

REYNALDO BUENO JUNQUEIRA REIS

Prevalência de DNA genômico para *staphylococcus epidermidis* plasmídeo
coagulase negativa em neonatos pré-termo maiores de três dias de vida e com
quadro de piora de infecção

CAMPO GRANDE-MS

2013

REYNALDO BUENO JUNQUEIRA REIS

Prevalência de DNA genômico para *staphylococcus epidermidis* plasmógeno coagulase negativa em neonatos pré-termo maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas e da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Almir de Sousa Martins

CAMPO GRANDE-MS

2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

REYNALDO BUENO JUNQUEIRA REIS

Prevalência de DNA genômico para *staphylococcus epidermidis* plasmógeno coagulase negativa em neonatos pré-termo maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Resultado _____

Campo Grande (MS), 24 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Almir de Sousa Martins
Universidade Federal de Minas Gerais-MG

Prof. Dr Durval Batista Palhares
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

BANCA EXAMINADORA (conclusão)

Prof^a. Dr^a Anna Maria Miglioli
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

Prof^a. Dr^a Paula Cristhina Niz Xavier (Suplente)
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

“Esse trabalho é dedicado primeiramente a DEUS que a TODOS ilumina; aos meus pais, Francisco e Maria Antonietta “*in memoriam*” que me deram a vida, me permitindo realizá-lo; à minha esposa Eliana “*in memoriam*”, que juntamente à nossas filhas Laura e Lívia, no seu tempo, sempre me motivaram a concluí-lo”.

AGRADECIMENTOS

- Especial agradecimento ao **Prof. Dr. Almir de Sousa Martins e Prof. Dr. Durval Batista Palhares** pela orientação, apoio e consultoria.
- A chefe da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal **Dra. Silvia Hiromi Nakashita** pela compreensão quando da permissão para o acesso ao espaço físico da UTI neonatal para coleta de amostras dos pacientes alvo.
- A **prof. Dra. Anna Maria Miglioli** pela ajuda quanto às muitas informações que puderam ser aproveitadas para o enriquecimento do teor deste trabalho.
- Aos **técnicos de Laboratório do LAC-UFMS** (Floriano Campoçano, Agamenon Nascimento, pelo suporte na coleta de amostras).
- Aos colegas de equipe do **Laboratório de Diagnóstico Molecular em Pediatria – UFMS – Campo Grande-MS**: Camila Bologne Couto, Daniel Borges Manta, Joantina Neves e Vanessa Duarte pela paciência, dedicação e ajuda.
- A todos os funcionários do **Núcleo de Fisiologia Geral e Genômica Funcional do Instituto de Ciências Biológicas (Departamento de Biologia e Biofísica) - UFMG – Belo Horizonte-MG** pela parceria e colaboração para que a pesquisa fosse realizada, cedendo espaço físico e equipamentos.
- A todos os funcionários do **Laboratório de Análises Clínicas (LAC) – UFMS – Campo Grande-MS** pelo auxílio quando da realização das hemoculturas.
- A todos os funcionários da **Seção de Arquivo Médico (SEAM) - UFMS** pelo suporte quando na hora da pesquisa de prontuários.

RESUMO

Reis RBJ. Prevalência de DNA genômico para *staphylococcus epidermidis* plasmô coagulase negativa em neonatos pré-termo maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção. Campo Grande; 2013. [Dissertação - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Introdução: A infecção neonatal (IN) é uma importante causa de morbidade e mortalidade em RNs no período neonatal. Um dos agentes infecciosos importantes na infecção hospitalar, mas sem dados conclusivos é o *Staphylococcus epidermidis*, cuja incidência é pouco conhecida na IN. **Objetivo:** O presente estudo objetivou identificar esta bactéria em sangue de RNs através da reação em cadeia da polimerase convencional (PCR) e em tempo real (qPCR) e verificar sua incidência. **Material e Método:** Foi coletado um total de 45 amostras de sangue periférico para hemocultura convencional (Bact/ALERT), e extração do DNA genômico de leucócitos. Aproximadamente 50 ng (54 ± 40 ng) de DNA foram utilizados no diagnóstico molecular por PCR e qPCR. Oligonucleotídeos iniciadores para PCR e qPCR foram desenhados para obtenção de amplicons específicos de 119 pb e 96 pb, respectivamente, para diagnóstico de *S.epidermidis*. A qPCR foi realizada no equipamento ABI Prism 7000 SDS e as condições da reação segundo o protocolo do SybrGreen Core Reagent Mix. **Resultado:** A hemocultura foi capaz de detectar *S. epidermidis* em 13,3% das amostras investigadas, enquanto PCR convencional detectou 17,8% e qPCR 100% de amplicons alvos de *S. epidermidis* em DNA das amostras positivadas pelo método da PCR Convencional. **Conclusão:** Os resultados da qPCR mostraram maior sensibilidade para a detecção de *S. epidermidis* no sangue e deverá ser uma ferramenta fundamental para futuras triagens em estudos epidemiológicos mais amplos na suspeita de sepse neonatal. Os fatores de risco juntamente com observações clínicas e hemocultura, aliados à PCR, serão mais eficientes para precisão diagnóstica e direção do tratamento específico.

Palavras chave: *Staphylococcus epidermidis*; diagnóstico; sepse neonatal, qPCR.

ABSTRACT

Reis RBJ. Prevalência de DNA genômico para *staphylococcus epidermidis* plasmô coagulase negativa em neonatos pré-termo maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção. [Dissertação - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Introduction: The neonatal infection (IN) is an important cause of morbidity and mortality in newborns in the neonatal period. One of the major infectious agents but no conclusive data is *Staphylococcus epidermidis*, the incidence of which is little known in IN. **Object:** This study aimed to identify the bacteria in the blood of newborns by polymerase chain reaction conventional (PCR) and real-time (qPCR), and check its incidence. **Material and Methods:** Was collected 45 peripheral blood samples for conventional blood culture (BacT / ALERT 3D60), and genomic DNA extraction from leukocytes. Approximately 50 ng (54 ± 40 ng) of DNA was used for PCR in molecular diagnostics and qPCR. Oligonucleotide *primers* for PCR were designed and qPCR to obtain specific amplicons of 119 bp and 96 bp respectively for diagnosis of *S. epidermidis*. The qPCR was performed in the ABI Prism 7000 SDS equipment and reaction conditions according to the protocol of SybrGreen Core Reagent Mix. **Result:** Blood culture was able to detect *S. epidermidis* in 13,3% of the samples investigated, while conventional PCR detected 17,8% and qPCR 100% of target *S. epidermidis* DNA by the conventional PCR method. **Conclusion:** qPCR results showed increased sensitivity for the detection of *S. epidermidis* in the blood and will be a fundamental tool for future screening in broader epidemiological studies of suspected neonatal sepsis. Risk factors together with clinical observations and blood culture, coupled with PCR, will be more efficient for diagnostic accuracy and specific treatment direction.

Keywords: neonatal sepsis; diagnosis; *Staphylococcus epidermidis*; qPCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado das hemoculturas processadas em BacT/ALERT-UFMS	37
Tabela 2 - Quantificação das amostras de DNA genômico	38
Tabela 3 – Relação entre os resultados de hemocultura e biologia molecular	46
Tabela 4 - Tabela de contingência (Teste exato de Fisher)	47
Tabela 5 - Características gerais dos pacientes estudados	48
Tabela 6 - Índice do uso de antibióticos, tempo de internação e evolução	50
Tabela 7 - Procedimentos invasivos utilizados em pacientes analisados	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sequência de nucleotídeos e *primers* específicos da região alvo da PCR para o *amplicon* de 119 pb dentro do gene *SdrH* do *S. epidermidis* (*serine-aspartate repeat protein family*). Os iniciadores selecionados para PCR convencional estão sublinhados no fragmento da sequência alvo.....33
- Figura 2. Sequência de nucleotídeos e *primers* específicos da região alvo do PCR para o *amplicon* de 96 pb do gene *RNAIII* que codifica a delta hemolisina.....35
- Figura 3. (A, B, C e D) Resultados da PCR convencional com os *primers* SEPIKFOR e SEPIKREV para amplicons dentro da região do gene *SdrH* do *S. epidermidis* em amostras de DNA de sangue. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 3 µl da PCR para eletroforese em gel de poliacrilamida a 110 volts/1 hora, corado com nitrato de prata. Os produtos de PCR de 119 pb são confirmados para cada amostra positiva. (M), marcador DNA 50 pb DNA *ladder*.....40; 41
- Figura 4A. Curva padrão da β -actina humana usada como calibrador interno da qPCR. A figura mostra o perfil típico das curvas obtidas da esquerda para a direita durante a amplificação das diluições 1ng, 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} ng. Os valores em y são resultados da detecção de fragmentos marcados cumulativamente pelo SybrGreen em função do número de ciclos (Ct) no eixo x.....42
- Figura 4B. Curva de calibração da β -actina apresentando os quatro pontos de diluição. A curva apresenta alta linearidade demonstrada pelo coeficiente de regressão linear elevado ($r^2 = 0.9947$). O valor de *slope* da curva mostra uma eficiência de 100% da reação pela equação $E = 10^{\{-1/slope\}}$. Essa eficiência permite a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na qPCR.....43
- Figura 5. Curva de calibração (1) e curva-padrão (2) usadas como calibrador interno da qPCR para o diagnóstico de *S. epidermidis* nas amostras de sangue. A figura mostra o perfil típico das curvas obtidas da esquerda para a direita durante a amplificação das diluições seriais do DNA genômico de amostra *S. epidermidis* ATCC 12228

(10^{-3} , 10^{-7} e 10^{-11} ng), para controle positivo e quantificação absoluta dos resultados positivos. O gel mostra os *amplicons* para *S. epidermidis* das respectivas amostras positivas. Os valores em y são resultados da detecção de fragmentos marcados cumulativamente pelo SybrGreen em função do número de ciclos (Ct) no eixo x. A curva apresenta linearidade demonstrada pelo coeficiente de regressão linear elevado ($r^2 = 0.97$). O valor de *slope* da curva mostra uma eficiência de 100% da reação pela equação $E = 10^{\{-1/\text{slope}\}}$ (Pfaff, 2003). Essa eficiência permite a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na qPCR. (M), marcador 100 pb.....44

Figura 6. Curvas de dissociação dos *amplicons* das amostras positivas, para confirmação da especificidade da região alvo do DNA de *S. epidermidis* por qPCR (programa *ABI Prism 7000 SDS*). ($T_m = \text{melting temperature}$), temperatura de dissociação específica para o amplicon alvo de 98 pb.....45

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β – actina	Significa que essa proteína é produzida pelo próprio organismo
AMP	Ampicilina (antibiótico)
ADP	Adenosina difosfato
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems Instrument Prism 7000 Sequence Detection System) – Aparelho para PCR em tempo real
ATB	Antibiótico
AK	Amicacina (antibiótico)
AMS	Amostra
APGAR	(Aparência, Pulso, Gesticulação, Atividade e Respiração) – Índice usado em neonatologia para análise ao nascimento
ATCC	American Type Culture Collection
amplicon(s)	é um pedaço de DNA ou RNA cuja fonte é de origem natural ou obtida através de amplificação pela técnica da PCR
Bact/ALERT	(Alerta de Bactéria) – Aparelho para realização de hemocultura do Setor de Microbiologia do LAC-UFMS (Campo Grande)
CD	Clindamicina (antibiótico)
CIP	Ciprofloxacina (antibiótico)
CL	Cefalexina (antibiótico)
CN	Gentamicina (antibiótico)
cpap	Continuous positive airway pressure. Significa: pressão positiva contínua nas vias aéreas.
CXM	Cefuroxime (antibiótico)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
E	Eritromicina (antibiótico)
ECN	Estafilococos Coagulase Negativos
EGB	Estreptococos do grupo B
Et al.	Colaboradores
FEP	Cefepime (antibiótico)
H ₂ O	Água

Continua - LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HU	Hospital Universitário
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IN	Infecção neonatal (Infecção do neonato)
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
<i>Ladder</i>	“escada”- são marcadores moleculares com quantidades conhecidas (nanogramas) em cada banda, utilizados para a quantificação e leitura do DNA
LZ	Metronidazol (derivado do nitroimidazol, possui atividade antiprotozoária; também possui atividade antibacteriana contra bacilos gram-negativos anaeróbios, bacilos gram-positivos esporulados e contra todos os cocos anaeróbios.
LZD	Linezolida (antibiótico)
M	Marcador
MG	Minas Gerais
MRP	Meropenem (antibiótico)
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information – Centro de Informação para Biologia Molecular mantido por recursos gerados pelo Governo Norte Americano
NPD	Representa a expressão: “Não foi possível determinar”
NUFIGEN	Núcleo de Fisiologia Geral e Genômica Funcional
NHU	Núcleo do Hospital Universitário
OD	Densidade Óptica
PAMPs	PAMPs <i>pathogen-associated molecular patterns</i> – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Polymerase Chain Reaction - “Reação em Cadeia da Polimerase”
Picc	Peripherally Inserted Central Venous Catheter (Cateter Venoso Central de Inserção Periférica)
MS	Mato Grosso do Sul
<i>Primers</i>	Sequência iniciadora que a partir de um oligonucleotídeo que

Continuação - LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

	será responsável pela duplicação da fita do DNA ou do RNA (transcrição) em um organismo ou direcionado a uma região alvo específica na PCR
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa ou em Tempo Real)
RBJ	Reynaldo Bueno Junqueira
RN	Recém-nascido
RNA III	Gene que codifica a delta-hemolisina
SCCmec	staphylococcal cassette chromossome
SEAM	Seção de Arquivo Médico
SEPIKFOR	<i>primer</i> desenhado para a produção de amplicons dentro da região do gene <i>SdrH</i> do <i>Staphylococcus epidermidis</i>
SEPIKREV	<i>primer</i> desenhado para a produção de amplicons dentro da região do gene <i>SdrH</i> do <i>Staphylococcus epidermidis</i>
SeRM	<i>Staphylococcus</i> resistentes a meticilina
<i>SdrH</i>	(serine-aspartate repeat protein family) – Família das proteínas repetidoras de serina-aspartato)
SN	Sepse neonatal
<i>spp</i>	Espécies
SybrGreen Core Reagent Mix	Reagente com propriedades fluorescentes, responsável pela coloração e visualização do material genômico quando a este se liga
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEC	Teicoplanina (antibiótico)
TLR	Toll-Like Receptor – Família de proteínas transmembrânicas
TZP	Tazocin – piperacilina + tazobactam (antibiótico)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UK	United Kingdom (Reino Unido – Inglaterra)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VA	Vancomicina (antibiótico)

LISTAS DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem (Serve para representar de uma maneira prática, o “quanto” de um “todo” se está referenciando, onde o valor máximo de uma porcentagem, pode ou não, ser obrigatoriamente de 100%)
β	Beta
δ	Delta
&	Conjunção aditiva, neste caso representa a união de palavras
μ l	Microlitro - unidade de medida cujo fator de multiplicação equivale a 10^{-6} (0,000 001)
Ct	(Total Cycles) - Número de ciclos
$E = 10^{\{-1/slope\}}$	Equação estatística onde E representa eficiência, 10, a base logarítmica e <i>slope</i> , um indicador que tenta encaixar uma linha reta entre vários pontos dados, visando diminuição da distância entre esses pontos
LL37	Catelecidina (peptídeos antimicrobianos)
mL	Mililitro
ng	Nanograma - unidade de medida cujo fator de multiplicação equivale a 10^{-9} (0,000 000 001)
pb	Pares de base
Pmol	Picomol - unidade de medida cujo fator de multiplicação equivale a 10^{-12} (0,000 000 000 001)
r^2	Coefficiente de regressão linear
Tm	Melting Temperature - temperatura de dissociação específica para o amplicon alvo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 DADOS BIBLIOGRÁFICOS	22
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	24
1.3 TRANSMISSÃO AO NEONATO	26
1.4 A DOENÇA NEONATAL	27
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAL E MÉTODO	31
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	
APÊNDICE	

1. INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”

Louis Pasteur (1822 – 1895)

A seps neonatal (SN) é uma importante causa de morbidade e mortalidade em RNs, principalmente prematuros de muito baixo peso representando ainda desafios na UTI neonatal. (JARVIS, 1987). A SN é definida como uma síndrome clínica caracterizada por vários sinais sistêmicos de infecção acompanhada de bacteremia (BIZARRO et al., 2005; MEREMIK et al., 2005). Embora de incidência relativamente baixa (0,3 a 15,4 casos/1.000 nascidos vivos), o risco de mortalidade de 10 a 50% é considerado alto (JORDAN e DURSO, 2000; RODRÍGUEZ-WEBER et al., 2003; MOVAHEDIAN et al., 2006;).

Associados à seps neonatal estão incluídos *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, entre eles, o *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* e *Streptococcus agalactiae* (EGB - Estreptococos do Grupo B), sendo os dois últimos de maior relevância relatada (IREGBU et al., 2006; RODRÍGUEZ-WEBER et al., 2003). O EGB continua sendo responsável pela maioria das complicações na infecção do neonato (IN) nos Estados Unidos.

Atualmente já é notório o fato de que as últimas décadas foram agraciadas com grande avanço em neonatologia; isto tanto permitiu um melhor atendimento aos RNs a termo como propiciou um aumento na sobrevivência dos RNs prematuros; todavia, proporcionalmente e como já esperado, isto também acarretou um incremento no tempo de internação destes últimos pacientes, sendo que durante este período, podem sujeitar-se às infecções hospitalares.

Durante quase toda a década de 1950, o *Staphylococcus aureus* foi concebido como o principal causador de infecções intra-hospitalares; porém, atualmente, dentre as 45 espécies e subespécies de estafilococos coagulase negativos conhecidas, os *Staphylococcus epidermidis* tem emergido no sentido de se tornarem os microrganismos infecciosos mais evidenciados em UTI Neonatal, podendo acometer preferencialmente os RNs pré-termo de reduzida imunocompetência como o pré-termo extremo (PATRICK, 1990).

Do ponto de vista epidemiológico, tem-se prescrito que, para se praticar medidas mais eficientes no controle das infecções nosocomiais contemporâneas, é de extrema importância uma avaliação prévia para se determinar se os surtos são de fato causados ou não por múltiplas cepas de microrganismos; isto também é aplicável a múltiplas cepas de *Staphylococcus spp* coagulase negativos; e neste caso, caso afirmativo, prescreve-se que uma melhor atenção deve ser dada à esterilidade dos cateteres intravasculares, à integridade da pele neonatal e ao uso racional de antibióticos no ambiente da UTI neonatal (NESIN *et al.*, 1995).

Alguns casos estudados na década de 90 revelaram que muitas contaminações de locais de inserção do cateter com *Staphylococcus spp* coagulase negativos são oriundas de locais reservatórios sobre o mesmo bebê (EASTICK *et al.*, 1996) e poderiam supostamente explicar as observações e orientações feitas anteriormente por Nesin (1995).

O *Staphylococcus epidermidis* responde por cerca de 30 a 50% dos casos conhecidos, sendo o principal agente etiológico das sepses tardias. Este agente é encontrado colonizando a pele de 90% dos RNs admitidos em UTI Neonatal, porém, não há dados conclusivos da porcentagem do ocorrido no momento da colonização, seja antes ou depois de sua admissão, no entanto, onde pode penetrar na corrente sanguínea gerando sepse através de procedimentos invasivos comuns nesta situação; ocasião em que algumas cepas podem formar biofilmes.

Esses biofilmes podem estar associados, por exemplo, à adesão do microrganismo, entre outras, à superfície de cateteres, conferindo-lhes um grande perfil de resistência a alguns antibióticos, inclusive à meticilina, gerando necessidade do uso de glicopeptídeos (vancomicina) para o tratamento (CORDERO *et al.*, 1999; GAYNES *et al.*, 1996; VILLARI *et al.*, 1998). Além da meticilina, este microrganismo pode tornar-se resistente a vários outros tipos de antibióticos, tais como a penicilina G, oxacilina, eritromicina, clindamicina, gentamicina e outros.

Os anos de 1990, sem dúvida, deixaram bem claro que o problema já se encontrava agravado e notoriamente vinculava a presença dos *Staphylococcus spp* coagulase negativa (ECN) a agentes causadores de muitas das infecções nosocomiais. A partir da criação deste suposto impasse, já se fazia necessária uma reavaliação mais pronunciada, que pusesse em evidência a presença do *Staphylococcus epidermidis* como real protagonista de todas as infecções, até então atribuídas a ele, ou se ele estivesse participando em todo o processo, somente como um fator contaminante.

No Brasil, com a realização de alguns trabalhos de avaliação, realizados em anos

anteriores ao ano 2000, fez com que a partir daí, com o aguçamento da curiosidade dos pesquisadores brasileiros principalmente com relação à presença real desses microrganismos no ambiente da UTI Neonatal e a possível contaminação das amostras no momento da coleta; Cunha *et al.* em 2002, realizaram um trabalho em especial para determinar a significância clínica de ECN isolados de processos infecciosos em RNs da unidade neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP, onde as linhagens foram identificadas e classificadas como significativas e contaminantes, de acordo com uma série de dados clínicos e laboratoriais obtidos do banco de dados da unidade neonatal. Os resultados mostraram que o *S. epidermidis* foi a cepa mais frequentemente isolada e mais associada à infecção do que contaminação. Outras espécies também foram isoladas (CUNHA *et al.*, 2002).

Entre os vários fatores de risco que podem propiciar ao RN prematuro à aquisição de uma infecção, pode-se citar o contingente da população de plaquetas. Plaquetas são células pequenas (de 2 – 4 µm), discoides, anucleadas e originárias a partir de células gigantes presentes na medula óssea, os megacariócitos. Uma vez que alcance a corrente sanguínea, terá uma vida média em torno de 5 – 10 dias. Dependendo do tipo da substância contida em seu interior, estará ligada aos fatores de adesão, coagulação ou reparo das células endoteliais (WHITE, 1972; HARKER; FINCH, 1969).

De certo modo, as plaquetas, além de suas funções mais conhecidas, também desempenham o papel de “vigias” quando na detecção de um microrganismo potencialmente nocivo que tenha conseguido ultrapassar as barreiras naturais de defesa e alcançado o aparelho circulatório (COGNASSE *et al.*, 2005).

As plaquetas são as primeiras e mais numerosas células a se acumularem em sítios de infecções vasculares (SCHELD *et al.*, 1978; VINTER *et al.*, 1984) e além disso, alguns pesquisadores também haviam sugerido que a agregação plaquetária e o enclausuramento de microrganismos em matrizes plaquetas-fibrina, podem proteger patógenos de antibióticos, a liberação por neutrófilos ou outros leucócitos (CLAWSON *et al.*, 1971). Em humanos, a trombocitopenia é cada vez mais reconhecida como um significativo correlato independente de morbidade e mortalidade devido à infecção (SANTOLAYA *et al.*, 2002).

Além de outros como a imaturidade da pele que ainda não apresenta uma barreira efetiva contra bactérias; exemplificando, cita-se a não produção de peptídeos antimicrobianos (LL37), capaz de inibir significativamente o crescimento dos *S. epidermidis*; em detrimento disso, a virulência dessas bactérias é tal que tem sido descritas por apresentarem pelos

adesivos (do latim Pili) em sua superfície, mediando sua ligação ao hospedeiro, podendo lhes trazer algum malefício (NELSON *et al.*, 2009). Estes trabalhos mostram que os ECN são mais que organismos oportunistas, possuem excelente aderência ao meio e capacidade de desenvolvimento de resistência, esperando somente a oportunidade propícia para se modificarem, invadirem e oferecerem risco aos seres humanos.

QU *et al.*, 2010, fez referência ao ECN como sendo uma das maiores causas de infecção na corrente sanguínea de RN de muito baixo peso, atendidos em UTI Neonatal, mostrando que a virulência do *S. epidermidis* deve-se principalmente pela sua capacidade de formar biofilmes, quando habitam instrumentos ou implantes médicos invasivos, além da característica de resistência a alguns antibióticos. As infecções biofilme-relacionadas, com frequência não respondem à quimioterapia antibiótica guiada por testes convencionais de sensibilidade ao antibiótico.

A incidência de bacteremia causada por *S. epidermidis* assim como por outros ECN continuam sendo ainda muito elevadas e sua prevenção e tratamento mostram-se ainda difíceis. Registros recentes avançaram a compreensão da patogênese da infecção, interação do ECN com as defesas do hospedeiro e fatores de risco para o desenvolvimento de doença. O surgimento de novas drogas pode resultar em um melhor entendimento da virulência desse microrganismo assim como a análise dos fatores de risco poderão auxiliar na identificação de RNs suscetíveis à sepse bacteriana. Todavia, a redução da morbidade sempre deverá começar por um aprimoramento no ambiente hospitalar, para reduzir a introdução de patógenos oportunistas potencialmente perigosos como os ECN, dentre eles os *Staphylococcus epidermidis* (CHEUNG GY & OTTO M, 2010).

Assim sendo fica evidenciada a importância do conhecimento precoce da presença desses microrganismos no ambiente da UTI Neonatal, em pacientes com imunidade reduzida como os RNs, principalmente pré-termo. Os sintomas da IN não são específicos, havendo a necessidade de testes microbiológicos e moleculares mais sensíveis e específicos (BROZANSKI *et al.*, 2006; KE *et al.*, 2000). A hemocultura é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de sepse, embora, quanto a sua morosidade, sejam levantadas questões quanto a sua efetividade (HONEST *et al.*, 2006; BROZANSKI *et al.*, 2006), já que seus resultados somente fiquem disponíveis, não menos que em 48-72 horas, atrasando o início do tratamento específico (YADAV *et al.*, 2005). Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi possível o desenvolvimento de testes com 100% de sensibilidade e especificidade para suspeita de sepse bacteriana em curto espaço de tempo, sendo amplamente usada para

detecção de outros agentes como vírus, protozoários e leveduras (YADAV *et al.*, 2005; JORDAN; DURSO 2000). Maiores vantagens são encontradas na metodologia de PCR em tempo real (qPCR), pela maior especificidade, poder quantitativo e pela redução de contaminação que esta técnica oferece. Os resultados obtidos por qPCR são atualmente, mais rápidos que a PCR convencional (TONDELLA *et al.*, 2002) com a vantagem de poder identificar um maior número de amostras.

Portanto, diante da necessidade atual, o presente estudo teve como objetivo determinar a incidência de *S.epidermidis* em septicemias nosocomiais a partir de DNA genômico de sangue periférico de RNs e desenvolver reação em cadeia da polimerase (PCR), qualitativa e quantitativa, para se correlacionando os dados da PCR com os resultados da hemocultura e evolução clínica dos pacientes.

1.1- DADOS BIBLIOGRÁFICOS

As bactérias provavelmente já faziam parte de nossa história mesmo antes da evolução do homem e sua posterior ascensão como ser predominante em nosso planeta.

Assim sendo, desde a antiguidade, seja oralmente ou após, passando pelo aparecimento da escrita e através de seus legados, a história da civilização vinha relatando um quadro de morbimortalidade ocasionado por infecções supostamente de caráter idiopático, geradas por muitos desses microrganismos pesando mais desfavoravelmente para um dos lados da balança, ou seja, o lado da morte; e assim, sem muitas manifestações e às ocultas, vieram as bactérias coabitando livremente tanto com a natureza quanto com o ser humano por todos esses anos.

Com o passar do tempo e a organização do homem nos lugarejos, vilas e cidades, vivendo em sociedade, proliferando-se e aumentando sua aglomeração, os homens criaram circunstâncias próprias que por si só levaram a necessidade de se criar uma área específica para se tratar os doentes. De acordo com relatos, os nosocômios surgiram por volta do ano 390 d.C. no Ocidente e por essa época já se verificava o aparecimento do problema das infecções inerentes a esses locais. Graças ao Concílio de Aachen (Aix-la-Chapelle), realizado em 816, onde o termo grego *nosokhomeion* foi traduzido para o latim e estes locais receberam o nome de “hospitais”.

Contudo, com a criação desses locais específicos para tratar os doentes que esses agentes encontraram a oportunidade ideal para se propagarem mais intensamente, isto devido,

à reunião de vários enfermos em um único local estando a manipulação dessas pessoas por aquelas que as tratavam em condições precárias de higiene associada às infecções cruzadas.

Esta situação persistiu na maioria dos hospitais europeus até o século XIX.

Louis Pasteur (1822 -1895) descobriu a existência de microrganismos e sua associação com as patologias. Oliver Wendell Holmes (1809 – 1894), se baseou nas idéias de Pasteur e propôs que a febre puerperal era transmitida através das mãos dos estudantes de medicina, que após as aulas de anatomia realizavam práticas obstétricas. Ignaz Philipp Semmelweis (1818 – 1865), corroborou a teoria de Holmes e além de provar que a febre puerperal era transmitida pelos médicos às parturientes, sugeriu a primeira forma de anti-sepsia: a lavagem das mãos.

Com a descoberta da penicilina, por Alexandre Fleming (1881 – 1955) iniciou-se a era antimicrobiana.

Já em 1958 a American Hospital Association recomenda a criação de Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), provendo os hospitais americanos de um sistema que apure as causas das infecções hospitalares (IH), munindo-os de instrumentos necessários contra possíveis ações legais movidas pelos parentes dos pacientes.

No Brasil, a primeira CCIH foi instalada em 1963 no Hospital Hernesto Dornelles em Porto Alegre e posteriormente, através da portaria 196/1983, o Ministério da Saúde determinou que todos os hospitais brasileiros deveriam manter uma CCIH.

Atualmente, apesar de todo o caminho à frente já percorrido nas áreas de ataque e defesa em campo de batalha contra esses microrganismos ora invasores ora oportunistas e causadores de infecções nosocomiais, uma situação emergente vem atraindo a preocupação principalmente dos médicos e despertando a atenção dos demais profissionais de saúde, deixando-os todos como em estado de alerta!

Estudos recentes mostraram que algumas cepas de microrganismos de outrora e por muitas décadas tidas como não patogênicas vem sendo apontadas como sendo as principais causas de infecções nosocomiais nos dias atuais; entre outras, as dos *Staphylococcus sp* coagulase negativos, tendo como seu principal representante o *Staphylococcus epidermidis*.

Robert Koch (1843-1910) o isolou e o descreveu pela primeira vez partir de uma ferida purulenta. Pasteur através de preparo de meio de cultura líquida o cultivou e Alexander Ogston a partir de experimentos com cobaias e camundongos pôs em evidência a sua patogenicidade e em 1880 adotou o nome do gênero da palavra grega *staphylo* que significa cacho de uvas.

Com o passar de todos esses anos os *Staphylococcus epidermidis* desenvolveram mecanismos de ataque e defesa que nada perdem se comparados aos que possuímos contra eles.

A infecção neonatal ocupa lugar de destaque nas suas causas, com graves consequências ao RN, percebidas ao nascimento (sepse precoce) ou tardiamente (sepse tardia) com alta taxa de morbi-mortalidade infantil.

1.2 - AGENTE ETIOLÓGICO (Os *Staphylococcus spp*)

Os *Staphylococcus spp* existem no mundo todo. Existem praticamente na pele de todas as pessoas podendo eventualmente habitar também o intestino e o trato urinário. As cepas com pouca virulência (coagulase-negativas) convivem naturalmente com a virulenta do *Staphylococcus aureus* (coagulase-positivas), embora existam muitas cepas de *Staphylococcus aureus* não virulentas.

O termo *Staphylé* deriva do grego e significa “cacho de uvas” logo, quando as colônias de *Staphylococcus spp* são devidamente coradas e observadas ao microscópio óptico, as mesmas apresentam-se dispostas de tal maneira que se assemelham a estes, daí a origem de seu nome.

O gênero *Staphylococcus* até então é constituído por 45 espécies e 24 subespécies segundo Euzéby (2011-2), cujo endereço eletrônico pode ser encontrado em <http://www.bacterio.cict.fr/> sendo que somente 15 espécies podem ser encontradas em amostras humanas e são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos de acordo com a resposta ao teste da coagulase.

São elas: *S. arlettae*, *S. aureus*, *S. aureus subsp. anaerobius*, *S. aureus subsp. Aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. capitis subsp. Capitis*, *S. capitis subsp. urealyticus*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. carnosus subsp. carnosus*, *S. carnosus subsp. utilis*, *S. uaseolyticus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. cohnii subsp. cohnii*, *S. condimenti*, *S. delphini*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. equorum subsp. equorum*, *S. equorum subsp. linens*, *S. felis*, *S. fleurettii*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. hominis subsp. hominis*, *S. hominis subsp. novobiosepticus*, *S. hyicus*, *S. hyicus subsp. chromogenes*, *S. hyicus subsp. hyicus*, *S. Intermedius*, *S. kloosii*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. lutrae*, *S. microti*, *S. muscae*, *S. nepalensis*, *S. pasteurii*, *S. pettenkoferi*, *S. piscifermentans*, *S. pseudintermedius*, *S. pulvereri*,

S. saccharolyticus, *S. saprophyticus*, *S. saprophyticus subsp. bovis*, *S. saprophyticus subsp. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. schleiferi subsp. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. sciuri subsp. carnaticus*, *S. sciuri subsp. lentus*, *S. lentus*, *S. sciuri subsp. rodentium*, *S. sciuri subsp. sciuri*, *S. simiae*, *S. simulans*, *S. succinus*, *S. succinus subsp. casei*, *S. succinus subsp. succinus*, *S. vitulinus*, *S. warneri*, *S. xylosus*.

As espécies encontradas no homem e consideradas como mais significativas em termos de risco ao ser humano são os *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus schleiferi* (ANVISA, 2004).

O *Staphylococcus epidermidis*, objeto alvo desse trabalho é assim classificado: Pertence ao Super-reino: bactéria; Filo: *Firmicutes*; Classe: *Bacilli*; Ordem: *Bacillales*; Família: *Staphylococcaceae*; Gênero: *Staphylococcus*; Espécie: *Staphylococcus epidermidis* ((www.ncbi.nlm.nih.gov, em maio de 2005) - “National Center for Biotechnology Information”).

Morfologicamente são células esféricas com tamanho variando entre 0,5–1,0µm de diâmetro. Encontram-se isoladas, aos pares ou formando grupamentos irregulares. Suas colônias de tamanho variando entre 2,5-4,0 mm de diâmetro apresentam usualmente coloração cinzenta ou cinzenta claro sem pigmentação, raramente apresentam um pigmento amarelo claro ou acastanhado (Schleifer & Kloos, 1975).

Quanto à coloração, quando submetidas à coloração de Gram, assumem caráter positivo. São anaeróbios facultativos com metabolismo respiratório e fermentativo. Sua temperatura ótima de crescimento varia entre 30° a 37°C. Com exceção do *S. saccharolyticus* que é anaeróbio; todas as outras espécies crescem mais favoravelmente em condições aeróbias.

Quanto a sua virulência, além de possuírem pelos adesivos (do latim = Pili) que facilitam sua adesão ao hospedeiro, algumas cepas de *Staphylococcus epidermidis* possuem a capacidade de formar biofilmes e propiciar a sua residência em implantes cirúrgicos. Não bastando isto, podem ainda apresentar, devido à reestruturação genética, resistência a antibióticos.

Trabalhos recentes sugerem a possibilidade de alguns ECN, particularmente o *Staphylococcus epidermidis* produzirem uma toxina similar a δ -toxina produzida pelos *Staphylococcus aureus*. Esta toxina é uma exoproteína de ação detergente que age nas

membranas de vários tipos celulares resultando em uma rápida lise celular (C. Marconi *et al.*, 2005).

Para diferenciá-lo das demais espécies estafilocócicas, classicamente, lança-se mão de algumas provas: Bioquimicamente – apresenta positividade para catalase, fosfatase e urease e negatividade para coagulase, fator clumping e oxidase pirrolidonil arilamidase. Não fermentam o manitol nem a trealose. Microbiologicamente: Tem crescimento reduzido frente à polimixina B e crescimento sensível frente à novobiocina (Bergey`s Manual, 9ª ed.).

Porém, uma prova mais moderna e especificamente direcionada ao agente etiológico em questão, como a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) trabalha diretamente com a identificação genômica do microrganismo, não necessitando mais de uma prova de inclusão/exclusão para a sua diferenciação; basta que numa pequena porção de material do genoma de cujo agente se queira identificar, esteja incluso na amostra a ser analisada.

Os *Staphylococcus spp* podem ser neutralizados por agentes detergentes, sabões, desinfetantes e altas temperaturas. Possuem grande resistência à desidratação, permanecendo viáveis durante períodos prolongados; também são resistentes a concentrações aumentadas de sal. São responsáveis por infecções nosocomiais tais como endocardite, suturas, shunt arteriovenoso, infecções de próteses, cateteres venosos centrais, válvulas mecânicas do coração e aparelhos ortopédicos; o microrganismo é encontrado com mais frequência na hemocultura (<http://www.anvisa.gov.br>); (adaptado de Costerton *et al.*, 1999).

1.3 TRANSMISSÃO AO NEONATO

Em primeiro lugar, é de extrema importância salientar a presença do *Staphylococcus epidermidis* como o real agente etiológico da infecção hospitalar ou sua falsa presença quando na positividade das determinações laboratoriais seja por contaminação da amostra no momento da coleta ou da realização da cultura.

Como já sabido, as infecções hospitalares geralmente são originadas a partir de colonizações da própria pele e dos tratos respiratório e digestivo dos pacientes e em condições especiais, tais como as de “quebra das barreiras anatômicas” (uso de cateteres), onde ocorre a invasão da corrente sanguínea pelo microrganismo.

Os principais meios de transmissão desse tipo de infecção nosocomial ocorrerá dentro de pelo menos uma das seguintes condições:

1. Por contato direto; contato entre o indivíduo infectado e o susceptível.
Ex: doente-doente, profissional contaminado-indivíduo susceptível.
2. Por contato indireto; contato feito por objetos inanimados.
Ex: estetoscópios, termômetros, aparelhos de ventilação, etc.
3. Através de aerossóis.
Ex: tosse, espirros ou escarros de pacientes contaminados.
4. Através de fluidos contaminados.
Ex: nutrição parenteral, medicamentos ou sangue infundidos, etc.

1.4- A DOENÇA NEONATAL

A sepse neonatal, do ponto de vista médico pode ser evidenciada através de sinais e sintomas que se expressam no RN e se traduzem na forma de um quadro clínico onde geralmente podem apresentar hipotermia ou hipertermia, desconforto respiratório, apnéia, cianose, hepatomegalia, icterícia, vômito ou distensão.

A prematuridade é com certeza o maior obstáculo para a defesa do RN pré-termo, fator este que predispõe à aquisição de infecções quando o mesmo é exposto a fatores de risco.

Os fatores de risco neonatal, como a imaturidade imunológica, causada por deficiência qualitativa e ou quantitativa; o sistema imune inespecífico representado pela barreira epidérmica imatura, a deficiência de polimorfonucleares, macrófagos e monócitos, a deficiência de complemento e fibronectina e finalmente a deficiência do sistema imune específico representado pelas células T e células B (anticorpos específicos) tornam o RN predisposto à infecção neonatal.

Outros fatores, como os fatores de risco ambientais, em que a relação RN/equipe assistencial imprópria; área física deficiente; medicamentos, bloqueadores de H₂, dexametasona, indometacina; contaminação de nutrição parenteral por mais de duas semanas; derivados de sangue; leite materno (amamentação no seio) e administração de fórmula láctea, também podem predispor o RN à aquisição de infecção neonatal.

Os *Staphylococcus epidermidis* assim como outras bactérias oportunistas aproveitam-se das situações propícias para transformarem-se de organismos inofensivos em invasores capazes de causar sepse neonatal.

2. OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Detectar a prevalência de DNA genômico para *staphylococcus epidermidis* plasmô coagulase negativa em neonatos pré-termo maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 – Desenhar oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dentro da sequência alvo conservada do genoma de *Staphylococcus epidermidis* para PCR convencional e qPCR.

2.2.2- Desenvolver PCR convencional para detecção específica do genoma de *S. epidermidis* em amostras de sangue periférico de neonatos maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção.

2.2.3 - Desenvolver PCR em tempo real para detecção específica e quantificação absoluta de DNA de *S. epidermidis* presente em amostras de sangue periférico.

2.2.4 – Avaliar a infecção nestes pacientes pelos resultados de hemocultura de rotina e clínica além de correlacionar sua evolução com resultados da detecção quantitativa por qPCR.

2.2.5 – Avaliar as variáveis clínicas e antropométricas de acordo com os resultados obtidos da qPCR,

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Critérios de inclusão

Para obtenção de um número significativo de participantes e se respeitando o cronograma inicial, foi omitida a idéia de se trabalhar somente com prematuros. Foi incluído nesse estudo, 34 RNs prematuros e 11 RNs nascidos a termo, perfazendo um total de 45 RNs que apresentavam quadro de piora clínica e internados no Setor de Neonatologia do Hospital Universitário da UFMS, Campo Grande - MS, compreendido nos períodos de dezembro de 2011 a agosto de 2012.

Crianças essas, cujas mães, com idades que variaram entre 15 e 39 anos, esclarecidas sobre a pesquisa, assinaram o documento de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e deram palpite favorável a suas respectivas inclusões. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMS.

3.2 – Critérios de exclusão

Os pacientes cujos pais ou responsáveis se negaram a assinar o TCLE e pacientes de etnia indígena não foram incluídos neste estudo.

3.3 - Amostras de sangue e cultura

Para este estudo, por época da piora clínica e depois da troca da primeira associação de ATB instituída, foram coletados 2mL de sangue em BacT/ALERT® PF para a realização da hemocultura e alíquotas de 300 µl em nitrogênio líquido foram estocadas para o ensaio molecular. Os meios de cultura BacT/ALERT® foram levados ao aparelho BacT/ALERT 3D60 (BacT/ALERT® 3D microbial testing) no Laboratório de Análises Clínicas-LAC/Departamento de Microbiologia/UFMS. As amostras com resultados positivos foram semeadas em placas de Ágar Chocolate (meio não seletivo) e Ágar McConkey (seletivo para bactérias Gram negativas). Após o crescimento das bactérias foi realizada a coloração de Gram. Disponível em <http://www.whonamedit.com/doctor.cfm/696.html>; seguido de metodologias de rotina para provas bioquímicas específicas para identificação de bactérias, os resultados foram interpretados de acordo com o Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde de 2004, disponível em

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia.asp>. Os resultados da microbiologia de rotina foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes.

3.4 - Extração de DNA genômico

Para o ensaio molecular foi extraído DNA genômico de sangue no Laboratório de Diagnóstico Molecular em Pesquisas Pediátricas– Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, de acordo com o método de Grimberg et al (1989) com modificações realizadas no NUFIGEN-ICB-UFGM, para sangue total. Em síntese, foi removida uma alíquota de 300 µl do sangue e colocada em um eppendorf de 2ml. A este foi acrescentado 1ml de Tampão de Lise Celular para ressuspender as células e completar a lise celular.

A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 4.000 rpm em uma microcentrífuga para precipitar leucócitos. O sobrenadante foi então desprezado em papel absorvente e depois descartado apropriadamente. Estes procedimentos foram repetidos por quatro vezes.

Foram acrescentados 400µl de Master Mix, sendo 390 µl de Tampão de digestão de proteínas e 10 µl de Proteinase K, com vórtex por 15 segundos para dissolver o pellet. As amostras foram incubadas a 55°C em Banho Maria por pelo menos 2 horas, e vórtex a cada 30 min. O material foi centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm para precipitar os fragmentos celulares e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, e então acrescentado 190 µl de Cloreto de Litium 7,5 M.

As amostras foram agitadas por aproximadamente 5 segundos e colocadas no gelo seco por 10 minutos, após foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm para precipitar proteínas e outras contaminações. De cada amostra foi retirado cuidadosamente o sobrenadante e então colocado em um novo tubo.

O DNA genômico foi precipitado com a adição de 1 ml de etanol a 100% e os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos sendo o sobrenadante descartado e o pellet de DNA lavado com 1 ml de Etanol 70% e centrifugado novamente. O etanol 70% foi descartado e o pellet deixado secar por aproximadamente 30 min. A seguir, acrescentados 200µl de água *s.f.* (milliQ) em cada uma das amostras para ressuspender o DNA. Após a extração, o DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (GE *NanoVue spectrophotometer*). Alíquotas de aproximadamente 50 ng de cada amostra foram utilizadas para PCR convencional ou qPCR.

3.4 - PCR convencional

Para a PCR convencional utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores: SEPIKFOR = 5'- TGT GCG ACT AGT GTC ATT CAC TCG -3' e SEPIKREV = 5'- GTC ACC AAG CAC ATG CTG AAG GTA -3', amplicon de 119 pb (Figura 1) da região do gene *SdrH* (serine-aspartate repeat protein family).

Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/8101008>; McCrea et al., 2000)

```
tcctttagggftaccagggtttttccgggatgtgaacccttacctgaactgtaccagagctgaaatcactatctgaatctgagtcactat
ctgaatctgagtcactgtctgaatctgaatcactgtctgagctgagtcactgtctgaatctgaatcactatctgaatctgaatcactatct
gaatctgaatcactatctgaatctgaatcactgtctgagctgagtcactgtctgaatctgaatcactatctgaatctgaatcactatctga
gtctgaatcactgtctgaatctgagtcactatctgagctgaatcactgtctgaatctgagtcactatctgaatctgagtcactatctgaat
ctgagtcactgtctgaatctgaatcactatctgaatcactatctgagctgaatcactatctaaatgtgtcattttctgagtcact
atgtgaaacgatactgtatctaaatcattatccgaattcatactaattcctgtgcgactagtgtcattcactcgttgataatattgctcttag
ctgtatttctcaatctgatctttagaaaaattaatgtcaataggatgattaccttcagcatgtgcttggtgactgaataatgatgtagttac
catgaaagctgtgcgactagtgtcattcactcgttgataatattgctcttagctgtatttctcaatctgatctttagaaaaattaatgtca
ataggatgattaccttcagcatgtgcttggtgac
```

SEPIKFOR = 5'- TGT GCG ACT AGT GTC ATT CAC TCG -3'

SEPIKREV = 5'- GTC ACC AAG CAC ATG CTG AAG GTA -3'

Figura 1 - Sequência de nucleotídeos e *primers* específicos da região alvo da PCR para o *amplicon* de 119 pb dentro do gene *SdrH* do *S. epidermidis* (*serine-aspartate repeat protein family*). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/8101008>; McCrea et al., 2000). Os iniciadores selecionados para PCR convencional estão sublinhados no fragmento da sequência alvo.

Resumidamente, 50 ng de DNA genômico de cada amostra (5 µl), foram utilizados na reação que consistiu de: 11µl de água milli-Q SF; 2,5 µl de tampão PCR 10x; 2 µl de dNTP mix (200 µM cada dNTP); 2,5 µl de MgCl₂ a 25 mM; 2 µl de cada *primer* (10 pmol/µl); 0,125 µl (2,5 U) de Taq DNA polimerase (Laboratório Phoneutria) e 5 µl de DNA genômico, num volume total de 25 µl de reação. Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água. Adicionou-se 30 µl de óleo mineral em cada tubo. A

reação foi desenvolvida em termociclador *MJ Research Minicycler* com o seguinte programa: 95°C/5 min.; seguido de 52°C/2 min. e 72°C/2 min.; seguidos de 05 ciclos de 94°C/1 min.; 56°C/1 min. e 72°C/1 min.; seguidos de 40 ciclos de: 93°C/ 1 min.; 56°C/ 1 min. e 72°C/1 min.; com extensão final a 72°C/4 min. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 3 µl da PCR para eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata.

3.5 - Gel de Poliacrilamida

Para a eletroforese dos produtos de PCR convencional, o gel de poliacrilamida foi preparado utilizando-se 5,4 mL de solução estoque de acrilamida 30%; 4 mL de TAE 5x; 150 µl de persulfato de amônio 10%; 10 µl de TEMED q.s.p. e 10 mL H₂O destilada. Foram utilizados 3 µl (100 ng) de marcador 100 pb DNA *ladder* e 3 µl de amostras para os produtos de PCR. Após o fracionamento, foi feita uma fixação por 10 minutos em 20 mL etanol (100%), 1 mL ácido acético (0,5%) e 100 mL H₂O destilada (q.s.p.). Em seguida, foi realizada a impregnação por 10 minutos em AgNO₃ (0,1%). Lavou-se o gel em H₂O destilada por 3 a 5 minutos e revelou-se por 10 minutos em solução contendo 6 gramas de NaOH (3,6%), 600 µl formol (0,3%) q.s.p. e 100 mL de H₂O destilada (GRIMBERG et al., 1989).

3.6 - PCR em tempo real (qPCR)

Para a reação de PCR em Tempo Real foi utilizado o kit *SYBR GREEN PCR core Reagents* da PE Biosystems (No. Cat. 4304886; Warrington, UK). Para verificação da viabilidade das amostras de DNA genômico selecionados e posterior quantificação absoluta dos fragmentos alvos de *S. epidermidis* por PCR em Tempo Real, utilizou-se β-actina para normalização. Os *primers* selecionados foram: HFORBACT = 5'-tcaccacactgtgccatctacga-3' e HREVBACT = 5'-cagcggaaccgctcattgccaatgg-3' para o amplicon de 295pb do gene da β-actina humana, (fig. 01). Para *S. epidermidis* os primers específicos foram: SEPIOFOR = 5'-CAC TGA GTC CAA GGA AAC TAC AG -3' e SEPIOREV = 5'- GTG AGT TGT TGA GCC ATC CCA AC -3'; (Figura 2) para o gene que codifica o *RNAIII* da delta hemolisina, amplicon de 96 pb (M.E Olson and P.D Fey, *S. epidermidis* 1457 *agr* region; Unpublished; 1-4343 pb; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/224815082>).

ctcacggcttgataacttattattaaggggaatgttttacagttattttcaatctatttttggggatgttattaattatgaaaaatttttagtgaattatctatttaacatgataaattgaatgttggttacgatagcttacatgctagaataattacctatttaaggtagctaagaataaacgt
aacactgagtccaaggaaactacagctactagcaaatgcttctcacttgcttagttatattagtaaattattaagttgggatggctcaac
aactcactaatagtattaattatacgaagaaaacaaagttacaaaagttacaatagactcattcaaaaattatttttcactgagtccaagg
aaactacagctactagcaaatgcttctcacttgcttagttatattagtaaattattaagttgggatggctcaacaactcac

SEPIOFOR = 5'- CAC TGA GTC CAA GGA AAC TAC AG -3'

SEPIOREV = 5'- GTG AGT TGT TGA GCC ATC CCA AC -3'

Figura 2 - Sequência de nucleotídeos e *primers* específicos da região alvo da PCR para o *amplicon* de 96 pb do gene *RNAlII* que codifica a delta hemolisina M.E Olson and P.D Fey, S. Unpublished. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/224815082>; os iniciadores aparecerem sublinhados nas sequências alvos.

Utilizou-se um protocolo básico mantendo as concentrações usuais de reagente num volume final de reação de 25 μ l. Resumidamente, a reação consistiu-se de: 5,5 μ l de água para PCR (SF), 12,5 μ l *SYBR Green master mix*), 2 μ l *primer mix* (1,5 pmol cada) e 5 μ l de DNA genômico (aproximadamente 200 ng). Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. A reação em tempo real foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 SDS* no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°C/1 min.

Como controle positivo e para posterior quantificação dos resultados, uma curva-padrão de DNA genômico de amostra *S. epidermidis* ATCC 12228 foi construída a partir de diluições seriadas de: 10⁻³, 10⁻⁷ e 10⁻¹¹ ng. Para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados por qPCR foi realizada uma curva de dissociação como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS* e os fragmentos amplificados também foram posteriormente visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.

4.RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 – Resultados das hemoculturas:

A hemocultura é muito importante na detecção de possível infecção neonatal. Os resultados das hemoculturas processadas em BacT/ALERT® para as 45 amostras, foram obtidos a partir dos prontuários dos respectivos RNs. Os dados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Resultado das hemoculturas em BacT/ALERT - (L.A.C.), mostra positividade de *S.epidermidis* nas amostras 4, 7, 9, 27, 29 e 42, em 45 amostras.

AMOSTRA	RESULTADO	MICROORGANISMO ISOLADO	(n)
1	NÃO SOLICITADO		0
2	NEGATIVO		1
3	NEGATIVO		1
4	POSITIVO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
5	NEGATIVO		1
6	NEGATIVO		1
7	POSITIVO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
8	NEGATIVO		1
9	POSITIVO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
10	NEGATIVO		1
11	NEGATIVO		1
12	NEGATIVO		1
13	NEGATIVO		1
14	NEGATIVO		1
15	POSITIVO	<i>Streptococcus gordonii</i>	1
16	NEGATIVO		1
17	NEGATIVO		1
18	NÃO SOLICITADO		0
19	NÃO SOLICITADO		0
20	POSITIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
21	POSITIVO	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
22	POSITIVO	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
23	POSITIVO	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
24	NEGATIVO		1
25	NEGATIVO		1
26	NEGATIVO		1
27	POSITIVO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
28	NEGATIVO		1
29	POSITIVO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
30	POSITIVO	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
31	NEGATIVO		1
32	NEGATIVO		1
33	NEGATIVO		1
34	POSITIVO	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
35	NEGATIVO		1
36	NEGATIVO		1
37	NÃO SOLICITADO		0
38	NÃO SOLICITADO		0
39	POSITIVO	<i>S.aureus</i> , ECN, Enterobactérias: <i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i>	1
40	NEGATIVO		1
41	NÃO SOLICITADO		0
42	POSITIVO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
43	NEGATIVO		1
44	NEGATIVO		1
45	NEGATIVO		1
TOTAL			45

4.2- Resultados da quantificação de DNA obtidos das amostras de sangue:

Os resultados da quantificação de DNA obtidos das amostras de sangue dos RNs, por espectrofotometria, são apresentados na Tabela 2. As leituras de densidade óptica (OD₂₆₀ nm) para ácido nucleico (SAMBROOK *et al.*, 1989) são apresentadas e os valores finais de concentração calculados após correção da diluição.

As concentrações finais de DNA genômico por amostra variaram de 3 a 34 ng (0,011±0,008) por µl, isto é, a quantidade total em 200 µl variou de 0,6 a 6,8 µg (2,14±1,62). Portanto, estes resultados estão de acordo com o esperado em volumes de 300 µl de sangue, como descrito por Grimberg *et al* (1989). As amostras foram consideradas viáveis para a etapa seguinte de PCR.

Tabela 2 - Quantificação por espectrofotometria das 45 amostras de DNA genômico. As leituras de densidade óptica (OD) nos comprimentos de ondas de 260 para ácido nucleico.

NA	260	280	260/280	concentração (µg/µl)	total (µg)	em 5 µl
1	0,69	0,54	1,8	0,017	3,4	0,085
2	1,07	0,81	1,7	0,031	6,2	0,155
3	0,65	0,52	1,5	0,019	3,8	0,095
4	1,15	0,98	1,8	0,020	4	0,100
5	3,85	3,73	1,9	0,013	2,6	0,065
6	1,23	1,13	1,2	0,029	5,8	0,145
7	0,83	0,48	2,0	0,034	6,8	0,170
8	0,48	0,45	1,5	0,004	0,8	0,020
9	0,62	0,54	1,7	0,009	1,8	0,045
10	0,42	0,36	2,0	0,005	1	0,025
11	0,42	0,36	2,0	0,005	1	0,025
12	0,42	0,36	2,0	0,005	1	0,025
13	0,52	0,41	2,0	0,009	1,8	0,045
14	0,52	0,41	2,0	0,005	1	0,025
15	0,64	0,51	2,0	0,013	2,6	0,065
16	0,64	0,52	2,0	0,008	1,6	0,040
17	0,74	0,63	2,0	0,010	2	0,050
18	0,58	0,46	2,0	0,012	2,4	0,060

(Conclusão)**Tabela 2** - Quantificação por espectrofotometria das 45 amostras de DNA genômico. As leituras de densidade óptica (OD) nos comprimentos de ondas de 260 para ácido nucleico.

19	0,57	0,45	2,0	0,009	1,8	0,045
20	0,44	0,37	2,0	0,006	1,2	0,030
21	0,47	0,39	2,0	0,008	1,6	0,040
22	0,38	0,33	2,0	0,005	1	0,025
23	0,81	0,71	2,0	0,009	1,8	0,045
24	0,52	0,47	1,5	0,007	1,4	0,035
25	0,66	0,55	2,0	0,011	2,2	0,055
26	0,56	0,48	1,9	0,009	1,8	0,045
27	0,33	0,31	1,5	0,004	0,8	0,020
28	0,44	0,36	2,0	0,007	1,4	0,035
29	1,88	1,63	1,6	0,032	6,4	0,160
30	0,74	0,58	1,7	0,019	3,8	0,095
31	0,55	0,5	2,0	0,004	0,8	0,020
32	0,83	0,81	1,6	0,003	0,6	0,015
33	0,67	0,55	2,0	0,008	1,6	0,040
34	0,51	0,47	1,3	0,010	2	0,050
35	0,58	0,48	2,0	0,009	1,8	0,045
36	0,48	0,42	2,0	0,006	1,2	0,030
37	0,58	0,53	1,5	0,007	1,4	0,035
38	0,68	0,63	2,0	0,005	1	0,025
39	0,6	0,58	1,3	0,005	1	0,025
40	0,46	0,43	2,0	0,003	0,6	0,015
41	0,69	0,7	0,9	0,003	0,6	0,015
42	0,74	0,52	1,9	0,022	4,4	0,110
43	0,87	0,75	2,0	0,011	2,2	0,055
44	0,44	0,4	2,0	0,003	0,6	0,015
45	0,71	0,64	1,5	0,009	1,8	0,045

4.3 - Resultados obtidos por PCR qualitativo convencional:

Os resultados obtidos por PCR convencional utilizando-se os *primers* SEPIKFOR e SEPIKREV para amplicons de 119 pb dentro da região do gene *SdrH* são apresentados nas Figuras 3 (A, B, C e D). A Figura 3D mostra a eletroforese em gel de poliácridamida dos produtos de PCR convencional dos 8 resultados positivos de um total de 45 amostras (7, 9, 16, 18, 30, 34, 43 e 45), observadas em gel de poliácridamida, corado com nitrato de prata.

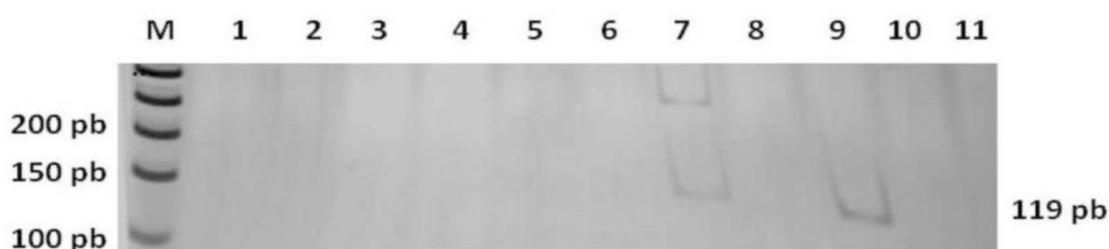


Figura 3.A - Resultados da PCR convencional com os *primers* SEPIKFOR e SEPIKREV para amplicons dentro da região do gene *SdrH* do *S. epidermidis* em amostras de DNA de sangue. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 3 μ l da PCR para eletroforese em gel de poliácridamida a 110 volts/1 hora, corado com nitrato de prata. Os produtos de PCR de 119 pb são confirmados para cada amostra positiva. (M), marcador DNA 50 pb DNA *ladder*. O resultado mostra a positividade das amostras 7 e 9, também positivas na hemocultura.

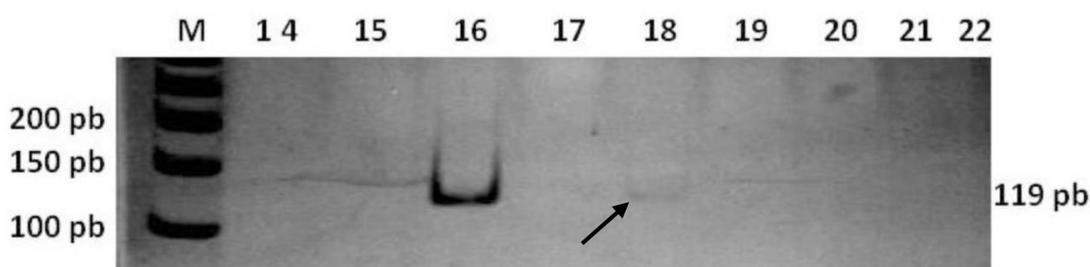


Figura 3.B - Resultados da PCR convencional com os *primers* SEPIKFOR e SEPIKREV para amplicons dentro da região do gene *SdrH* do *S. epidermidis* em amostras de DNA de sangue. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 3 μ l da PCR para eletroforese em gel de poliácridamida a 110 volts/1 hora, corado com nitrato de prata. Os produtos de PCR de 119 pb são confirmados para cada amostra positiva. (M), marcador DNA 50 pb DNA *ladder*. O resultado mostra a positividade das amostras 16 e 18; a amostra 16 foi negativa na hemocultura enquanto que quanto à amostra 18, não havia registro de solicitação do exame.



Figura 3.C - Resultados da PCR convencional com os *primers* SEPIKFOR e SEPIKREV para amplicons dentro da região do gene *SdrH* do *S. epidermidis* em amostras de DNA de sangue. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 3 μ l da PCR para eletroforese em gel de poliacrilamida a 110 volts/1 hora, corado com nitrato de prata. Os produtos de PCR de 119 pb são confirmados para cada amostra positiva. (M), marcador DNA 50 pb DNA *ladder*. O resultado mostra a positividade das mostras 30 e 34, enquanto que na hemocultura, a amostra 30 apresentou positividade de *Staphylococcus hominis* e a 34 de *Staphylococcus haemolyticus*, respectivamente.

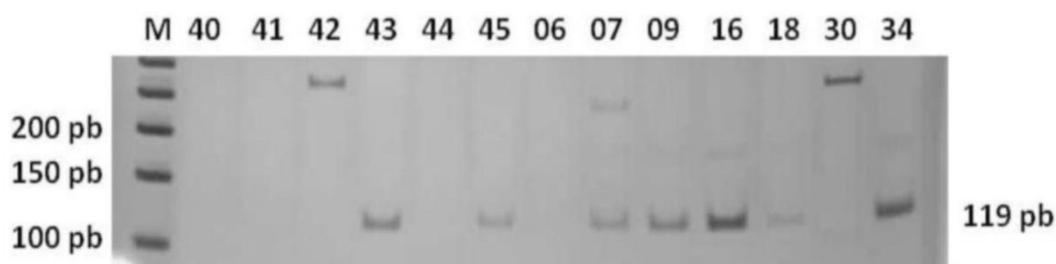
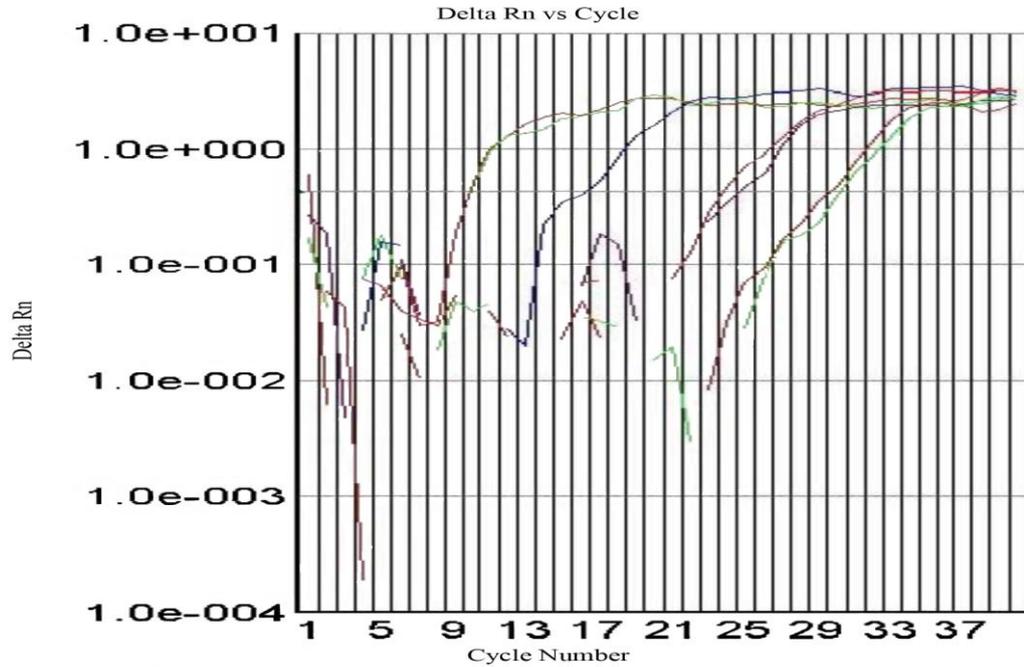


Figura 3.D - Resultados da PCR convencional com os *primers* SEPIKFOR e SEPIKREV para amplicons dentro da região do gene *SdrH* do *S. epidermidis* em amostras de DNA de sangue. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 3 μ l da PCR para eletroforese em gel de poliacrilamida a 110 volts/1 hora, corado com nitrato de prata. Os produtos de PCR de 119 pb são confirmados para cada amostra positiva. (M), marcador DNA 50 pb DNA *ladder*. O resultado mostra a positividade das amostras 43 e 45 e a confirmação da positividade das amostras 07, 09, 16, 18, 30 e 34. As amostras 43 e 45 foram negativas de *S. epidermidis* na hemocultura.

4.4 - Resultados obtidos por qPCR quantitativo:

A viabilidade das amostras de DNA do sangue para normalização é demonstrada pela qPCR da β -actina humana para o amplicon alvo de 295 bp. Nas figuras 4 (A e B), a Figura 4 (A) mostra a amplificação da Curva padrão da β -actina humana usada para calibrar a qPCR e normalizar as amostras de DNA para o diagnóstico de *S. epidermidis* em sangue dos RNs. Estes resultados demonstraram um perfil linear típico de amplificação das diluições 1ng, 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} ng, pelo SybrGreen em função do número de ciclos (Ct).



Fonte:
Selected Detector: Sybr Green; Start: (Auto); End: (Auto); Threshold: 0.43191099

Figura 4.A - Curva padrão da β -actina humana usada como calibrador interno da qPCR. A figura mostra o perfil típico das curvas obtidas da esquerda para a direita durante a amplificação das diluições 1ng, 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} ng. Os valores em y são resultados da detecção de fragmentos marcados cumulativamente pelo SybrGreen em função do número de ciclos (Ct) no eixo x.

A Figura 4B mostra os resultados obtidos pela curva de calibração da β -actina apresentando os quatro pontos de diluição. A curva apresentou alta linearidade demonstrada com um elevado coeficiente de regressão linear $r^2 = 0.9947$. Os dados mostraram que a eficiência da reação de qPCR foi de 100% pela equação $E = 10^{\{-1/\text{slope}\}}$. Estes valores de eficiência e alta linearidade da curva permitem a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na qPCR, como sugerido por Pfaffl (2001).

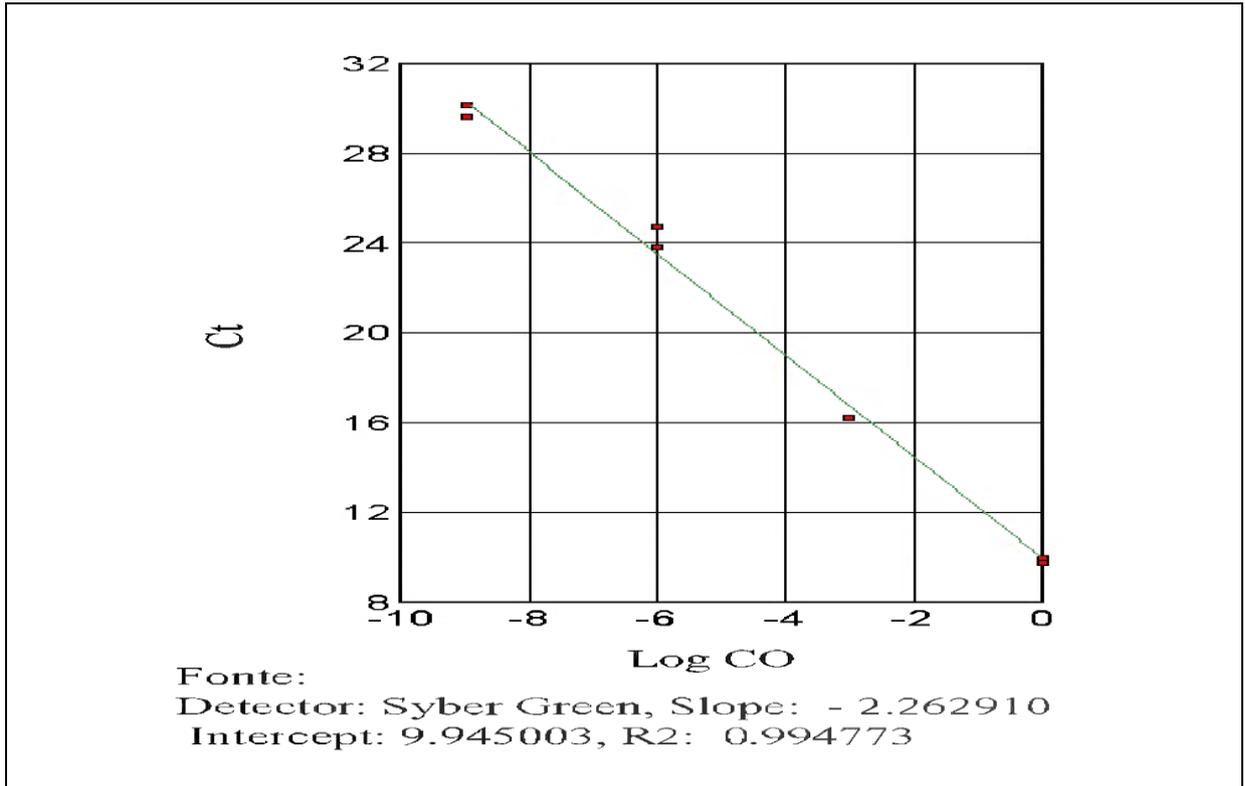


Figura 4.B - Curva de calibração da β -actina apresentando os quatro pontos de diluição. A curva apresenta alta linearidade demonstrada pelo coeficiente de regressão linear elevado ($r^2 = 0.9947$). O valor de *slope* da curva mostra uma eficiência de 100% da reação pela equação $E = 10^{(-1/slope)}$. Essa eficiência permite a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na qPCR.

O controle positivo utilizado para quantificação dos resultados é apresentado como curva-padrão de DNA genômico de amostra de *S. epidermidis* ATCC 12228 não produtor de biofilme (Figura 5). A confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados por qPCR é demonstrado pelas curvas de dissociação e os fragmentos amplificados da curva padrão são também visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata como mostrado na Figura 5.

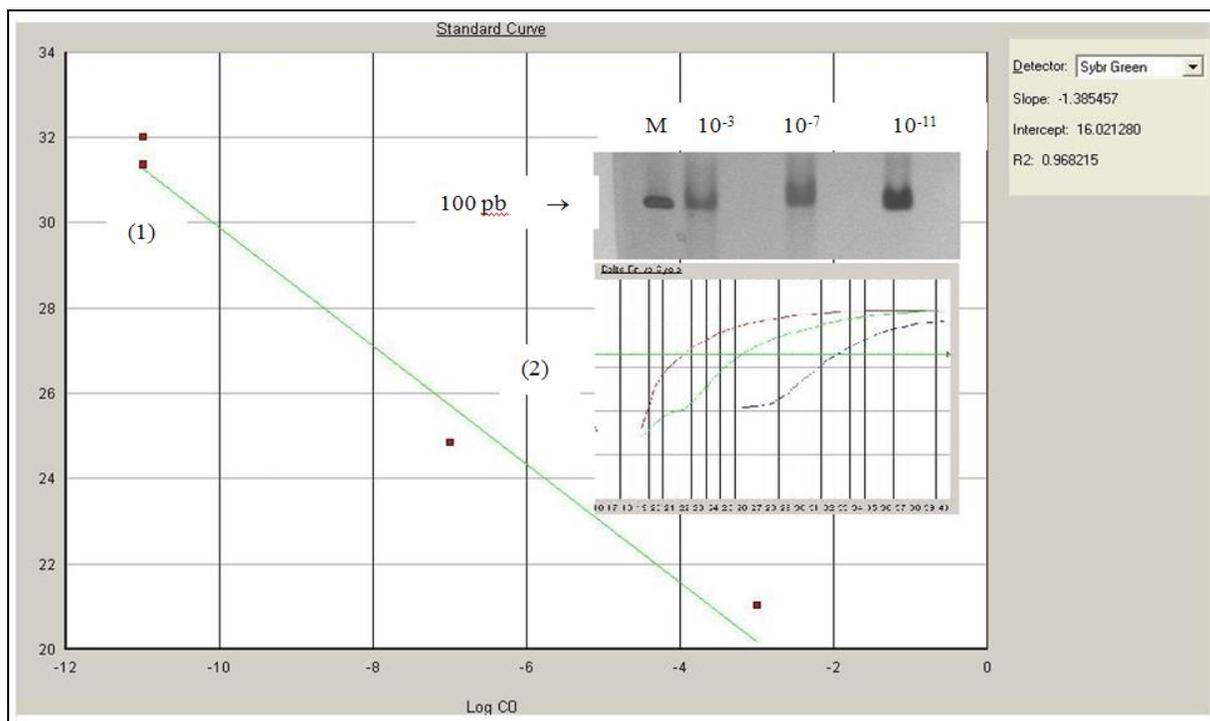


Figura 5 – Curva de calibração (1) e curva-padrão (2) usadas como calibrador interno da qPCR para o diagnóstico de *S. epidermidis* nas amostras de sangue. A figura mostra o perfil típico das curvas obtidas da esquerda para a direita durante a amplificação das diluições seriadas do DNA genômico de amostra *S. epidermidis* ATCC 12228 (10^{-3} , 10^{-7} e 10^{-11} ng), para controle positivo e quantificação absoluta dos resultados positivos. O gel mostra os *amplicons* para *S. epidermidis* das respectivas amostras positivas. Os valores em y são resultados da detecção de fragmentos marcados cumulativamente pelo SybrGreen em função do número de ciclos (Ct) no eixo x. A curva apresenta linearidade demonstrada pelo coeficiente de regressão linear elevado ($r^2 = 0.97$). O valor de *slope* da curva mostra uma eficiência de 100% da reação pela equação $E = 10^{(-1/slope)}$ (Pfaffl, 2003). Essa eficiência permite a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na qPCR. (M), marcador 100 pb.

Dentre as 8 amostras analisadas, 8 foram positivas para *S. epidermidis* por qPCR, ou seja, 100%. Os resultados obtidos por qPCR utilizando-se os *primers* SEPIOFOR e SEPIOREV para o gene que codifica o *RNAIII* da delta hemolisina, *amplicon* de 96 pb, são apresentados na Figura 6.

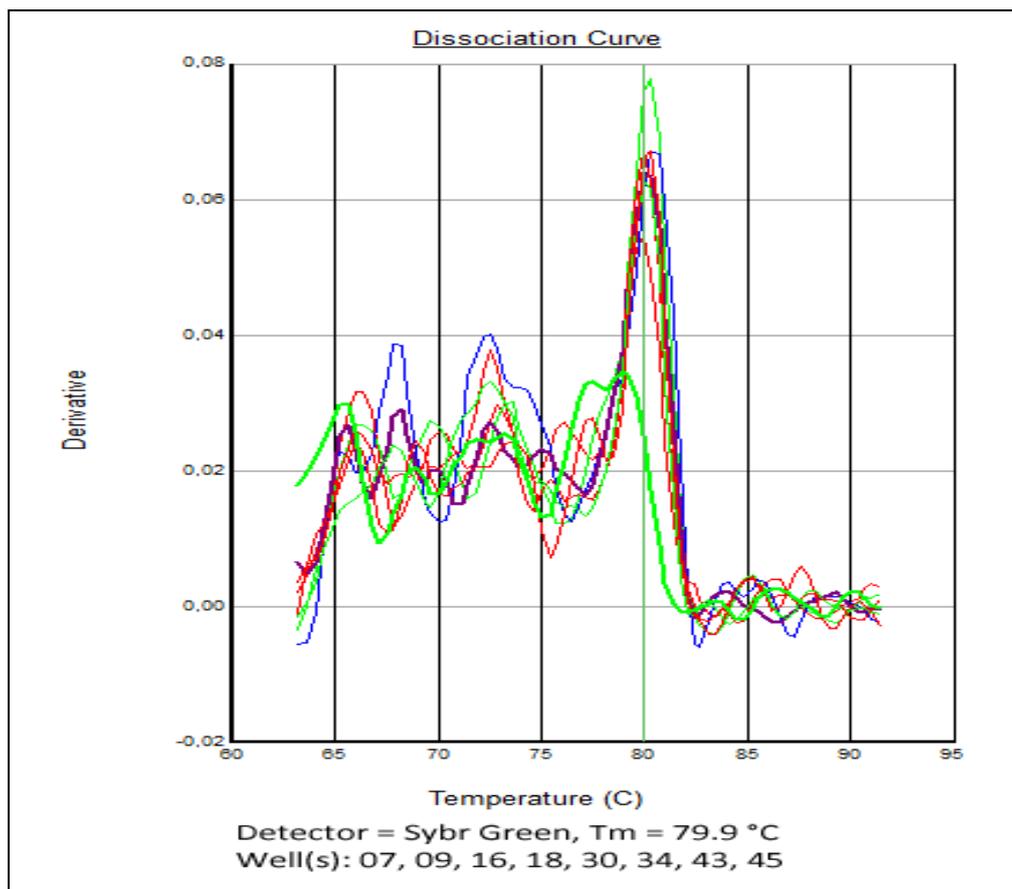


Figura 6 - Curvas de dissociação dos *amplicons* das amostras positivas, para confirmação da especificidade da região alvo do DNA de *S. epidermidis* por qPCR (programa *ABI Prism 7000 SDS*). (T_m = *melting temperature*), temperatura de dissociação específica para o amplicom alvo de 96 pb.

A Tabela 3 mostra uma visão panorâmica e elaborada a partir dos três métodos juntos para melhor visualização e compreensão dos resultados obtidos.

Tabela 3 – Relação entre resultados positivos obtidos a partir das hemoculturas, PCR convencional e PCR Quantitativo (em Tempo Real), de *Staphylococcus epidermidis* e o número de óbitos entre os 45 pacientes internados na UTI neonatal do NHU-UFMS – Campo Grande-MS, no período de 07/12/2011 a 08/08/2012.

AMS	HEMOC	(%)	PCRc	(%)	qPCR	(%)	†	(n)
1	NEG	----	NEG	----	----	----	Sim	1
2	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
3	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
4	<i>S. epidermidis</i>	2,21	NEGATIVO	----	----	----	----	1
5	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
6	NEG	----	NEG	----	----	----	Sim	1
7	<i>S. epidermidis</i>	2,21	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	12,50	----	1
8	NEG	----	NEG	----	----	----	Sim	1
9	<i>S. epidermidis</i>	2,21	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	12,50	Sim	1
10	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
11	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
12	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
13	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
14	NEG	----	NEG	----	----	----	Sim	1
15	<i>S. gordonii</i>	----	NEG	----	----	----	----	1
16	NEGATIVO	----	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	12,50	----	1
17	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
18	NEGATIVO	----	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	12,50	----	1
19	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
20	<i>S. aureus</i>	----	NEG	----	----	----	----	1
21	<i>S. haemolyticus</i>	----	NEG	----	----	----	----	1
22	<i>S. hominis</i>	----	NEG	----	----	----	----	1
23	<i>S. hominis</i>	----	NEG	----	----	----	----	1
24	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
25	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
26	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
27	<i>S. epidermidis</i>	2,21	NEGATIVO	----	NEGATIVO	----	----	1
28	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
29	<i>S. epidermidis</i>	2,21	NEGATIVO	----	NEGATIVO	----	----	1
30	<i>S. hominis</i>	----	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	12,50	----	1
31	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
32	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
33	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
34	<i>S. haemolyticus</i>	----	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	12,50	----	1
35	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
36	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
37	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
38	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
39	<i>S. aureus</i> , ECN, <i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i>	----	NEG	----	----	Sim	Sim	1
40	NEG	----	NEG	----	----	----	Sim	1
41	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
42	<i>S. epidermidis</i>	2,21	NEGATIVO	----	NEGATIVO	----	----	1
43	NEGATIVO	----	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	12,50	Sim	1
44	NEG	----	NEG	----	----	----	----	1
45	NEGATIVO	----	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	12,50	----	1
TOTAL	6	13,30	8	17,80	8	100	----	45

Nota: A amostra 39, apresenta sinergismo bacteriano.

Uma tabela de contingência foi construída usando o programa de software GRAPH PAD SOFTWARE INSTAT Microsoft Windows 7, baseando-se no Teste Exato de Fisher e pode ser visualizada na Tabela 4.

Tabela 4 – Tabela de contingência.

POSITIVIDADE (<i>S. epidermidis</i>)	HEMOCULTURA	PCR	qPCR
SIM +	6	8	8
NÃO -	39	37	37
(n)	45	45	45

4.5 - Resultados das pesquisas referentes a variáveis que mostram características gerais dos pacientes analisados:

Algumas características como o local de nascimento, mostraram que 62,50% (n = 5) pacientes vieram de outras localidades dentro do Estado e que 37,50% (n = 3) nasceram na cidade de Campo Grande-MS. Quanto a variável sexo, dos pacientes positivados para *Staphylococcus epidermidis* por qPCR, 50,00% (n = 4) eram do sexo masculino e 50,00% (n = 4) eram do sexo feminino. Se vaginal ou cesáreo, os resultados mostraram que 37,50% (n = 3) partos foram vaginais e 62,50% (n = 5) por cesariana. A idade gestacional foi determinada a partir do método de New Ballard Score, tendo sido expressa em semanas e dividida da seguinte forma, menores ou iguais a 37 (trinta e sete) semanas, que mostraram 37,50% (n = 3) pacientes e maiores que 37 (trinta e sete) semanas, mostraram 62,50% (n = 5) pacientes. A idade cronológica das mães foi expressa em anos e dividida em quatro faixas etárias de 5 anos cada; a saber, de 15 a 19 = 25,00% (n = 2) mães; 20 a 24 = 25,00% (n = 2) mães; 25 a 29 = 12,50% (n = 1) mãe e \geq a 30 anos de idade = 37,50% (n = 3) mães. A tabela de Babson and Brend's Chart mostrou, que os 8 (oito) pacientes estavam nutridos. O peso ao nascimento, dividido em menores ou iguais a 1,500g e maiores que 1,500g, apresentaram resultados de 25,00% (n = 2) e 75,00% (n = 6) pacientes, respectivamente. Os índices APGAR dos 8 pacientes foram relatados na Tabela 5.

Tabela 5 - Características gerais dos pacientes estudados na PCR.

VARIÁVEIS				
LOCAL DE NASCIMENTO	Pacientes (n)	(%)	Média	± DP
CG-MS	3	37,50	----	----
Outros	5	62,50	----	----
SEXO				
Masculino	4	50,00	----	----
Feminino	4	50,00	----	----
TIPO DE PARTO				
Vaginal	3	37,50	----	----
Cesáreo	5	62,50	----	----
IDADE GESTACIONAL (Semanas)				
≤ 37	3	37,50	30,00	4,60
> 37	5	62,50	40,30	1,70
IDADE CRONOLÓGICA DAS MÃES				
15 - 19	2	25,00	15,50	1,10
20 - 24	2	25,00	23,50	0,70
25 - 29	1	12,50	29,00	----
≥ 30	3	37,50	35,30	4,50
ESTADO NUTRICIONAL				
Nutrido	8	100,00	----	----
Desnutrido	0	0,00	----	----
PESO AO NASCIMENTO				
≤ 1,500g	2	25,00	950,00	0,30
> 1,500g	6	75,00	2.650,00	1,50
ÍNDICE DE APGAR				
{ 1° min < 7	6	75,00	5,00	2,80
{ 1° min > 7	2	25,00	9,00	----
{ 5° min < 7	2	25,00	6,00	----
{ 5° min > 7	6	75,00	8,50	1,10

A pesquisa referente ao uso inicial de antibióticos, aos que estavam sendo usados no momento da coleta, o tempo de internação dos pacientes e a evolução do quadro de morbidez, mostraram respectivamente, os seguintes resultados:

A ampicilina e a gentamicina foi a associação inicial mais comum e usada em 62,50% (n = 5) dos pacientes positivados para *Staphylococcus epidermidis*. Já as associações, ampicilina, gentamicina e metronidazole; ampicilina, gentamicina e amicacina; gentamicina e

amicacina, foram usadas em 12,50% (n = 1) dos 37,50% (n = 3) pacientes restantes, respectivamente.

No momento da coleta das amostras de sangue dos pacientes alvo que não responderam ao primeiro tratamento, verificou-se que o uso de piperacilina&tazobactam (tazocin)+amicacina, era a combinação de ATB mais frequente e foi usada em 37,50% (n = 3), dos 8 (oito) pacientes posteriormente positivados de *Staphylococcus epidermidis* pela PCR convencional; a piperacilina&tazobactam+vancomicina+meropenem, vem logo a seguir, usada em 25,00% (n = 2) desses pacientes; e por último, a piperacilina&tazobactam+amicacina+vancomicina; piperacilina&tazobactam+amicacina+metronidazole e a piperacilina&tazobactam+amicacina+eritomicina+vancomicina, apareceram como prescrição para cada 12,50% (n = 1) dos 37,50% (n = 3) pacientes restantes.

Os períodos que fizeram referência aos dias de internação foram divididos em três espaços de 45 a 45 dias. Até os 45 dias iniciais, houve relato de 75,00% (n = 6) pacientes; até noventa dias não houve relato algum e até 135 (cento e trinta e cinco dias) houve 25,00% (n = 2).

A evolução do quadro de morbidez para óbito ocorreu em 25,00% (n = 2) dos pacientes. Vide Tabela 6.

Tabela 6 – Relação dos ATB iniciais e os ATB em uso no momento da coleta, dias de internação e evolução do quadro de morbidez para óbito.

ATB/INICIAL	Pacientes (n)	(%)	Média	± DP
Ampicilina+Gentamicina	5	62,50	----	----
Ampicilina+Gentamicina+Metronidazole	1	12,50	----	----
Ampicilina+Gentamicina+Amicacina	1	12,50	----	----
Gentamicina+Amicacina	1	12,50	----	----
ATB/USO				
Piperacilina&Tazobactam+Amicacina	3	37,50	----	----
Piperacilina&Tazobactam+Vancomicina+Meropenem	2	25,00	----	----
Piperacilina&Tazobactam+Amicacina+Vancomicina	1	12,50	----	----
Piperacilina&Tazobactam+Amicacina+Metronidazole	1	12,50	----	----
Piperacilina&Tazobactam+Amicacina+Eritromicina+Vancomicina	1	12,50	----	----
DIAS DE INTERNAÇÃO				
até 45 dias	6	75,00	30,20	8,90
até 90 dias	----	----	----	----
até 135 dias	2	25,00	117,50	24,70
EVOLUÇÃO				
Alta	6	75,00	----	----
Óbito	2	25,00	----	----

Procedimentos considerados invasivos tais como o uso de cateteres, ventilação mecânica, CPAP ou mesmo fazer o uso de nutrição parenteral foram pesquisados e os resultados mostraram que 75,00% (n = 6) fizeram uso de algum tipo de cateter seja ele venoso, arterial ou central de inserção periférica (PICC) e 25,00% (n = 2) não fizeram.

Quanto à ventilação mecânica, todos os pacientes precisaram; 100,00% (n = 8).

Quanto ao uso do CPAP, foi necessária em 75,00% (n = 6) pacientes; 25,00% (n = 2) não precisaram.

Quanto a nutrição parenteral, 87,00% (n = 7) pacientes fizeram uso e apenas 12,50% (n = 1) não o fez. Vide Tabela 7.

Tabela 7 – Procedimentos invasivos utilizados em pacientes analisados.

CATETERES V/A ou PICC	Pacientes	(%)
	(n)	----
Sim	6	75,00
Não	2	25,00
VENTILAÇÃO MECÂNICA		
	----	----
Sim	8	100,00
Não	----	----
CPAP		
	----	----
Sim	6	75,00
Não	2	25,00
NUTRIÇÃO PARENTERAL		
	----	----
Sim	7	87,50
Não	1	12,50

5.DISSCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

A sepse neonatal (SN) sem sombra de dúvida é uma importante causa de morbidade e mortalidade em RNs, principalmente os prematuros de muito baixo peso. (JARVIS, 1987). Se por um lado, esses pacientes tiraram vantagens e ganharam benefícios com todos os avanços da medicina na área pediátrica que lhes proporcionou um ganho considerável em sobrevivência, garantindo nascimentos ainda mais precoces e por vezes, acompanhados por alguns quadros marcantes de desnutrição, por outro, para esses pacientes ímpares, exige-se que sua permanência no ambiente de UTI neonatal seja estendida por um maior período de tempo. E são na maioria das vezes, nestes períodos de permanência extra, que se sujeitam a eventuais infecções por microrganismos oportunistas, seja por contato direto, seja por procedimentos invasivos regularmente realizados neste tipo de ambiente hospitalar.

Muitos microrganismos estão associados às infecções bacterianas em UTI neonatal, tais como *Pseudomonas aureoginosa*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* Plasma coagulase negativos (ECN), *Escherischia coli*, *Streptococcus agalactiae*, sendo esses dois últimos os de maior relevância relatados (IREGBU *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ-WEBER *et al.*, 2003).

Este trabalho se direcionou a um microrganismo incluso no grupo dos ECN, também importante na sepse neonatal cuja incidência é pouco conclusiva e que tem emergido no sentido de se tornarem dentre os microrganismos infecciosos, o mais evidenciado em UTI Neonatal (PATRICK, 1990); o *Staphylococcus epidermidis*.

Os resultados das hemoculturas de todos os pacientes pesquisados foram obtidos a partir do banco de dados do Hospital Universitário da UFMS cujos dados são oriundos do Laboratório de Análises Clínicas (LAC-UFMS). A escolha da hemocultura se deveu ao fato de ser considerado padrão ouro no diagnóstico da sepse, embora sejam levantadas questões quanto a sua eficiência devido a seu inconveniente tempo de resposta (24 a 72 horas), ser considerado demasiadamente longo (HONEST *et al.*, 2006; BROZANSKI *et al.*, 2006).

Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi possível, além da redução do tempo de resposta, o desenvolvimento de testes com 100% de sensibilidade e especificidade ante o(s) agente(s) para o qual(ais) seus *primers* foram desenhados e conseqüentemente para o avanço diagnóstico (YADAV *et al.*, 2005; JORDAN; DURSO, 2000). Por esta razão, foi requisitada sua utilização em suas duas modalidades, convencional e em tempo real; sendo esta última mais específica e ainda, além de utilizar um menor volume

de amostra, que no caso da hemocultura, se insatisfatória, poderia justificar um erro de positividade/negatividade. A qPCR ainda proporciona um menor risco de contaminação devido à sua automação, além de oferecer ainda resultados mais rápidos e trabalhar com um número maior de amostras do que na PCR convencional (TONDELLA et al., 2002).

Foi estudada uma relação entre os resultados das hemoculturas gerados pelo LAC e obtidos a partir do banco de dados do NUH-UFMS, com os resultados da PCR convencional e os da qPCR de todos os pacientes com “suspeita de sepse” compreendidos entre as datas de 07/12/2011 a 08/08/2012, perfazendo um período de aproximadamente 9 (nove) meses, que não responderam ao primeiro tratamento instituído, para verificarmos se houve reciprocidade entre os resultados entre os três métodos utilizados.

Houve uma concordância entre as amostras 7 e 9 nos três métodos, uma discordância na amostra 4 onde é positiva para *Staphylococcus epidermidis* na hemocultura e negativa nas PCR, Convencional e em Tempo real. As amostras 30 e 34 positivaram de *Staphylococcus epidermidis* na PCR Convencional e qPCR como já descrito, porém, negativaram na hemocultura que por outro lado, mostrou esses resultados positivos de *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus haemolyticus* respectivamente.

De uma maneira mais ampla, os resultados da Tabela 3 mostram que, de acordo com alguns dos resultados da hemocultura (4, 27, 29 e 42), positivos de *Staphylococcus epidermidis* e negativos nos demais métodos, podem ser sugestivos de contaminação da amostra, enquanto que em outros (16, 18, 43 e 45), negativos de *Staphylococcus epidermidis* na hemocultura e positivos nos demais métodos, conota uma passividade de que, possa ter ocorrido no momento da colheita, um volume inadequado de sangue para a realização dos exames.

Enfim, também é bom se ter em vista que dentre essas amostras, somente as amostras 16, 18, 34, 43 e 45, além das amostras 7, 9 e 30 não supracitadas, são realmente objetivas ao estudo proposto, contudo, não há nada que impeça o início de outro trabalho a partir dos dados aqui obtidos.

Algumas das variáveis que serão citadas a seguir, foram representativas de situações reais quando em seu tempo demonstraram condições em que o paciente esteve subordinado ao ambiente físico da UTI neonatal, permanecendo sob estas condições por todo o período de estadia, ficando sujeito à aquisição ou não de uma infecção oportunista.

Salientamos que daqui em diante, todo o exposto ou discutido é inerente aos resultados positivos obtidos pelos métodos da PCR Convencional e qPCR.

De acordo com o local de nascimento dos pacientes, descobriu-se que a maior parte nasceu fora de Campo Grande - MS e é passivo de já terem sido admitidos colonizados, enquanto que outra, por sua vez, deva ter sido colonizada no ambiente da UTI neonatal; se houve colonização cruzada, não se pode determinar.

Com relação ao sexo, houve uma igualdade entre os dois, onde parece não haver relação alguma com infecção, figurando mais como informação; ainda, de acordo com o modo pelo qual nasceram, pode-se afirmar que dos pacientes com IN, sua maior parte nasceu por parto cesáreo.

No ser humano, a idade gestacional é considerada normal quando compreende 40 semanas cheias ou 9 meses completos. Um RN que tenha nascido nestas condições é considerado nascido a termo. Por outro lado, um RN que tenha nascido antes deste período será considerado pré-termo ou ainda prematuro. A prematuridade é caracterizada pelo nascimento compreendido em um período de gestação inferior a 37 semanas, segundo o método de New Ballard Score (NBS-1991).

O método é bastante simples e consiste na soma de 12 critérios que representa a maturação neuromuscular e física do feto: Maturidade Neuromuscular - postura, ângulo de flexão do punho, retração do braço, ângulo poplíteo, sinal do xale, manobra de calcanhar à orelha. Maturidade Física – pele, lanugo, superfície plantar, glândula mamária, olhos/orelhas, genital - masculino e genital – feminino.

Quando comparada à grade na folha de contagem, a pontuação obtida denota a idade gestacional de acordo com a maturidade do RN.

A idade gestacional das mães incluídas nesse estudo foi representada por duas distribuições de idades que variaram entre 22 a 37 e outra de 37 a 41 semanas.

As idades cronológicas das mães estão compreendidas entre 15 a 39 anos e o peso de seus RNs de 725g a 3280g.

Como critério de nutrição ou subnutrição, a base foi a nova carta de crescimento para bebês pretermo: *Babson and Benda's chart*, atualizada com dados recentes e com novo formato, cuja versão completa do artigo poderá ser encontrada online no endereço eletrônico: <http://www.biomedcentral.com/1471-2431/3/13>.

Foi levada em consideração, a relação existente entre a idade gestacional (expressa em semanas) da mãe e o peso da criança medido na hora de seu nascimento; todos os positivados nas PCR se encontravam nutridos.

O índice de APGAR se baseou somente nos valores das avaliações do 1º e 5º minuto, sendo relacionados como menores ou maiores que 7 (sete); isto por ser um valor limítrofe e já indicativo de que o bebê apresentava uma asfixia discreta ao nascer. Valores acima de 8 (oito), sugerem bebês nascidos em ótimas condições. A maioria dos pacientes mesmo com avaliações abaixo de 7 no primeiro minuto, conseguiram se recuperar no quinto; uma porção mínima dos pacientes não conseguiram se restabelecer mostrando que não se recuperaram ou se recuperaram muito pouco e se mantiveram com avaliações insatisfatórias.

A antibioticoterapia inicial de quase todos pacientes positivos foi basicamente ampicilina + gentamicina; padrão, seguida desse par associado a outro ATB ou ainda, um dos dois, associado a outro.

Na antibioticoterapia em uso no momento da coleta, predomínio da combinação Piperacilina+Tazobactam+Amicacina, seguida de combinações da Piperacilina+Tazobactan com um ou mais de um ATB foram evidenciadas.

O tempo de internação variou de 11 a 135 dias, onde, durante parte desse período, mais da metade desses pacientes usaram pelo menos um tipo de cateter, todos precisaram de ventilação mecânica, quase todos precisaram do aparelho de CPAP e a maioria fez uso de nutrição parenteral e também onde dois deles tiveram seus quadros de morbidez evoluídos para óbito, representando 4,4% dos colonizados por *Staphylococcus epidermidis*.

Fatores tais como índice neutrofílico e número reduzido de plaquetas, podem ter funcionado como indicativos de IN, no entanto, dos pacientes aqui relacionados, praticamente todos apresentaram índice neutrofílico abaixo do valor limite e somente uma pequena parte apresentou plaquetopenia ou plaquetose (anexo iv).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 – CONCLUSÕES

Perante os resultados apresentados no presente estudo, concluímos que:

- ❖ Foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), dentro de sequência alvo conservada do genoma de *Staphylococcus epidermidis* para PCR Convencional e qPCR.
- ❖ A PCR Convencional foi capaz de detectar o genoma de *Staphylococcus epidermidis* em algumas das amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes alvo.
- ❖ A PCR em tempo real tanto detectou o genoma positivo para *Staphylococcus epidermidis* como fez sua quantificação absoluta nas amostras de sangue periférico dos pacientes.
- ❖ Dos pacientes positivados para *Staphylococcus epidermidis* na hemocultura de rotina, parte tiveram seus quadros de morbidez evoluídos para cura e houve caso que evoluiu para óbito. Dos pacientes positivados para *Staphylococcus epidermidis* na PCR Convencional, mais de um caso teve seu quadro de morbidez evoluído para óbito, sendo que entre eles, já havia referência feita pela hemocultura. A qPCR, corroborou os resultados da PCR Convencional.
- ❖ A análise das variáveis de acordo com os resultados da qPCR mostrou que de acordo com o local de nascimento, houve um menor número de pacientes que nasceram em Campo Grande; metade é masculina; uma menor parte nasceu de parto normal; quanto as idades gestacionais, a maior parte nasceu prematura; a maior parte das mães tinham mais de trinta anos; todos os RNs estavam nutridos; a maioria possuía peso normal; quanto ao índice de apgar, somente dois pacientes não se recuperaram no quinto minuto e mantiveram avaliações insatisfatórias.
- ❖ A combinação predominante na antibioticoterapia inicial foi ampicilina+gentamicina.
- ❖ A maioria dos pacientes ficou no máximo um mês e meio internados; a evolução do quadro de morbidez para mortalidade foi limitante; a maior parte dos pacientes internados fez uso de algum tipo de cateter; todos pacientes usaram ventilação mecânica; a maioria precisou de CPAP; praticamente todos precisaram de nutrição parenteral; a maior parte dos pacientes teve índice neutrofílico baixo e também, apresentaram valores intermediários na contagem de plaquetas.

7. REFERÊNCIAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA – Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde - Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária. SEPN 515, Edifício Ômega. Bloco B, Brasília (DF). 1ª Ed., 2004. Internet: www.anvisa.gov.br

BERGEY'S. **Manual of Determinative Bacteriology**. M.D. WILLIAMS & S.T. WILKINS, 9 ed., Baltimore, 1994.

BHAT MA, Bhat JI, Kawoosa MS, Ahmad SM, Ali SW (2009) Organism-specific platelet response and factors affecting survival in thrombocytopenic very low birth weight babies with sepsis. *J Perinatol* 29:702–708

BIZARRO, M. J.; RASKIND, C.; BALTIMORE, R. S.; GALLAGHER, P. G. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. **Pediatrics**, v. 116, n. 3, p. 595-602, 2005.

BROZANSKI, B. S.; JONES, J. G.; KROHN, M. J.; JORDAN, J. A. Use of polymerase chain reaction as a diagnostic tool for neonatal sepsis can result in a decrease in use of antibiotics and total neonatal intensive care unit length of stay. **Journal of Perinatology**, v. 26, n. 11, p. 688-692, 2006.

CHEUNG GY OTTO M, 2010, B. S.; Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children. *Curr Opin Infect Dis*. 2010; 23(3): 208-216

CLAWSON CC, White JG (1971) Platelet interaction with bacteria. II. Fate of bacteria. *Am J Pathol* 65:381–398

COGNASSE F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O (2005) Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 83:196–198

CORDERO L. ; SANANES M. ; LEONA W. A. . Bloodstream infections in a neonatal intensive-care unit: 12 years experience with an antibiotic control program. *Infect control Hosp Epidemiol* 1999; 20:242-6.

(Continua)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTERTON *et al.*, Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 21 May 1999;Vol. 284 no. 5418 pp. 1318-1322 DOI: 10.1126/science.284.5418.1318

CUNHA M. L. R. S. ; LOPES C. A. M. ; RUGOLO L. M. S. S. ; CHALITA L. V. A. S. . Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de RNs. 0021-7557/02/78-04/279 ; *Jornal de Pediatria* - Vol. 78, Nº4, 2002.

EASTICK K. ; LEEMING J. P. ; BENNETT D. ; MILLAR M. R. . Reservoirs of coagulase negative staphylococci in preterm infants. ; *Archives of Disease in Childhood* 1996; 74: F99-F104 ; doi: 10.1136/fn.74.2.F99.

GAYNES R. P. ; EDWARDS J. R. ; JARWIA W.R. et al. . National Nosocomial Infections Surveillance System. Nosocomial infection among neonates in high-risk nurseries in the United States. *Pediatrics* 1996;98:357-61.

GORDON Y. C. CHEUNG^a and MICHAEL OTTO^a a Laboratory of Human Bacterial Pathogenesis, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, 33 North Drive, Building 33, Room 1W10A, Bethesda, MD, 20892

GRIMBERG, J.; NAWOSCHIK, S.; BELLUSCIO, L.; MCKEE, R.; TURCK, A.; EISENBERG, A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 20, p. 83-90, 1989.

HARKER LA, FINCH CA (1969) Thrombokinetics in man. *J Clin Invest* 48:963–1969

HONEST, H.; SHARMA, S.; KHAN, K. S. Rapid tests for Group B *Streptococcus* colonization in laboring women: a systematic review. **Pediatrics**, v. 117, n. 4, p. 1055-1066, 2006.

(Continuação)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IREGBU, K. C.; ELEGBA, O. Y.; BABANIYI, I. B. Bacteriological profile of neonatal septicaemia in a tertiary hospital in Nigéria. **African Health Sciences**, v. 6, n. 3, p. 151-154, 2006.

JARVIS W. R. . Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. *The Pediatr Infect Dis J*, 1987; 6 (4):344-51.

JORDAN, J. A.; DURSO, M. B. Comparison of 16S rRNA gene PCR and Bactec 9240 for detection of neonatal bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2574-2578, 2000.

J. W. COSTERTON et al., *Science* 21 May 1999: Vol. 284 no. 5418 pp. 1318-1322
DOI: 10.1126/science.284.5418.1318

KE, D.; MÉNARD, C.; PICARD, F. J.; BOISSINOT, M.; OUELLETTE, M.; ROY, P. H.; BERGERON, M. G. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B Streptococci. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 324-331, 2000.

C. MARCONI *et al.* STANDARDIZATION OF THE PCR TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF DELTA TOXIN IN *Staphylococcus* spp.. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2005, 11, 2, p. 122

MEREMIKWU, M. M.; NWACHUKWU, C. E.; ASUQUO, A. E.; OKEBE, J. U.; UTSALO, S. J. Bacterial isolates from blood cultures of children with suspected septicaemia in Calabar, Nigeria. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 110-114, 2005.

MOVAHEDIAN, A.; MONIRI, R.; MOSAYEBI, Z. Bacterial culture of neonatal sepsis. **Iranian Journal of Public Health**, v. 35, n. 4, p. 84-89, 2006.

(Continuação)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NELSON A. ; HULTENBY K. ; HELL E. ; RIEDEL H.M. ; BRISMAR H. ; FLOCK J. I. ; LUNDAHL J. ; GISKE C. G. ; MARCHINI G. Staphylococcus epidermidis isolated from newborn infants express pilus-like structures and are inhibited by the cathelicidin-derived antimicrobial peptide LL37. *Pediatr Res.* 2009 Aug;66(2):174-8.

NESIN M. ; PROJAN S. J. ; KREISWIRTH B. ; BOLT Y. ; NOVICK R. P. . Molecular epidemiology of Staphylococcus epidermidis blood isolates from neonatal intensive care unit patients. *Journal of Hospital Infection* (1995) 31, 11 1-1 21.

NEW BALLARD SCORE, expanded to include extremely premature infants. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. *J Pediatr.* 1991 Sep;119(3):417-23.

PATRICK C. C. . Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. *J Pediatr* 1990;116:497-501.

PFAFFL MW, Hageleit M: Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechn Lett* 2001, 23:275-282.

QU Y. ; DALEY A. J. ; ISTIVAN T. S. ; GARLAND S. M. ; DEIGHTON M. A. . Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm

formation. Qu et al. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2010, 9:16. Disponível em <http://www.ann-clinmicrob.com/content/9/1/16>.

RODRÍGUEZ-WEBER, M. A.; LOPEZ-CANDIANI, C.; ARREDONDO-GARCÍA, J. L.; GUTIÉRREZ-CASTRELLÓN, P.; SANCHEZ-ARRIAGA, F. Morbilidad y mortalidad por sepsis neonatal en un hospital de tercer nivel de atención. **Salud Publica de Mexico**, v. 45, n. 2, p. 90-95, 2003.

(Continuação)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SAMBROOK, J.; FRITSCH, D. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SANTOLAYA ME, Alvarez AM, Aviles CL, Becker A, Cofre J, Enriquez N, O’Ryan M, Paya E, Salgado C, Silva P, Tordecilla J, Varas M, Villarroel M, Viviani T, Zubieta M (2002) Prospective evaluation of a model of prediction of invasive bacterial infection risk among children with cancer, fever, and neutropenia. *Clin Infect Dis* 35:678–683

SCHELD WM, Valone JA, Sande MA (1978) Bacterial adherence in the pathogenesis of infective endocarditis: interaction of dextran, platelets, & fibrin. *J Clin Invest* 61:1394–1404

SCHELEIFER K H, Kloos W E (1975) Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 25:5&6 1.

TONDELLA, M. L. C.; TALKINGTON, D. F.; HOLLOWAY, B. P.; DOWELL, S. F.; COWLEY, K.; GABARRO, M. S.; ELKIND, M. S.; FIELDS, B. S. Development and evaluation of real-time PCR-Based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 575-583, 2002.

VILLARI P. ; LACUZI L.; TORRE L.; SCARCELLA A. . Molecular epidemiology as an effective tool in the surveillance of infections in the neonatal intensive care unit. *J Infect* 1998;37:274-81.

(Conclusão)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VINTER DW, BurkelWE, Wakefield TW, GrahamLM, Whitehouse WM Jr, Stanley JC, Ford JW(1984) Radioisotope-labeled platelet studies and infection of vascular grafts. *J Vasc Surg* 6:921–923.

WHITE JG (1972) Platelet morphology and function. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Rundles RW (eds) *Hematology*. McGraw-Hill, New York, pp 1023–1039

YADAV, A. K.; WILSON, C. G.; PRASAD, P. L.; MENON, P. K. Polymerase chain reaction in rapid diagnosis of neonatal sepsis. **Indian Pediatrics**, v. 42, n. 7, p. 681-685, 2005.

8. ANEXOS

ANEXO I



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS



Carta de Aprovação

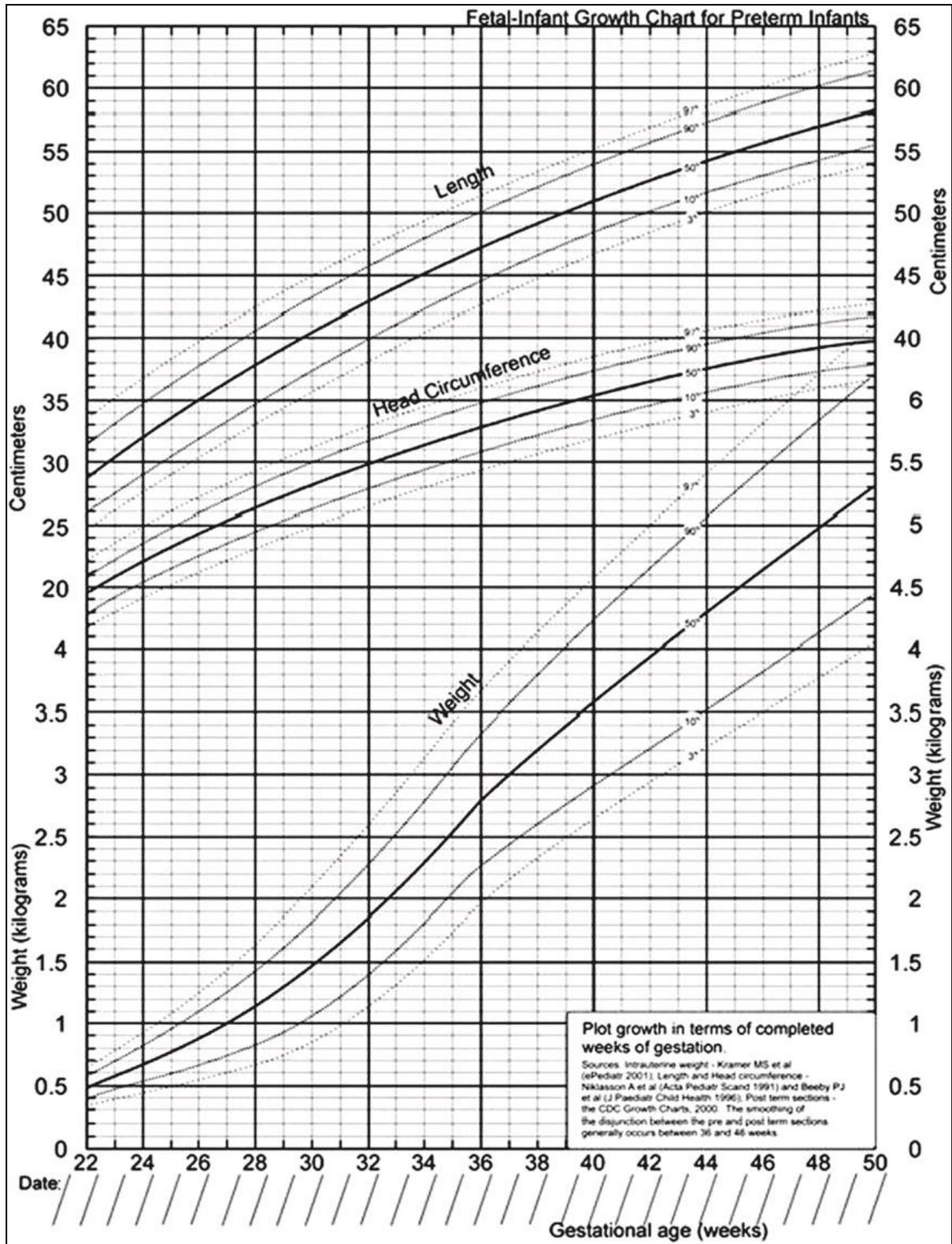
O protocolo nº 2228 CAAE 0362.0.049.000-11 do Pesquisador Reynaldo Bueno Junqueira Reis intitulado “Prevalência de DNA genômico para *Staphylococcus epidermidis* plasmó coagulase negativa em neonatos pré-termo maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção”, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 9 de novembro de 2011, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.


 Ernesto Antônio Eggenstein Filho
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS
 2ª via 1º/2/2013

Campo Grande, 9 de novembro de 2011.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
 fone 0XX67 345-7187

ANEXO II



ANEXO IV

Resultados dos índices neutrofílico e contagem de plaquetas totais.

ÍNDICE NEUTROFÍLICO	Pacientes (n)	(%)	Média	DP
> 0,2	1	112,5	0,3	0,3
< 0,2	7	87,5	0,1	0,01
NÚMERO DE PLAQUETAS TOTAIS				
< 150,000 mm ³	2	25,0	87,500	60,1
> 450,000 mm ³	2	25,0	624,000	165,5
150,000 mm ³ a 450,000 mm ³	4	50,0	255,500	89,6

9. APENDICES

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Normativa Brasileira – resolução 196/96 do CNS/MS)

Este documento faz o registro e o convite a você, pai e/ou responsável pelo (s) paciente _____ (s) internado (s) na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do NHU/UFMS a participar da pesquisa científica com suspeita de infecção, denominada **DETECÇÃO DE DNA DE *Staphylococcus epidermidis* EM SANGUE DE RECÉM- NASCIDOS PRÉ-TERMO, ATRAVÉS DE PCR CONVENCIONAL E QUANTITATIVO.**

Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver.

O presente trabalho será conduzido com o intuito da detecção ou não de um microrganismo chamado *Staphylococcus epidermidis*, bactéria comensal da pele e mucosas humanas. Essas bactérias quando acometem o RN podem causar infecção importante e por esse motivo muito tem preocupado os médicos.

O objetivo principal além do diagnóstico é o prognóstico precoce visando o tratamento mais rápido e específico aumentando assim as chances de um bom desenvolvimento de tratamento e cura.

Os critérios para seleção serão os pacientes que não estão respondendo ao tratamento preconizado.

Dos pacientes, será praticada a coleta de sangue de uma maneira oportunista, compartilhando do material já colhido na rotina previamente identificada. Todo o material usado na pesquisa será posteriormente descartado.

Este estudo está sendo realizado pelo biomédico Reynaldo Bueno Junqueira Reis lotado no Laboratório de Diagnóstico Molecular em Pediatria sob a orientação do Prof. Dr. Almir de Sousa Martins.

As informações coletadas terão total confiabilidade e privacidade estando garantida a preservação do anonimato dos participantes do estudo; quando da sua divulgação.

Sua participação é voluntária, não tem fins lucrativos e isenta de ônus. Você pode sair do estudo quando desejar. Se concordar em participar do estudo, e não tiver nenhuma dúvida sobre a sua realização, por gentileza, assine o termo de consentimento (nome completo).

Eu _____ declaro que estou ciente dos termos aqui apresentados e autorizo a inclusão do meu filho (a) na pesquisa.

Campo Grande, _____ de _____ de 2011.

Obs. Este documento foi feito em duas vias de igual teor sendo uma via dos pais ou responsáveis pelo paciente sujeito da pesquisa e outro para o pesquisador. Os pais ou responsáveis poderão ter acesso a informações adicionais no momento que desejarem contatando o pesquisador.

Pesquisador: Reynaldo Bueno Junqueira Reis
– Telefone para contato: (67) 9111-1221

CEP: (67) 3345-7186

APÊNDICE II**FICHA DE COLETA DE DADOS**

(DETECÇÃO DE DNA DE *Staphylococcus epidermidis* EM SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO, ATRAVÉS DE PCR CONVENCIONAL E QUANTITATIVO).

RN de: _____ RG: _____
 Naturalidade: _____ DF: _____
 Idade Gestacional: _____ Idade Cronológica: _____ Data de
 Internação: _____
 Peso: _____ Índice de APGAR: _____ Data de coleta: _____
 Sexo: _____
 Nome do Bebê: _____ Data de Nascimento: _____
 Pai: _____ Mãe: _____
 Tipo de parto: _____ Estado nutricional: _____
 Hemograma (Relação de neutrófilos I/T): _____
 Hemocultura: _____ PCR: _____
 Uso de antntimicrobiano: _____
 Antimicrobiano previamente usado: _____
 Nº da amostra: _____

S/N	PROCEDIMENTO:	NÚMERO DE DIAS
	PICC (cateter central de inserção periférica)	
	Cateter vascular Venoso	
	Cateter vascular arterial	
	Cateter umbilical venoso	
	Cateter umbilical arterial	
	CPAP (pressão positiva contínua na via aérea)	
	Ventilação mecânica	
	Nutrição parenteral	
	Internação na UTI	

Observações:

Campo Grande, _____ de _____ de _____.

ANEXO III

File: Plate1 - Almir 10-10-2012 S. epid.e.sds (Absolute Quantification)
 User: Reynaldo
 Plate Type: Absolute Quantification
 PCR Volume: 25 uL

Comments

ABI Prism 7000 SDS v1.1

Stage	Temperature	Time	Repeat	Ramp Rate	Auto Increment
1	50.0 °C	2:00	1	100	
2	95.0 °C	10:00	1	100	
3	95.0 °C	0:15	40	100	
	60.0 °C	1:00		100	
	60.0->95.0 °C	20:00		Dissociation	

9600 Mode Emulation

Analysis Methods:

Delta Rn

Detector Name	Reporter	Quencher	Threshold	Baseline Start	Baseline End
Sybr Green	SYBR	(none)	0.100595	10	20

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered
B7	07	Sybr Green	Unknown	34.04		7.94e-017			
B9	09	Sybr Green	Unknown	32.54		5.80e-015			
C10	16	Sybr Green	Unknown	32.51		6.32e-015			
C12	18	Sybr Green	Unknown	32.70		3.63e-015			
E12	30	Sybr Green	Unknown	33.77		1.70e-016			
F10	34	Sybr Green	Unknown	32.98		1.65e-015			
H7	43	Sybr Green	Unknown	32.81		2.68e-015			
H10	45	Sybr Green	Unknown	31.89		3.74e-014			