i>
101	Negativo	<i>A. baumannii</i>
102	Negativo	Negativo
103	<i>A. baumannii</i>	<i>S. pyogenes/S. pneumoniae</i>
104	Negativo	Negativo
105	<i>E. faecium</i>	Negativo
106	<i>E. faecium</i>	Negativo
107	Negativo	Negativo
108	Negativo	Negativo
109	<i>E. coli</i>	Negativo
110	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
111	Negativo	Negativo
112	Negativo	Negativo
113	Negativo	<i>Burkholderia sp./ Staphylococcus sp.</i>
114	Negativo	Negativo
115	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
116	Negativo	Negativo
117	Negativo	Negativo
118	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
119	Negativo	Negativo
120	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Negativo

121	<i>E. faecalis/E. cloacae</i>	Negativo
122	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Burkholderia sp.
123	<i>S. aureus</i>	Negativo
124	Negativo	Negativo
125	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
126	Negativo	Negativo
127	Negativo	Negativo
128	Negativo	Negativo
129	Negativo	Negativo
130	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Negativo
131	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Negativo
132	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
133	Negativo	Negativo
134	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.
135	<i>Staphylococcus</i> CoNS	<i>E. coli</i>
136	<i>P. aeruginosas</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.
137	Negativo	Negativo
138	Negativo	<i>Burkholderia</i> spp.
139	<i>P. aeruginosas/E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosas/E. faecalis</i>
140	Negativo	Negativo
141	Negativo	Negativo
142	Negativo	Negativo
143	Negativo	Negativo
144	Negativo	Negativo
145	Negativo	Negativo
146	Negativo	Negativo
147	Negativo	Negativo
148	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
149	Negativo	<i>P. aeruginosa/ S. maltophilia</i>
150	Negativo	Negativo
151	<i>E. faecalis</i>	Negativo
152	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>
153	Negativo	Negativo
154	Negativo	Negativo
155	Negativo	<i>S. pneumoniae</i>
156	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>
157	<i>Staphylococcus</i> CoNS	GramP
158	Negativo	Negativo
159	Negativo	Negativo
160	Negativo	Negativo

161	Negativo	S. pyogenes/S. pneumoniae
162	Negativo	Negativo
163	Negativo	Negativo
164	Negativo	Negativo
165	Negativo	Negativo
166	Negativo	Negativo
167	Negativo	Negativo
168	Negativo	Negativo
169	Negativo	Negativo
170	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
171	Negativo	Negativo
172	Negativo	Negativo
173	Negativo	Negativo
174	Negativo	Negativo
175	Negativo	Negativo
176	Negativo	Negativo
177	Negativo	Negativo
178	Negativo	Negativo
179	Negativo	Negativo
180	Negativo	Negativo
181	Negativo	Negativo
182	Negativo	S. pyogenes/S. pneumoniae
183	<i>E. faecium</i>	Negativo
184	Negativo	Negativo
185	Negativo	<i>Burkholderia</i> spp.
186	Negativo	Negativo
187	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Negativo
188	<i>Staphylococcus</i> CoNS	Negativo
189	Negativo	Negativo
190	Negativo	S. pyogenes/S. agalactiae
191	<i>Clostridium</i>	Negativo
192	<i>E. faecalis</i>	Negativo
193	<i>E. faecalis</i>	Negativo
194	<i>E. faecalis</i>	Negativo
195	Negativo	Negativo
196	Negativo	Negativo
197	<i>A. baumannii</i>	Negativo
198	Negativo	Negativo
199	Negativo	Negativo
200	Negativo	Negativo