

KELLY LOPES DE ARAÚJO APPEL

**ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA GENÔMICO DE DIFERENTES
BACTÉRIAS EM SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO E
TERMO COM RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANA**

**CAMPO GRANDE
2015**

KELLY LOPES DE ARAÚJO APPEL

**ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA GENÔMICO DE DIFERENTES
BACTÉRIAS EM SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO E
TERMO COM RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares

**CAMPO GRANDE
2015**

FOLHA DE APROVAÇÃO

KELLY LOPES DE ARAÚJO APPEL

ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA GENÔMICO DE DIFERENTES BACTÉRIAS EM SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO E TERMO COM RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado_____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Durval Batista Palhares
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS

Prof. Dr. Almir de Sousa Martins
Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG

Prof.^a Dr.^a Anna Maria Duarte Miglioli
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS

Dra. Paula Cristhina Niz Xavier
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu Deus, Senhor e Mantenedor de minha vida. Sem Ele, não poderia chegar ao fim dessa trajetória profissional. Sei que foi seu desejo eu conseguir o título de Mestre e trabalhar no ensino e pesquisa para melhorar a saúde para onde eu for.

Ao meu esposo amado Charles, pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você tenho me sentido mais viva de verdade. Obrigada pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada etapa da pesquisa.

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim em todas as etapas dessa caminhada acadêmica. Mãe, seu incentivo e apoio foi que deram em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Maninha Kênia, suas palavras firmes de seguir em frente apesar dos percalços foram fundamentais. Daiane, seu cuidado comigo foi motivador. Meu filho Júnior, todos os meus esforços, sempre foram para influenciá-lo e ajudá-lo a superar toda e qualquer dificuldade profissional, você sempre será meu motivador e alegria nessa vida.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhorou tudo o que tenho produzido na vida.

Ao Curso de Pós-Graduação da UFMS, e às pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desses anos.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

AGRADECIMENTOS

A produção de conhecimento, embora exija momentos de solidão, é impossível sem a participação de colegas, mestres, amigos, parceiros, enfim, das pessoas que nos rodeiam e dividem conosco alegrias, ansiedade e vicissitudes. Entre estas, não posso deixar de nomear aquelas que me acompanharam mais de perto neste desafio.

Ao Professor Dr. Durval Batista Palhares pela orientação e pela cumplicidade e empenho na discussão e problematização do embrião do meu primeiro projeto e pela disponibilidade de acompanhar o trabalho.

A Dr.^a Paula Xavier e Dr. Almir Martins por estar sempre presente nos momentos difíceis de análise na Biologia molecular e credibilidade no desenvolvimento da pesquisa.

A Ana Maria Duarte Miglioli e Dra. Carmen Silvia Martimbianco por sempre confiar nos resultados esperados da pesquisa.

A Dra. Silvia Nakashita e a todas as companheiras das Unidades Neonatais dos Hospitais que participaram da pesquisa pela cumplicidade e auxílio no desenvolvimento do Projeto no aspecto coleta de dados.

Aos meus colegas e professores do Curso de Pós-Graduação pelas trocas e companheirismo.

E o que dizer a vocês? Dr. Albert, Dra. Renata, Natan, Juliana, Rose... Obrigada pela paciência, pelo incentivo, pela força e principalmente pelo carinho. Valeu a pena toda distância, todo sofrimento, todas as renúncias... Valeu a pena esperar...!

“Não temas, porque eu sou contigo;
Não te assombres, porque eu sou teu Deus;
Eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com
a minha destra fiel.” Isaías 41:10
(Bíblia Sagrada, 2007, p. 898)

RESUMO

Appel KLA. Associação da presença de DNA genômico de diferentes bactérias em sangue de recém-nascidos pré-termo e termo com ruptura prematura de membrana. Campo Grande; 2015. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A associação de ruptura prematura de membranas (RPM) e infecção neonatal precoce tem sido alvo de vários estudos, pois os microrganismos responsáveis pela infecção neonatal relacionada com RPM são aqueles encontrados na microbiota vaginal normal e patogênica das gestantes. Assim, para avaliar a associação da RPM com a presença do DNA genômico de diferentes bactérias em recém-nascidos (RNs) pré-termo e a termo foi realizado um estudo observacional, transversal, com RNs provenientes de mães com diagnóstico de RPM. Amostras de sangue provenientes de 101 RNs foram analisadas pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional para detecção do DNA genômico bacteriano e PCR em tempo real para DNA genômico das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae*. A associação e comparação do tempo de ruptura de membrana e presença de DNA genômico das bactérias foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado, Mann-Whitney e Fisher. Os RNs selecionados para o estudo estavam em antibioticoterapia e apresentaram um ou mais sinais clínicos característicos de infecção neonatal. O tempo médio de ruptura de membrana nas gestações pré-termo foi de 72,87 $\pm$ 101,85 horas e nas gestações a termo foi de 48,70 $\pm$ 84,14 horas. Embora não tenha sido detectada estatisticamente associação entre o tempo de ruptura das membranas com a idade gestacional (pré-termo e a termo) e com a presença do DNA genômico das bactérias, sugere fator importante de sepse neonatal por RPM. Independentemente da idade gestacional, o DNA genômico bacteriano foi detectado em 93,1% das amostras, sendo que a bactéria *Escherichia coli* foi a mais prevalente (64,3%) seguida pela *Listeria monocytogenes* (46,5%), *Streptococcus agalactiae* (19,8%) e *Klebsiella pneumoniae* (2,0%). Estes resultados são relevantes do ponto de vista clínico, pois fornecem informações importantes acerca dos microrganismos patogênicos responsáveis pela sepse neonatal.

PALAVRAS-CHAVE: amniorrexe prematura, infecção neonatal, PCR, gestação pré-termo, gestação a termo.

ABSTRACT

Appel KLA. Presence of genomic DNA of different bacteria in the blood of preterm and term newborns associated with premature rupture of membranes. Campo Grande; 2015. [Dissertation – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Premature rupture of membranes (PROM) associated with premature neonatal infection has been the aim of many studies. The microorganisms responsible for neonatal infections related to PROM are those found in normal vaginal microbiota and pathogenesis of pregnant women. Therefore, to evaluate the association of PROM and the presence of genomic DNA of different bacteria in preterm and term newborns (NBs), a transversal observational study was conducted on infants of mothers diagnosed with premature rupture of membranes. Blood samples from 101 newborns were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) technique conventional for detection of bacterial genomic DNA and PCR in real time to genomic DNA of the bacteria *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Listeria monocytogenes*. The combination and comparison of the time of membrane rupture and the presence of genomic DNA of the bacteria were analyzed by chi-square, Mann-Whitney and Fisher. Infants eligible for the study were those undergoing antibiotic therapy presenting one or more clinical signs characteristic of neonatal infection. The average time of membrane rupture in preterm pregnancies was 72.87 ± 101.85 hours and a term pregnancy was 48.70 ± 84.14 hours. No association between the time of membrane rupture and gestational age (preterm and term) and with the presence of genomic DNA of bacteria was found. Apart from the gestational age, bacterial genomic DNA was detected in 93.1% of samples, where *Escherichia coli* was the most prevalent (64.3%) followed by *Listeria monocytogenes* (46.5%), *Streptococcus agalactiae* (19.8%), and *Klebsiella pneumoniae* (2.0%). These results are relevant from a clinical point of view, because they provide important information about the pathogens responsible for neonatal sepsis.

KEY WORDS: premature amniorrhexis, neonatal infection, PCR, preterm pregnancy, term pregnancy

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Caracterização dos fragmentos da PCR dos microrganismos estudados.....	34
TABELA 2 –	Características referentes ao escore de Apgar, sexo e tipo de parto dos recém-nascidos em função do tempo de ruptura prematura das membranas.....	38
TABELA 3 –	Classificação de idade gestacional (pré-termo e a termo) em função do tempo de ruptura prematura das membranas (horas) e a presença de bactérias.....	44
TABELA 4 –	Classificação do tempo de ruptura prematura das membranas (horas) em relação a presença de bactérias em recém-nascidos pré-termo e a termo.....	45
TABELA 5 –	Características hematológicas dos recém-nascidos em função do tempo de ruptura prematura das membranas (RPM).....	49
TABELA 6 –	Relação I/T e o escore de Apgar dos recém-nascidos e presença de DNA das diferentes bactérias associadas à infecção neonatal.....	50
TABELA 7 –	Associação do DNA genômico em função do tempo de ruptura de membranas amnióticas e febre materna e ITU nas gestações pré-termo e a termo.....	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Sinais clínicos apresentados pelos recém-nascidos pré-termo e a termo com suspeita de infecção neonatal em função dos tempos de ruptura das membranas amnióticas.....	37
FIGURA 2 –	Resultados positivos das amostras de sangue dos recém-nascidos utilizadas para detecção do DNA genômico bacteriano por PCR utilizando primer universal RW01. Amostras de 1 a 17.....	39
FIGURA 3 –	Resultados típicos obtidos para a amplificação do fragmento alvo para a <i>Escherichia coli</i> por meio da PCRtr. Curva para <i>Escherichia coli</i> e amostras negativas abaixo do Threshold.....	40
FIGURA 4 –	Resultados típicos obtidos para a amplificação do fragmento alvo para a <i>Escherichia coli</i> por meio da PCRtr. Curva de dissociação com amostras padrão e negativas.....	40
FIGURA 5 –	Resultados típicos obtidos para a amplificação do fragmento alvo para a <i>Escherichia coli</i> por meio da PCRtr. Curva para <i>Escherichia coli</i> e amostras positivas acima do Threshold.....	41
FIGURA 6 –	Resultados típicos obtidos para a amplificação do fragmento alvo para a <i>Escherichia coli</i> por meio da PCRtr. Curva de dissociação com amostras padrão e positivas para <i>Escherichia coli</i>	41
FIGURA 7 –	Resultado típico das curvas de dissociação obtidas por PCRtr para <i>Escherichia coli</i> (EC). Curva para <i>Escherichia coli</i>	42
FIGURA 8 –	Resultado típico da curva de dissociação obtida por PCRtr para <i>Streptococcus agalactiae</i> . Curva para <i>Streptococcus agalactiae</i>	42
FIGURA 9 –	Resultado típico das curvas de dissociação obtidas por PCRtr para <i>Escherichia coli</i> (EC) e <i>Streptococcus agalactiae</i> (SA). Reação contendo <i>Escherichia coli</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	43
FIGURA 10 –	Resultado típico das curvas de dissociação obtidas por PCRtr para <i>Escherichia coli</i> (EC) e <i>Streptococcus agalactiae</i> (SA). Sobreposição das curvas dos gráficos.....	43
FIGURA 11 –	Percentual de recém-nascidos em função da prevalência das bactérias estudadas.....	46
FIGURA 12 –	Presença do DNA genômico das bactérias em função do tempo de ruptura das membranas amnióticas nos recém-nascidos pré-termo.....	47
FIGURA 13 –	Presença do DNA genômico das bactérias em função do tempo de ruptura das membranas amnióticas nos recém-nascidos a termo.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EBSERH – Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares

EGB – Estreptococo do grupo B

G1 – Grupo 1

G2 – Grupo 2

HRMS – Hospital Regional de Mato Grosso do Sul

HUMAP – Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian

I/T - Neutrófilos imaturos/totais

IC – Intervalo de Confiança

IG – Idade gestacional

IMC – Índice de massa corporal

ITU - Infecção do trato urinário

NBS – *New Ballard Score*

NK - Natural Killer

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PCRtr - Reação em cadeia de polimerase em tempo real

RN – Recém-nascido

RNA – Ácido ribonucleico

RNT – Recém-nascido a termo

RPM – Ruptura prematura de membranas

RPMP - Ruptura prematura das membranas pré-termo

T1 – Tempo 1

T2 – Tempo 2

T3 – Tempo 3

T4 – Tempo 4

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TP - Trabalho de parto

UIN – Unidade Intermediária Neonatal

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Ruptura prematura das membranas amnióticas (RPM)	17
2.2 Infecção neonatal precoce	18
2.3 Microrganismos associados à infecção neonatal	20
2.3.1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	20
2.3.2 <i>Escherichia coli</i>	21
2.3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.3.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
2.4 Condição imunológica do neonato	25
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 Tipo de estudo e local	31
4.2 Aspectos éticos	31
4.3 Casuística	31
4.4 Grupos experimentais	32
4.5 Avaliação das variáveis clínicas e laboratoriais	32
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICES	69
ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO

As infecções no período neonatal constituem uma das grandes preocupações do setor de neonatologia, por serem comumente responsáveis pela elevada morbimortalidade em recém-nascidos (CASTELANO FILHO *et al.*, 2008; SILVEIRA; PROCIANOY, 2012; MOREIRA *et al.*, 2013).

Dentre essas infecções, a sepse neonatal é uma das intercorrências mais frequentes neste período, sendo caracterizada por resposta inflamatória sistêmica decorrente da transmissão intraparto de microrganismos patogênicos (SILVEIRA *et al.*, 2010; CAMACHO-GONZALEZ *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014).

A sepse neonatal precoce geralmente ocorre por transmissão vertical, sendo que o neonato é contaminado por patógenos presentes no canal do parto ou ainda por contaminação secundária à bacteremia materna (CAMACHO-GONZALEZ *et al.*, 2013).

A ruptura prematura das membranas amnióticas (RPM), definida como a perda de líquido amniótico antes do início do trabalho de parto, independentemente da idade gestacional, é um importante fator de risco associado a ocorrência de sepse neonatal (KACEROVSKY *et al.*, 2014).

A associação de RPM e infecção neonatal precoce tem sido alvo de vários estudos (MATALOUN *et al.*, 1997; ROCHA *et al.*, 2002; PIERRE *et al.*, 2003; NOMURA *et al.*, 2009; HACKENHAAR *et al.*, 2014; PATRIOTA *et al.*, 2014). O risco de incidência de sepse aumenta em função do tempo de ruptura das membranas amnióticas, de forma que o risco ao feto é maior, nas primeiras 36 horas após a ruptura (HERBST; KÄLLÉN, 2007).

O risco de sepse pode ser aumentado devido a presença de microrganismos encontrados na microbiota vaginal normal e patogênica, sendo que os microrganismos mais frequentes associados à sepse neonatal são *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* e *Listeria monocytogenes*, (CASTELLANO FILHO *et al.*, 2008; NAZARKO; MIGLIOLI, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013). Estes microrganismos podem migrar do canal vaginal para a cavidade intra-amniótica e colonizar o feto podendo então desencadear o processo infeccioso (PIERRE *et al.*, 2003; KRUPA *et al.*, 2005; KACEROVSKY *et al.*, 2014).

Nas Unidades de Terapias Intensivas Neonatais (UTI) e Unidades Intermediárias Neonatais (UIN) do município de Campo Grande - MS, a infecção neonatal tem sido uma das maiores preocupações dos profissionais atuantes desse setor. Neste sentido, com o presente estudo o objetivo foi avaliar a associação entre presença das bactérias

Streptococcus agalactiae, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* no sangue de recém-nascidos de diferentes idades gestacionais de gestantes com ruptura prematura das membranas que tiveram seus filhos internados com infecção neonatal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ruptura prematura das membranas amnióticas (RPM)

A RPM, também denominadas como amniorrexe prematura é definida como a perda de líquido amniótico antes do início do trabalho de parto (TP), em qualquer idade gestacional (IG). Quando ocorre antes da 37^a semana de gestação denomina-se ruptura prematura das membranas pré-termo (RPMPT). O tempo transcorrido entre a ruptura e o início espontâneo do parto é definido como tempo de latência, neste caso adota-se a denominação de ruptura prolongada das membranas amnióticas (ARAÚJO *et al.* 1994; PIERRE *et al.*, 2003; GOLINO *et al.*, 2006).

A incidência de RPM varia de 8 a 10% de todas as gestações, sendo que em gestações pré-termo a incidência de rupturas varia de 2 a 4%. De uma maneira geral, a RPM está relacionada a patologias tanto maternas quanto fetais contribui significativamente a ocorrência de partos prematuros (HACKENHAAR *et al.*, 2014). De acordo com Patriota *et al.* (2014), no Brasil de 30 a 40% dos partos prematuros estão diretamente ligados a ocorrência da RPMPT, que por sua vez contribuem com 20% dos óbitos perinatais.

A RPM tem incidência ampla, e diversas variáveis estão associadas a este evento (GOLINO *et al.*, 2006). A causa mais comum de RPM é a espontânea, cuja ocorrência pode estar relacionada à malformação das próprias membranas, deficiência de colágeno, aumento na fragilidade das membranas devido à ação enzimática comum em processos inflamatórios e/ou infeccioso e à exposição da bolsa por incompetência do istmo cervical. A ruptura iatrogênica pode ser decorrente de cirurgias cervicais durante a gestação ou de procedimentos invasivos intrauterinos como amiocentese, biópsia de vilosidades coriônicas e laser terapia. O adelgaçamento da membrana amniótica é o evento que mais frequentemente está envolvido na gênese da amniorrexe prematura, sendo que tabagismo, deficiência de alfa-1-antitripsina, Ehlers-Danlos podem ser fatores responsáveis pela alteração da espessura e a resistência da membrana amniótica (CAUGHEY *et al.*, 2008; ZUGAIB, 2008).

O risco da ocorrência da RPM é aumentado caso a gestante já tenha tido este quadro em gestação anterior e baixo índice de massa corporal (IMC). Fatores mecânicos

como gestação gemelar também podem aumentar a possibilidade de ocorrer a RPM devido a maior distensão do útero (HACKENHAAR *et al.*, 2014).

A RPM é considerada uma das três maiores causas de morbidade e mortalidade perinatal, já que está associada a patologias maternas e fetais, que aumentam a incidência de partos prematuros (PATRIOTA *et al.*, 2014). Em algumas situações é sabido que a infecção precede a RPM. Cerca de 32% a 35% dos casos de RPM têm cultura de líquido amniótico positiva. As bactérias infectantes produzem enzimas (proteases, collagenases e elastases) que atuam sobre as membranas, levando ao enfraquecimento e à ruptura das mesmas (MATALOUN *et al.*, 1997; KRUPA *et al.*, 2005; PAULA, 2008).

O fator infeccioso além de ser apontado como causador da RPM, também pode ser responsável pelo aumento dos riscos maternos e fetais. Visto que entre as complicações da RPM principalmente aquelas cujo período de latência é prolongado, estão as infecções maternas (endometrite e corioamnionite) e perinatais (pneumonia e sepse), pois a ruptura prolongada das membranas proporciona a migração de microrganismos presentes no canal vaginal para a cavidade intra-amniótica (PIERRE *et al.*, 2003; KRUPA *et al.*, 2005).

Os microrganismos responsáveis pela infecção neonatal relacionada com RPM são aqueles encontrados na microbiota vaginal normal e patogênica, sendo os microrganismos mais frequentes os *Streptococcus* do grupo A e B, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, citomegalovírus, vírus *Herpes simplex*, vírus da Hepatite B, *Candida albicans* e *Chlamydia trachomatis*. A *Escherichia coli* também está associada à ocorrência da infecção neonatal precoce (ARAÚJO *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2011). No Brasil, a infecção neonatal está associada principalmente a presença de *Streptococcus agalactiae* no canal do parto (BRASIL, 2011a).

2.2 Infecção neonatal precoce

A mortalidade neonatal é um importante problema de saúde pública, sendo que as infecções que ocorrem no período neonatal estão associadas à alta morbimortalidade neste período (CASTELANO FILHO *et al.*, 2008; SILVEIRA; PROCIANOY, 2012; MOREIRA *et al.*, 2013). Dentre as infecções neonatais, destaca-se a sepse neonatal, definida como uma síndrome clínica caracterizada por múltiplas manifestações sistêmicas decorrentes da invasão e multiplicação bacteriana na corrente sanguínea (VIEIRA, 2004).

A incidência de sepse varia de 1 a 8 casos por 1.000 nascidos vivos. Em recém-nascidos pré-termo com peso de nascimento inferior a 1.500g, a incidência de sepse varia entre 11% e 25%. Mesmo com avanços na terapia antimicrobiana, das medidas de suporte e dos meios para o diagnóstico de fatores de risco perinatal, a taxa de mortalidade é em média 25% (BRASIL, 2011a).

Consideram-se fatores de risco para infecção neonatal precoce a ruptura prolongada de membranas amnióticas, febre materna, trabalho de parto prolongado ou traumático, prematuridade, condição socioeconômica e geográfica desfavorável, anóxia neonatal e sexo masculino (OHLSSON; VERNCOMBE, 1987; GEME *et al.*, 1984; WILSON, 1990; GRASSI *et al.*, 2001; GOULART *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.* 2007; CAMACHO-GONZALEZ *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014). A RPM propicia a invasão de microrganismos da vagina para a cavidade intra-amniótica, principalmente nos casos em que o período de latência é prolongado, aumentando consequentemente a probabilidade de parto prematuro, que por sua vez acarreta em morbidade materna, assim como morbimortalidade perinatal (ROCHA *et al.*, 2002).

2.3 Microrganismos associados à infecção neonatal

2.3.1 *Streptococcus agalactiae*

O *Streptococcus agalactiae* ou estreptococos do grupo B (EGB) de Lancefield são cocos gram positivos, catalase negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e 99% são β -hemolíticos. Existem cepas não hemolíticas de *Streptococcus* (SCHUCHAT *et al.*, 2001). Estas bactérias crescem facilmente em meio de cultura enriquecido e a detecção do estado de portadora em mulheres grávidas requer o uso de meio de cultura seletivo. Até o momento, foram identificados dez sorotipos subdivididos com base em polissacarídeos capsulares específicos (Ia, Ib, II a IX) (FIOLO *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.* 2013). Os sorotipos Ia, Ib, II, III, V são os que estão relacionados aos casos de infecção neonatal (GLASER *et al.*, 2002; FIOLO *et al.*, 2012).

Estas bactérias estão associadas às infecções no período perinatal, envolvendo recém-nascidos, mulheres grávidas ou no pós-parto (FIOLO *et al.*, 2012). Em mulheres assintomáticas, o reservatório primário do *Streptococcus agalactiae* é o trato gastrointestinal, sendo o trato urogenital o segundo local mais comum de sua detecção. No entanto, este microrganismo pode ser isolado em recém-nascidos, jovens, adultos e idosos de ambos os sexos podendo ser responsável pela ocorrência de doença invasiva, que ocorre com maior frequência em crianças com até 90 dias de vida e também em idosos (ZANGWILL *et al.*, 1992; MANNING *et al.*, 2004).

A colonização por este microrganismo está associada a um risco aumentado de infecção no trato urinário e complicações na gravidez, como endometrite e corioamnionite. Recém-nascidos expostos ao *Streptococcus agalactiae* podem desenvolver pneumonia, sepse e meningite (GLASER *et al.*, 2002; MARCONI *et al.*, 2010). A transmissão vertical de *Streptococcus agalactiae* se dá no rompimento das membranas amnióticas e o feto entra em contato com o microrganismo durante sua passagem pelo canal do parto (MARCONI *et al.*, 2010).

O *Streptococcus agalactiae* pode causar dois quadros clínicos principais em recém-nascidos: a doença neonatal precoce e a doença neonatal tardia. O quadro precoce ocorre durante a primeira semana de vida e é o mais prevalente (SCHUCHAT, 1998).

Entre 50% e 75% dos recém-nascidos expostos ao *Streptococcus agalactiae* tornam-se colonizados, e 1% a 2% de todos cuja as mães são portadoras da bactéria desenvolvem infecção neonatal precoce, sendo que prematuros apresentam maior risco de desenvolvimento de sepse (KISS *et al.*, 2013).

Segundo Moreira *et al.* (2013), a prevalência de colonização vaginal por *Streptococcus agalactiae* em gestantes varia de 10% a 30%. Estudos nacionais têm evidenciado alta prevalência de *Streptococcus agalactiae* em amostras provenientes da vagina e região anorretal de gestantes.

Beraldo *et al.* (2005), evidenciaram que a prevalência de colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes com mais de 36 semanas de gestação foi de 26,5%. Em mulheres a partir do terceiro trimestre de gestação, Pogere *et al.* (2005) observaram prevalência de colonização de 21,6%. Costa *et al.* (2008), Bastos *et al.* (2012) e Função e Narchi (2013) observaram prevalência de colonização por *Streptococcus agalactiae* em 20,4%, 16,6% e 17,4 %, respectivamente, em gestantes com mais de 36 semanas de gestação. Marconi *et al.* (2010) observaram prevalência de colonização por *Streptococcus agalactiae* de 47,5% na região perianal, retal, introito vaginal e terço distal da parede vaginal em mulheres com idade gestacional entre 35 e 37 semanas.

Embora não seja relacionado diretamente à gênese da RPM, pode-se inferir que *Streptococcus agalactiae* seja também altamente prevalente nessas gestantes, nas quais a suscetibilidade para a ascensão do microrganismo até a cavidade amniótica e por sua vez a colonização do feto no momento da passagem no canal de parto são maiores. Assim, nesta situação o risco do desenvolvimento de sepse neonatal por *Streptococcus agalactiae* é maior (LINHARES *et al.*, 2011).

2.3.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, não esporulada, anaeróbia facultativa da família *Enterobacteriaceae* que é encontrada no intestino e fezes de animais de sangue quente e répteis. A *Escherichia coli* é o organismo predominante aeróbio da microbiota intestinal, sendo sua presença um indicativo de contaminação fecal (TENAILLON *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011).

A *Escherichia coli* pode estar associada à ocorrência de infecções do trato urinário, infecções entéricas, sepse, bacteremia e meningite em recém-nascidos e crianças com sistema imunológico deficiente (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011). Juntamente com o *Streptococcus agalactiae*, a *Escherichia coli* tem sido associada à ocorrência de infecção neonatal precoce, principalmente em recém-nascidos prematuros ou com baixo peso ao nascer (STOLL *et al.*, 2011; BERCAITE *et al.*, 2012)

De acordo com Bercaite *et al.* (2012) o *Streptococcus agalactiae* era o principal microrganismo responsável pela ocorrência de sepse neonatal precoce. No entanto, com o desenvolvimento de diretrizes preconizando a profilaxia intraparto contra a infecção causada por este patógeno houve uma redução na incidência de infecção neonatal precoce. Por outro lado, ocorreu aumento na incidência de sepse neonatal precoce em prematuros, com baixo peso ao nascer por microrganismos resistentes a antibióticos, neste contexto, destaca-se a *Escherichia coli*.

A *Escherichia coli* dispõe de vários fatores de virulência que lhes permite a colonização do canal vaginal e/ou endocervical em gestantes. Tal fato tem ocasionado infecções nas gestantes e também nos recém-nascidos, como por exemplo, a sepse neonatal precoce.

A contaminação do recém-nascido por *Escherichia coli* ocorre de maneira semelhante à contaminação por *Streptococcus agalactiae*. Os microrganismos presentes no canal vaginal e/ou endocervical são transmitidos ao recém-nascido no momento do parto pelo líquido amniótico, após a ruptura da membrana ou com a passagem do recém-nascido pelo canal vaginal (GUIRAL *et al.*, 2011), sendo os sítios de colonização o trato gastrointestinal ou trato respiratório inferior (TEJADA *et al.*, 2011).

A prevalência de colonização do canal vaginal por *Escherichia coli* foi de 19,9% em estudo desenvolvido por Bercaite *et al.* (2012) na Lituânia e de 15% em estudo desenvolvido por Guiral *et al.* (2011) na Espanha. No Brasil, Nazarko e Miglioli (2011), observaram que a incidência de *Escherichia coli* em sangue proveniente do cordão umbilical de recém-nascidos foi de 12,5%.

Fatores como, infecção urinária, febre intraparto, ruptura prematura de membranas, ruptura prolongada das membranas podem predispor a ocorrência de sepse neonatal por *Escherichia coli* (ROCHA *et al.*, 1999; FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2009; BERCAITE *et al.*, 2012). Outro ponto que favorece a infecção neonatal por *Escherichia coli* é o fato de que a virulência de cepas isoladas de gestantes é maior em relação aquelas provenientes de mulheres não gestantes (GUIRAL *et al.*, 2011).

A infecção do trato urinário (ITU) caracteriza-se pela invasão e multiplicação de microrganismos nos rins e nas vias urinárias. Na maioria das vezes, é resultado da colonização da urina por bactérias fecais, que cresceram em meio anaeróbio, sendo a *Escherichia coli* o patógeno mais comumente envolvido nestas infecções. A gravidez é situação que predispõe ao aparecimento de ITU, devido às mudanças fisiológicas (mecânicas e hormonais) que ocorrem neste período da vida da mulher. A ITU durante a gravidez pode causar sérias complicações, como o trabalho de parto prematuro, recém-nascidos de baixo peso, ruptura prematura de membranas, restrição de crescimento intraútero, paralisia cerebral, entre outras (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2009).

Existem poucos trabalhos publicados quanto à ocorrência de infecção neonatal de origem materna associada a *Escherichia coli*. No entanto, deve ser dada a devida atenção a este patógeno, pois em países em desenvolvimento a *Escherichia coli* é o microrganismo emergente comumente associado à ocorrência de infecção neonatal (ZAIDI *et al.*, 2009).

2.3.3 Listeria monocytogenes

O gênero *Listeria* é constituído por seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi seeligeri* e *L. grayi*. No entanto, recentemente, duas outras espécies têm sido relatadas: *L. marthii* e *L. rocourtiae*. Entre todas as espécies do gênero, um número limitado de espécies tem importância médica e veterinária, sendo que a *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* são patogênicas (ABAY *et al.*, 2012). A *Listeria monocytogenes* é um patógeno gram-positivo, intracelular facultativo, não formador de esporos, e é de origem alimentar e conhecida por causar listeriose em humanos, principalmente naqueles com baixa imunocompetência (MOROBÉ *et al.*, 2012).

Os indivíduos com listeriose podem apresentar sintomas característicos de infecção gastrointestinal, bem como sintomas semelhantes aos da gripe. De uma maneira geral, a incidência de listeriose é baixa na população, porém a letalidade é alta, variando de 20% a 30% em pessoas com o sistema imunológico deficiente (MOROBÉ *et al.*, 2012; LAZARUS *et al.*, 2013; PÉREZ-TRALLERO *et al.*, 2014).

A *Listeria monocytogenes* parece normalmente pertencer à microbiota intestinal em seres humanos, sendo que de 5% a 10% da população geral são portadores de *Listeria monocytogenes*. No entanto, a presença de *Listeria monocytogenes* em fezes não é

necessariamente uma indicação de uma infecção. A listeriose é definida clinicamente quando o microrganismo é isolado do sangue, líquido, placenta e do feto em casos de aborto (MOROBÉ *et al.*, 2012).

Tanto mulheres gestantes quanto os recém-nascidos podem desenvolver a listeriose sintomática. A listeriose neonatal ocorre em uma forma precoce com manifestações de sepse e uma forma tardia com sinais de meningite. A forma precoce é evidente nos dois primeiros dias de vida, é provável que as mães que estejam infectadas pelo patógeno indicando transmissão via uterina. Na forma tardia, as mães são saudáveis e o patógeno é transmitido a partir do ambiente (LARSSON *et al.* 1978). Embora a incidência de listeriose em recém-nascidos seja rara, quando ocorre a doença é de elevada gravidade (LAZARUS *et al.*, 2013).

2.3.4 *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo gram-negativo encontrado no trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis e também restrita ao ambiente hospitalar. Esta bactéria é produtora de carbapenemase, que tem a propriedade de inibir a ação dos antibióticos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem), dificultando ou reduzindo as opções terapêuticas disponíveis (CASSETTARI *et al.*, 2006).

É um importante patógeno de infecções hospitalares, causando surtos em unidades de internação de pacientes críticos, e são descritas situações em que sua presença se tornou endêmica. Esta bactéria é responsável pela ocorrência de pneumonia e infecção do trato urinário, sendo que a sua importância patogênica está relacionada às infecções hospitalares (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; CASSETTARI *et al.*, 2006).

Em enfermarias pediátricas e unidades de terapia intensiva, infecções nosocomiais por *Klebsiella* são importantes, principalmente quando acometem prematuros. A importância desta bactéria está também relacionada ao seu envolvimento na ocorrência de sepse neonatal, seja tanto em sua forma precoce quanto em sua forma tardia (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Epidemias por *Klebsiella pneumoniae* ocorridas em berçários foram comprovadamente associadas à transmissão pelas mãos da equipe. Conforme já mencionado, a *Klebsiella pneumoniae* é de origem hospitalar, assim pode ocorrer transmissão de recém-nascido a recém-nascido, via mão contaminada, permanecendo na

pele, sendo o trato gastrointestinal o maior reservatório no recém-nascido (MENEZES *et al.*, 2008).

2.4 Condição imunológica do neonato

As membranas e o líquido amniótico funcionam como uma barreira que gera um ambiente estéril, principalmente em relação à microbiota vaginal e exerce funções essenciais para a proteção, crescimento e desenvolvimento do feto (ZUGAIB, 2008). Assim, a proteção do recém-nascido contra as infecções é iniciada no interior do útero, sendo o líquido amniótico uma barreira muito eficiente devido à presença de vários fatores de defesa (CECCON *et al.*, 1997).

A atividade antibacteriana do líquido amniótico pode inibir o crescimento de algumas bactérias, como *Staphylococcus aureus*, gram-negativos como *Proteus spp.*, *Klesbiella-Enterobacter spp.* e fungos como *Candida albicans* (CECCON *et al.*, 1997).

No entanto, com a RPM, o caráter protetor do líquido amniótico é comprometido, pois este evento proporciona a migração de microrganismos presentes no canal vaginal para a cavidade intra-amniótica. A colonização inicial do recém-nascido e da placenta ocorre habitualmente após a RPM. Se a ruptura for precoce, mas o parto propriamente dito não for imediato, a microbiota vaginal pode ascender pelo trato genital. Se o parto ocorrer logo após a ruptura da membrana, o recém-nascido poderá ser colonizado durante a passagem pelo canal de parto (PIERRE *et al.*, 2003; KRUPA *et al.*, 2005).

Neste contexto, a problemática levantada é a limitada resposta imunológica do recém-nascido. O neonato possui a capacidade de defesa reduzida devido às características de seu sistema imunológico. Uma vez que este não é capaz de montar uma eficiente resposta em termos quantitativo e qualitativo frente a patógenos invasivos, acarretando em maior suscetibilidade a infecções (DINIZ; FIGUEIREDO, 2014).

Em recém-nascidos pré-termo a situação ainda é mais delicada. A imunidade de prematuros extremos pode ser mais limitada devido à fragilidade da pele, à deficiência dos produtos de ativação do sistema complemento, ao menor pool de reserva de precursores de neutrófilos na medula óssea, quimiotaxia, aderência, atividade enzimática neutrofílicas reduzidas. Além disso, outras limitações como reduzida citotoxicidade de células Natural

Killer (NK), menor capacidade de proliferação e produção de citocinas dos linfócitos T, cooperação entre células T e B e na síntese de anticorpos pelos linfócitos (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005).

Outros estudos demonstram que a deficiência de fibronectina, deficiência no processamento de antígenos pelos macrófagos, aumento de linfócitos T supressores (CDB) e diminuição na concentração sérica de IgA, IgM, IgE, e IgG também são fatores limitantes (CARNEIRO-SAMPAIO; GRUMACH, 1991; KLEIN; MARCY, 1990; NASCIMENTO, 2002). Sendo, portanto, estes os motivos que podem qualificar a prematuridade como um fator de predisposição à infecção neonatal e consequentemente a altos índices de mortalidade (GUERINA, 1991; GEME *et. al.*, 1984).

Como já mencionado nesta pesquisa, o *Estreptococos* do grupo B é um importante causador de infecção no período neonatal. Isto ocorre, principalmente devido à facilidade de aderência que estes microrganismos possuem junto às células epiteliais de mucosas e também devido à ausência de IgA secretora nos primeiros sete dias de vida. A ausência de anticorpos maternos e do recém-nascido específicos para este agente contribui para a infecção. Além disso, a limitação na síntese de fatores quimiotáticos pode retardar o recrutamento de neutrófilos, cuja capacidade de adesão é deficitária (DINIZ; FIGUEIREDO, 2014).

2.5 Identificação de microrganismos associados à sepse neonatal

Os exames laboratoriais são importantes ferramentas para o diagnóstico de sepse neonatal precoce. O isolamento do microrganismo patogênico em qualquer líquido ou secreção do organismo é considerado como padrão ouro e o método mais específico para o diagnóstico de sepse neonatal. Porém, todos os testes microbiológicos, na prática, apresentam sensibilidade muito baixa quando se considera a gravidade da doença (VIEIRA, 2004; BRASIL, 2011b). Exames bacteriológicos podem confirmar a presença de bactérias. No entanto, deve ser levada em conta a possibilidade de colonização onde a positividade não representa infecção, e a de contaminação do material (GEME *et al.*, 1990).

A hemocultura é o exame bacteriológico de maior interesse na prática clínica e tem sido aceita por vários pesquisadores no auxílio ao diagnóstico de infecção adquirida intraútero ou intraparto. Sabe-se que a partir do sangue, as bactérias podem atingir qualquer

sítio do organismo, produzindo o que se chama de focos infecciosos, podendo agravar o quadro clínico e até mesmo levar a óbito. As bactérias responsáveis pela infecção podem ser identificadas pela realização da hemocultura e são úteis no diagnóstico etiológico e na escolha da terapia (VIEIRA, 2004; BRASIL, 2011b).

Além disso, os recém-nascidos que apresentam sinais clínicos de sepse ou suspeita de infecção não se deve iniciar a administração de antibióticos antes da obtenção da hemocultura. Em caso de forte suspeita, não é necessário aguardar o resultado para iniciar o tratamento com antibiótico, devido à gravidade e rápida evolução do quadro clínico no período neonatal (VIEIRA, 2004; BRASIL, 2011b). Logo, a praticidade da hemocultura é discutível, visto que para a obtenção de resultados são necessários dias de espera, 88% das hemoculturas positivam em até 48 horas da incubação e 98%, em até 72 horas (VIEIRA, 2004).

Determinados fatores são significativos para a obtenção de resultados fidedignos, como o volume de sangue colhido e a técnica correta de antisepsia no local da punção (VIEIRA, 2004). Recomenda-se a obtenção de 0,5mL a 1mL de sangue, única amostra de hemocultura. Resultados falso-positivos podem ocorrer por contaminação do local de punção. Portanto, a forma de evitá-los é uma coleta adequada e asséptica. Para a higiene adequada da pele deve-se empregar algodão embebido em álcool a 70%, e logo após, clorexidina alcoólica a 0,5%. É necessário esperar a pele secar após a desinfecção para a realização da punção. A punção venosa periférica é o sítio mais adequado (BRASIL, 2011b; SILVEIRA;PROCIANO, 2012). A veia umbilical, embora mais prática, apresenta elevado índice de contaminação por bactérias presentes no líquido amniótico, principalmente na presença de RPM (SILVEIRA;PROCIANOY, 2012).

A capacidade de diagnóstico por hemocultura tem melhorado ao longo da última década, com o advento de sistemas automatizados para a monitorização contínua de hemocultura. Embora os sistemas automatizados possam economizar tempo, subculturas para ensaios específicos como testes bioquímicos ainda são necessários para a identificação de bactérias patogênicas. Neste sentido, os avanços na biologia molecular forneceram novas ferramentas para o diagnóstico da sepse de maneira mais rápida em relação à hemocultura. Com ensaios moleculares os resultados podem ser obtidos em até 12 horas (PAMMI *et al.*, 2014).

Ensaio moleculares com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) são importantes ferramentas para a detecção de microrganismos e podem contribuir para o diagnóstico precoce com alta sensibilidade, mesmo quando os alvos estão presentes em

quantidades extremamente baixas (10 a 100 cópias de DNA). Neste método é feita a amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA (ácido desoxirribonucleico) sem o uso de um organismo (CUCHACOVICH, 2006).

A metodologia da PCR foi desenvolvida em 1983 por Kary Mullis, e hoje é uma das técnicas mais comuns utilizadas em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para diversas tarefas, como o sequenciamento de genes diagnóstico de doenças hereditárias, identificação de fingerprint genético (usado em teste de paternidade e na medicina forense), detecção de diagnóstico de doenças infecciosas e criação de organismos transgênicos.

A PCR é uma ferramenta da biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA, a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (SAIKI *et al.*, 1985). A elevada sensibilidade da PCR permite a detecção de quantidades reduzidas de partículas virais (DNA ou RNA), facilitando assim o diagnóstico de indivíduos doentes com pequeno número de células infectadas que, com métodos sorológicos disponíveis, seria de difícil realização (WRIGHT; WYNFORD, 1990; GERNA *et al.* 1995).

A PCR pode ser uma importante ferramenta de diagnóstico devido sua maior sensibilidade e especificidade para detectar qualquer faixa de agentes bacterianos amplos associados à sepse neonatal (CEZARINO *et al.*, 2008).

Neste contexto, Miglioli (2009) concluiu que a PCR é uma ferramenta útil na identificação de material genético de agentes patogênicos comumente associados à sepse neonatal. Por este método, a autora identificou a presença de DNA gênomico de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* em aspirado traqueal, gástrico e sangue de recém-nascidos.

Fiolo *et al.* (2012) concluíram que a técnica de PCR é útil na caracterização dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* dada a sua especificidade e relativa facilidade de execução em relação à técnica sorológica.

Em estudo de Warren *et al.* (1992), a sensibilidade do teste PCR foi de 89,2% e a especificidade de 95,8% e havendo seleção de *primers* (sequência de nucleotídeos) e condições adequadas a PCR pode ter resultados comparáveis aos da cultura de tecidos que é considerado o padrão ouro para o diagnóstico de infecção.

Uma meta-análise feita por Pammi *et al.* (2014), revelou que sensibilidade e especificidade da PCR foi de 0,90 (IC 95%: 0,78-0,95) e 0,96 (IC 95%: 0,94-0,97), respectivamente. Estes dados demonstram que tanto a PCR em tempo real (PCRtr), quanto a PCR convencional, possuem maior sensibilidade e especificidade quando comparados a

outros ensaios utilizados no diagnóstico dos microrganismos responsáveis pela sepse neonatal.

Embora os avanços nas ferramentas de diagnóstico molecular e estudos de PCR tenham melhorado a sensibilidade e a especificidade na confirmação dos casos de suspeita de sepse, este ainda não pode substituir por completo a hemocultura na detecção desta patologia. Sendo, portanto, considerados como métodos complementares de diagnóstico (PAMMI *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Relacionar o tempo de ruptura prematura de membrana com a presença DNA genômico de diferentes bactérias em sangue de recém-nascidos pré-termo e a termo.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar a presença do DNA genômico bacteriano em amostras de sangue de recém-nascidos pré-termo e a termo com suspeita de infecção neonatal com o tempo de ruptura prematura de membranas amnióticas utilizando a técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com *primer* universal;
- Determinar a presença do DNA genômico das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* em amostras de sangue recém-nascidos pré-termo e a termo com suspeita de infecção neonatal com diferentes tempos de ruptura prematura de membranas amnióticas utilizando a técnica de PCR em tempo real (PCRtr).
- Comparar a presença das *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* com os resultados de hemocultura obtidos dos prontuários de recém-nascidos pré-termo e a termo com suspeita de infecção neonatal com diferentes tempos de ruptura prematura de membranas amnióticas.
- Associar o tempo de ruptura prematura de membrana com a presença de DNA genômico das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* em recém-nascidos pré-termo e a termo.
- Identificar os critérios clínicos maternos e dos recém-nascidos do estudo com a presença das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* detectada pela PCRtr e hemocultura.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo e local

Foi realizado um estudo observacional, transversal, com recém-nascidos provenientes de gestantes com diagnóstico de RPM, independentemente da idade gestacional, com exceção das gestantes em franco trabalho de parto e idade gestacional a termo internados nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) ou Unidade Intermediária Neonatal (UIN), da Maternidade do Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (HUMAP/EBSERH), Maternidade Cândido Mariano e Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS) no período de março a agosto de 2014.

4.2 Aspectos éticos

O estudo foi iniciado após autorizações concedidas pelos hospitais para a condução da coleta de dados utilizados nesta pesquisa e subsequente aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS (parecer nº 404.583) – (Anexo D). As mães ou responsáveis pelos recém-nascidos consentiram em participar voluntariamente do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme o modelo apresentado no Apêndice A .

4.3 Casuística

A população consistiu de 101 parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo em qualquer tempo de RPM ou a termo com RPM mais que 12 horas e sem franco trabalho de parto.

A coleta de dados foi realizada mediante a aplicação do instrumento de coleta (Anexo E) (MIGLIOLI, 2003), sendo que, para cada caso foi avaliada a história clínica da gestante considerando a idade gestacional, patologia de base, número de gestações, paridade, quadro clínico de infecção urinária, febre e alterações laboratoriais.

Os critérios de inclusão adotados foram: situações de RPM $\geq$ 12 horas desde que não fosse gestação a termo e em franco trabalho de parto e sem distócia.

Os critérios de exclusão foram: recém-nascidos com diagnóstico de malformação congênita, recém-nascidos cujas mães ou responsáveis legais não concordaram com sua participação no estudo, recém-nascidos filhos de indígenas e quilombolas.

4.4 Grupos experimentais

Para análise dos recém-nascidos inclusos no estudo, os mesmos foram divididos em dois grupos de acordo com a idade gestacional (IG):

Grupo 1 (G1): recém-nascidos com idade gestacional < 38 semanas;

Grupo 2 (G2): recém-nascidos com idade gestacional ≥ 38 semanas.

Após o nascimento, as avaliações das idades gestacionais dos recém-nascidos foram realizadas pelo método *New Ballard Score* (NBS) conforme Ballard *et al.* (1991) descrito no prontuário avaliado pelo médico do setor.

Dentro das idades gestacionais os recém-nascidos foram divididos de acordo com o tempo de ruptura das membranas: T1: 0 a 23 horas, T2: 24 a 47 horas, T3: 48 a 71 horas e T4: ≥ 72 horas.

4.5 Avaliação das variáveis clínicas e laboratoriais

Foram valorizados os seguintes critérios dos dois grupos dos recém-nascidos e suas respectivas mães:

Critérios dos recém-nascidos: hemocultura, alterações do hemograma completo (plaquetas; relação I/T - neutrófilos imaturos /totais), tempo de RPM, sofrimento fetal, peso de nascimento, sexo, estado nutritivo, dados antropométricos, escore de Apgar < 7 no quinto minuto e alterações de exames complementares compatíveis com infecção neonatal.

Critérios maternos: febre materna, infecção do trato urinário, número de gestações, tipo de parto.

Os dados de hemocultura foram coletados a partir dos prontuários dos recém-nascidos participantes do estudo. A hemocultura foi realizada seguindo a metodologia do sistema automatizado BACTTEC™ FX (BD, New Jersey, USA), utilizado nos laboratórios conveniados pelos hospitais citados na pesquisa.

Para a análise do DNA genômico das bactérias de interesse utilizou-se o método de reação em cadeia da polimerase. Para tanto, foi colhido 0,5 mL de sangue dos recém-nascidos por punção do cordão umbilical ou sangue periférico aproveitando a oportunidade

da coleta de rotina dos serviços do setor neonatal. Para evitar a contaminação previamente a colheita de sangue procedeu-se a antissepsia do local a ser puncionado com clorexidine 0,5% e álcool 70 °GL, após a secagem foi realizada a colheita da alíquota de sangue. As amostras de sangue foram armazenadas em congelador a -86° C, até a extração do DNA.

Para a extração do DNA genômico utilizou-se o kit illustra blood genomicPrep minispinn (GE Healthcare, Uk) e posteriormente quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, USA).

Também foram utilizadas amostras de sangue de recém-nascidos provenientes da pesquisa desenvolvida pelo pesquisador Walter Peres da Silva Júnior do curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias – UFMS, intitulado “Perfil diagnóstico dos principais agentes bacterianos na infecção neonatal precoce através da técnica PCR Multiplex”, estocadas no Laboratório de Pesquisas pediátricas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul com reconhecimento das idades gestacionais e tempo da ruptura prematura de membranas. A autorização da utilização das amostras de sangue concedidas por este pesquisador, o TCLE e a autorização concedida pelo laboratório estão dispostas nos Anexos F, G e H, respectivamente.

Para a detecção de DNA genômico bacteriano, as amostras foram submetidas ao protocolo de PCR convencional seguindo as normas de Jordan e Durso, (2000) com modificações. O par de *primer* universal RW01, cuja sequência é 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3' e DG74 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') (MWG BIOTECH AG, EBERSBERG, Alemanha) utilizado na detecção de qualquer DNA genômico de origem bacteriana (Tabela 1) foram utilizados para amplificação um mix contendo (10 mM Tris hidrocloreto, 50 mM de cloreto de potássio, 1,5mM de cloreto de magnésio, 200 µM de mix desoxirribonucleotídeo trifosfato, 25 µM *primers* e 0,5 U de Taq DNA polimerase), água ultrapura foi utilizada para completar o volume final de 50 µL. Um mL de DNA extraído foi adicionado a 50µL da mistura filtrada.

A amplificação foi realizada utilizando os seguintes procedimentos: aquecimento inicial de 95 °C/4 min. seguido de 45 ciclos de 95°C/1 min., 55 °C/2 min., 72 °C/1 min., seguido de uma extensão de 72 °C/3 min., permanecendo refrigerada a 4°C até o uso.

Para a visualização, 3 µL dos produtos amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata, cuja corrida foi executada a 80 V/1h. O amplicon foi visualizado sob luz branca e posteriormente escaneado e armazenado em computador.

Como padrão de localização das bandas de DNA, foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotec, BRA). A caracterização dos fragmentos da PCR dos microrganismos estudados e a sequência de nucleotídeos da região alvo foram elaboradas especificamente para cada um dos microrganismos estudados (Tabela 1).

Tabela 1– Caracterização dos fragmentos da PCR dos microrganismos estudados

Iniciadores	Agente etiológico	Produto de PCR (pb)
SAGAF1 = 5'-TTG CAG CCA GTT GAA GAT CGT-3' SAGAR2 = 5'-ATT CGT GGT GCT GCT GGT GG-3'	<i>Streptococcus agalactiae</i>	350
ECOF1 = 5'-CTG GTC GAC GAC AAG ATG CA-3' ECOR2 = 5'-CTG GAA GAC GAG TAA TTC TC-3'	<i>Escherichia coli</i>	323
RW01 = 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3' DG74 = 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'	Universal	380
KLEBFOR = 5'- GCA CTG CGT GGT GAT GTC GC-3' KLEBREV = 5'- TGT ACC GAC GGG CAA TCT TCA-3'	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	82
LISTFOR = 5'- GCC AGG TAA CGC AAG AAA TAT-3' LISTREV = 5'- GTT CTC CAC CAT TCC CAA GCT-3'	<i>Listeria monocytogenes</i>	72

Para a detecção dos *amplicons* das regiões escolhidas da *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* foi utilizada a técnica da PCRtr realizada no laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica funcional (NUFIGEN-ICB-UFMG) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para a reação da PCRtr foi utilizado o kit SYBR Green PCR core Reagents (PE Biosistemas). Foi utilizado o aparelho ABI Prism 700- (Applied Biosystems) e o aparelho AB Vii A7 (Applied Biosystems), baseado no protocolo para PCRtr desenvolvido pelo NUFIGEN e descrito por Reis (2013), para a realização das reações. Os *primers* (3 pmol cada), 100 ng de DNA genômico extraído das amostras e 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) foram combinados e executados sob condições padrão no Sequence Detection ABI Prism 7000 e no AB Vii A7, como determinado pelo kit. Em todos os ensaios foram incluídos controles positivo e negativo (no-template-PCR). O valor de CT (*threshold cycle*) foi determinado para cada amostra positiva.

Como controle negativo foi utilizada água ultrapura autoclavada e como controle positivo o ácido nucleico total purificado dos microrganismos pesquisados por meio do acondicionamento de colônias de cada espécie bacteriana em frasco com 1 mL de solução de lise e posterior extração de DNA seguindo o método descrito por Grimberg *et al.* (1989).

4.6 Análise estatística dos resultados

Para avaliar as possíveis associações entre as variáveis tempo de RPM, presença de DNA genômico das bactérias, idade gestacional, infecção, escore de Apgar, tipo de parto, dados de hemocultura dos recém-nascidos e aspectos clínicos maternos foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

A comparação entre o tempo de RPM dos recém-nascidos pré-termo e a termo foi realizada pelo teste Mann-Whithney. Para a associação entre o DNA genômico das bactérias e o dados maternos foi utilizado o teste exato de Fisher. Os demais resultados das variáveis deste estudo foram avaliados por meio de estatística descritiva, apresentados em média $\pm$ desvio padrão, sob a forma de tabelas e gráficos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *Software* SPSS, versão 20.0, adotando-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

A idade das gestantes participantes do estudo variou de 14 a 43 anos, sendo a média de $23,71 \pm 6,59$ anos (média $\pm$ desvio padrão). A idade gestacional (IG) variou de 25 a 42 semanas sendo que nas gestações pré-termo a IG média foi de $32,71 \pm 3,53$ semanas e nas gestações a termo foi de $39,34 \pm 1,15$ semanas.

Em 37,3% (n=38) das gestantes participantes foi diagnosticado infecção do trato urinário. Nas gestantes dos recém-nascidos pré-termos este percentual foi de 36,9% (n=31) e nas gestantes dos recém-nascidos a termo este foi de 41,2% (n=7), não havendo associação ($p > 0,05$) entre a idade gestacional e a presença de infecção.

De modo geral, o tempo médio de ruptura de membrana nas gestações pré-termo foi de $72,87 \pm 101,85$ horas, enquanto nas gestações a termo foi de $48,70 \pm 84,14$ horas, não sendo significativa ($p > 0,05$) a diferença do tempo de RPM entre os recém-nascidos pré-termo ou a termo.

Em relação ao tipo de parto, 65,5% (n=55) dos recém-nascidos pré-termo nasceram de parto cesárea e 34,5% (n=29) nasceram de parto vaginal, enquanto que 52,9% (n=9) dos recém-nascidos a termo nasceram de parto cesárea e 47,1% (n=8) nasceram de parto vaginal.

Os recém-nascidos selecionados para o estudo (n=101) estavam em terapia antimicrobiana e apresentaram um ou mais sinais clínicos característicos de infecção neonatal, principalmente cianose e taquipneia independentemente da idade gestacional e tempo de ruptura das membranas amnióticas. Não foram observados recém-nascidos a termo com tempo de RPM de 48 a 71 horas (Figura 1).

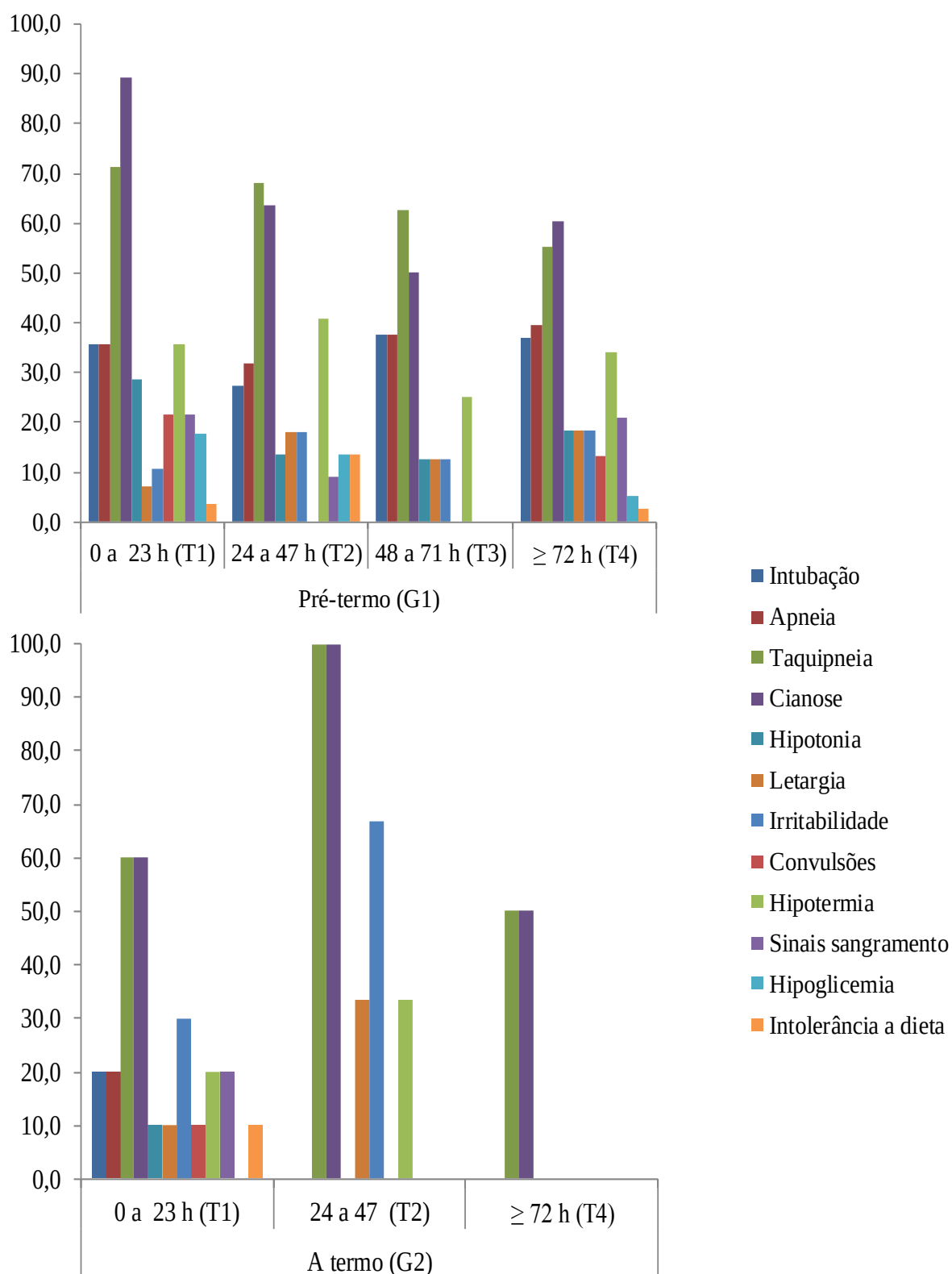


Figura 1 – Sinais clínicos apresentados pelos recém-nascidos pré-termo e a termo com suspeita de infecção neonatal em função dos tempos de ruptura das membranas amnióticas.

A maior parte dos recém-nascidos pré-termo, assim como a termo, apresentou escore de Apgar entre 8 a 10 pontos aos 5 minutos do nascimento (92,8% - n=78; 82,3% - n=13;

respectivamente). Dentre os recém-nascidos pré-termo, 46,4% (n=39) era sexo feminino, enquanto que 53,6% (n=45) eram do sexo masculino. Dentre os recém-nascidos à termo, 41,2% (n=7) era sexo feminino, enquanto que 58,8% (n=10) eram do sexo masculino.

Um recém-nascido não apresentou nota de escore de Apgar no prontuário, sendo excluído da análise. Não houve associação estatística ($p>0,05$) entre a idade gestacional e o escore de Apgar, sexo e tipo de parto. Considerando o tempo de ruptura houve associação ($p<0,05$) entre o tempo de RPM e o tipo de parto. O mesmo não foi observado para escore de Apgar e sexo (Tabela 2).

Tabela 2– Características referentes ao escore de Apgar, sexo e tipo de parto dos recém-nascidos em função do tempo de ruptura prematura das membranas

Características dos Recém-nascidos	Tempo de ruptura das membranas (em horas)				TOTAL	Valor de p ⁽¹⁾
	0 a 23	24 a 47	48 a 71	≥ 72		
	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)		
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)		
Apgar						
0 a 7	62,5 (5)	00,0 (0)	25,0 (2)	12,5 (1)	8,0 (8)	0,06
8 a 10	35,9 (33)	21,7 (20)	6,5 (6)	35,9 (33)	92,0 (92)	
Sexo						
Feminino	41,3 (19)	21,7 (10)	13,0 (6)	24,0 (11)	45,5 (46)	0,11
Masculino	34,5 (19)	18,2 (10)	3,6 (2)	43,6 (24)	54,5 (55)	
Tipo de parto						
Cesárea	28,1 (18) ^b	20,3 (13)	7,8 (5)	43,8 (28)	62,4 (64)	0,04
Vaginal	54,1 (20) ^a	18,9 (7)	8,1 (3)	18,9 (7)	37,6 (37)	

T1: Tempo de ruptura de membranas amniótica 1; T2: Tempo de ruptura de membranas amniótica 2; T3: Tempo de ruptura de membranas amniótica 3; T4: Tempo de ruptura de membranas amniótica 4. ⁽¹⁾ Um recém-nascido não apresentou nota do Escore de Apgar no prontuário, sendo excluído do cálculo. ⁽²⁾ Teste Qui-quadrado. Letras diferentes na coluna apontam a associação entre o tipo de parto vaginal e a ruptura de membranas amnióticas no período entre 0 e 23 horas.

Não foi observada a presença das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* pelo método de hemocultura. No entanto, as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp., *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* foram detectadas em quatro amostras distintas. Em uma única amostra foi detectado o crescimento bacteriano e também de fungos, os quais não foram identificados.

Pela técnica da PCR convencional em gel de poliacrilamida com *primer* universal foi detectado o DNA genômico bacteriano em 93,1% das amostras. A figura 2 representa o gel de poliacrilamida utilizado para demonstrar as bandas específicas do *primer* universal RW01 para a detecção de DNA bacteriano.

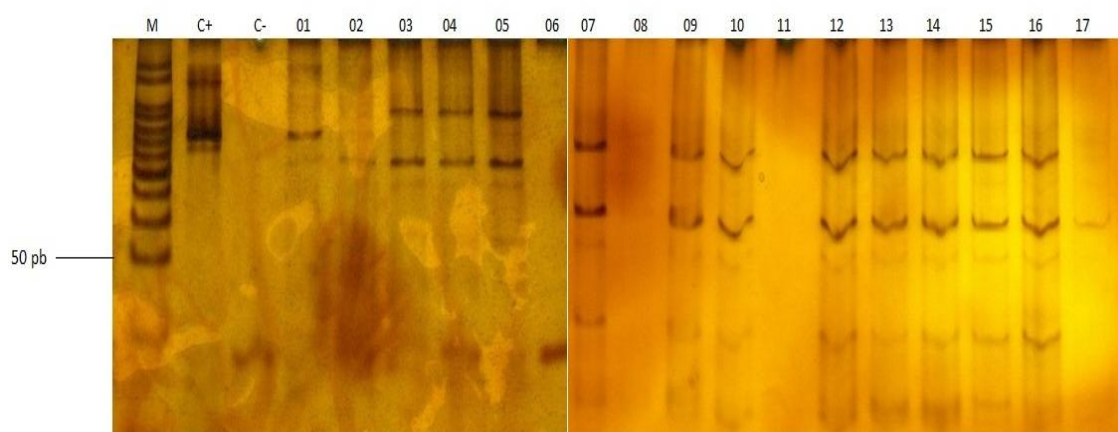


Figura 2 – Resultados positivos das amostras de sangue dos recém-nascidos utilizadas para detecção do DNA genômico bacteriano por PCR utilizando *primer* universal RW01. Amostras de 1 a 17.

O DNA extraído das amostras de sangue dos recém-nascidos foram testados quanto a presença de microrganismos selecionados por meio de *primers* específicos em PCRtr, sendo que, foi detectada a presença do DNA genômico das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae*. A bactéria mais prevalente foi a *Escherichia coli* (64,3% - n=65), seguida da *Listeria monocytogenes* (46,5% - n=47) e *Streptococcus agalactiae* (19,8% - n=20). A bactéria menos prevalente foi a *Klebsiella pneumoniae*, observada em apenas 2,0% (n=2) das amostras (Tabela 3).

Para exemplificação de como são expressos os resultados da análise da PCRtr são apresentados na figuras 3 a 10 os resultados da amplificação dos fragmentos alvos demonstrando a especificidade dos *primers* utilizados observados pelas curvas de amplificação e de dissociação na PCRtr das bactérias *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae*.

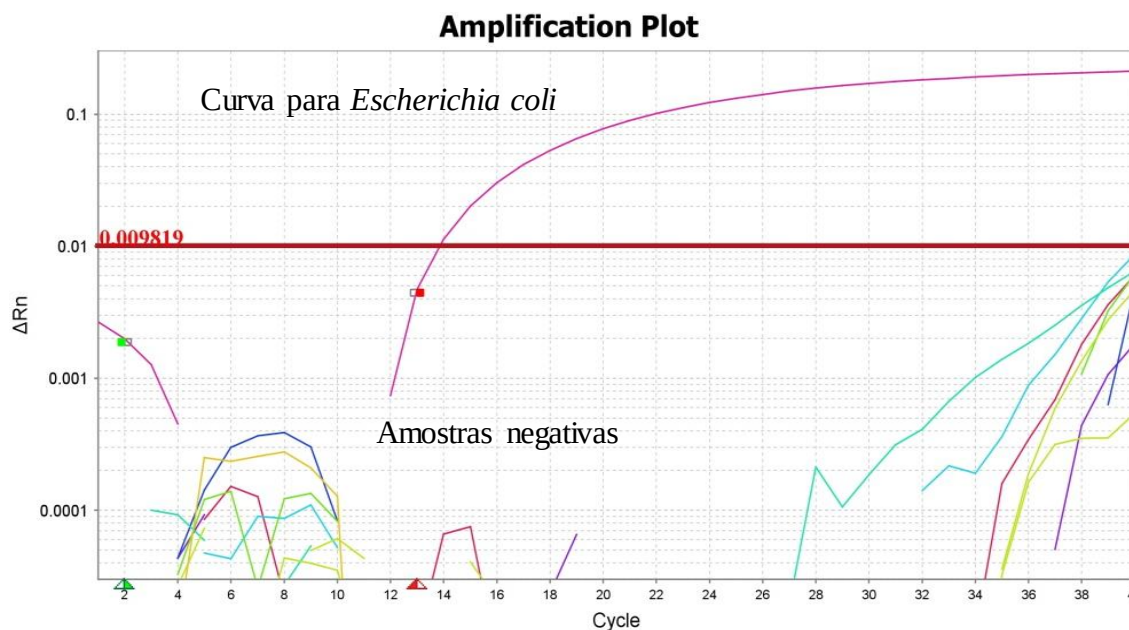


Figura 3 – Resultados típicos obtidos para a amplificação do fragmento alvo para a *Escherichia coli* por meio da PCRtr. Curva para *Escherichia coli* e amostras negativas abaixo do Threshold.

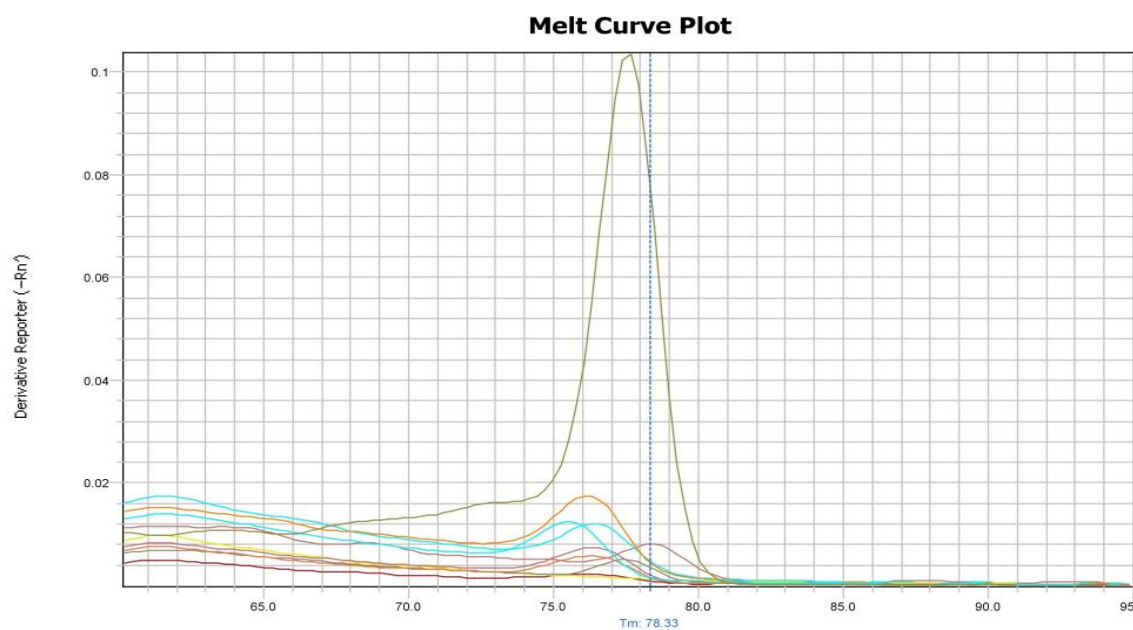


Figura 4 - Resultados típicos obtidos para a amplificação do fragmento alvo para a *Escherichia coli* por meio da PCRtr. Curva de dissociação com amostras padrão e negativas.

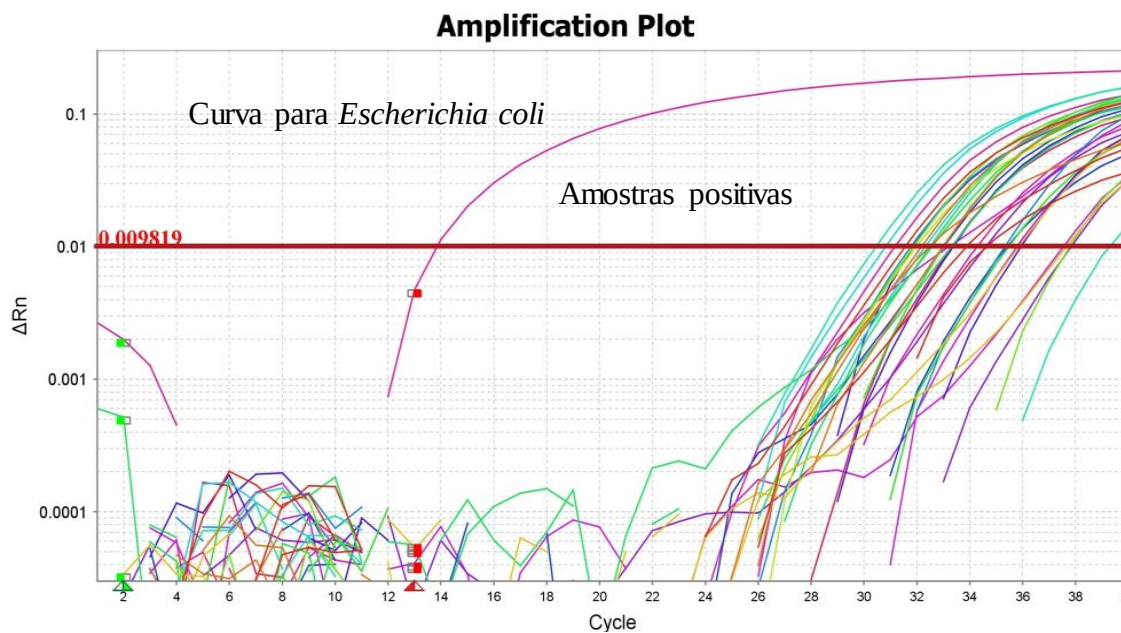


Figura 5 - Resultados típicos obtidos para a amplificação do fragmento alvo para a *Escherichia coli* por meio da PCRtr. Curva para *Escherichia coli* e amostras positivas acima do Threshold.

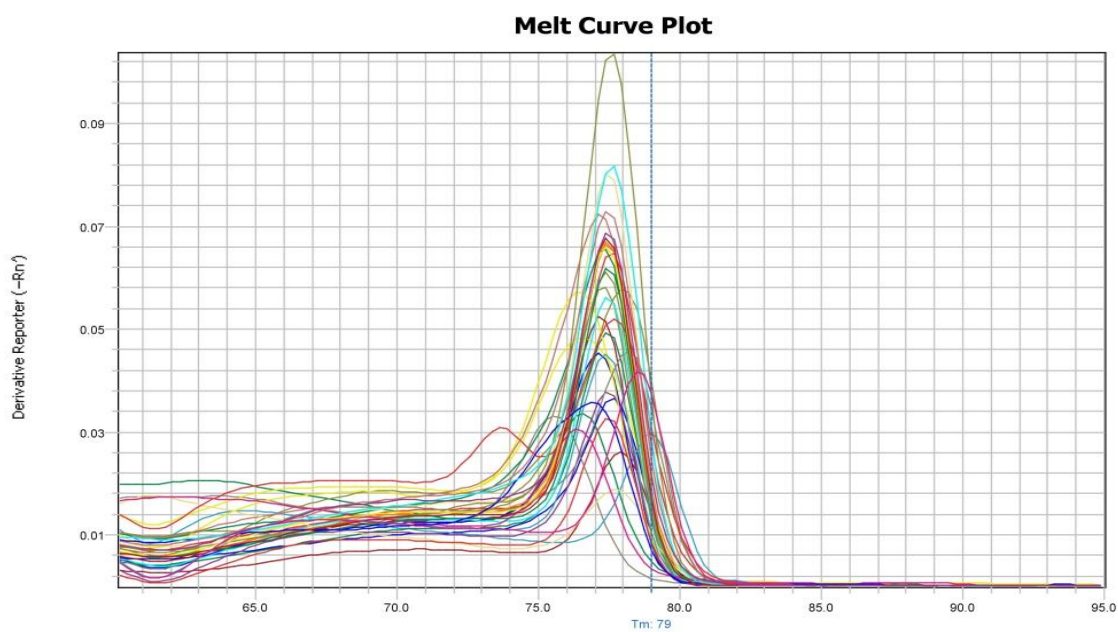


Figura 6 - Resultados típicos obtidos para a amplificação do fragmento alvo para a *Escherichia coli* por meio da PCRtr. Curva de dissociação com amostras padrão e positivas para *Escherichia coli*.

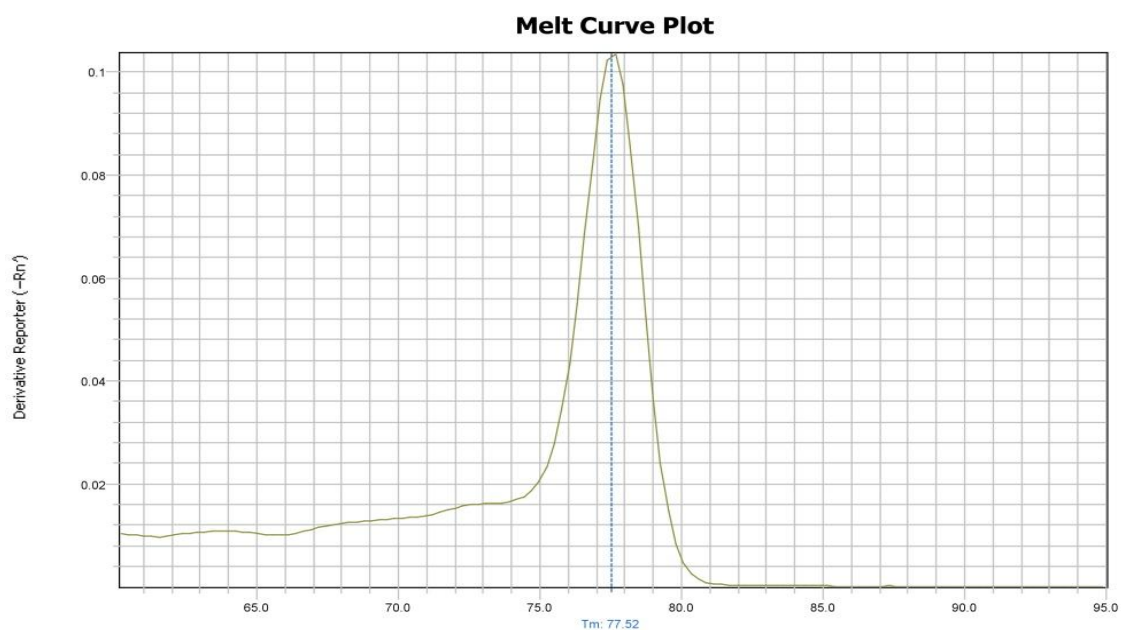


Figura 7 – Resultado típico da curva de dissociação obtida por PCRtr para *Escherichia coli* (EC). Curva para *Escherichia coli*.

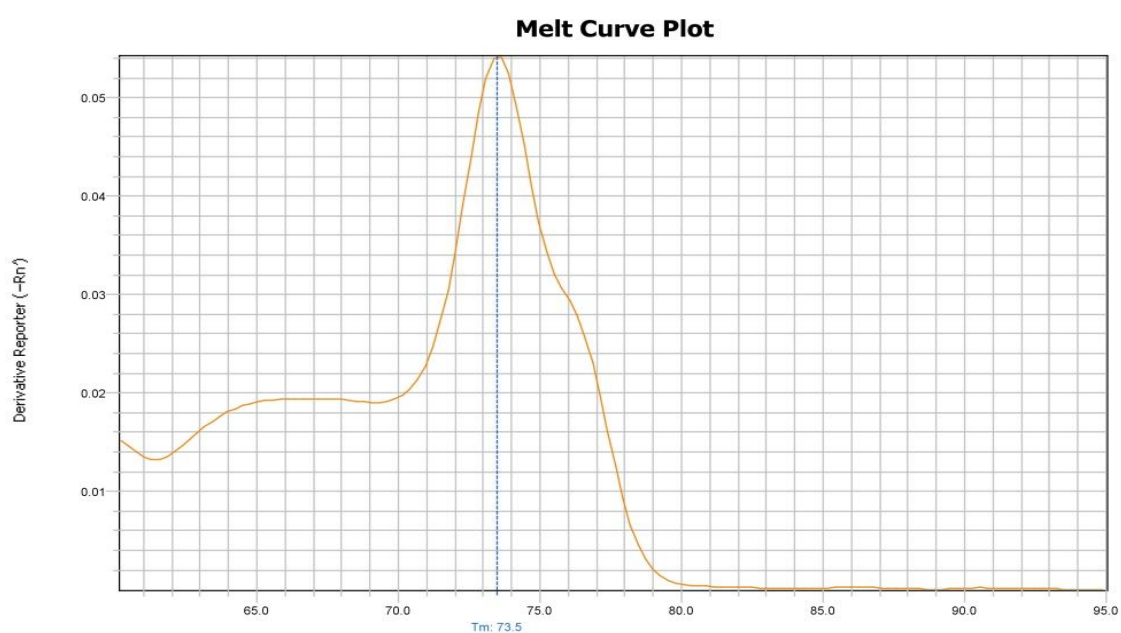


Figura 8 – Resultado típico da curva de dissociação obtidas por PCRtr para *Streptococcus agalactiae*. Curva para *Streptococcus agalactiae*.

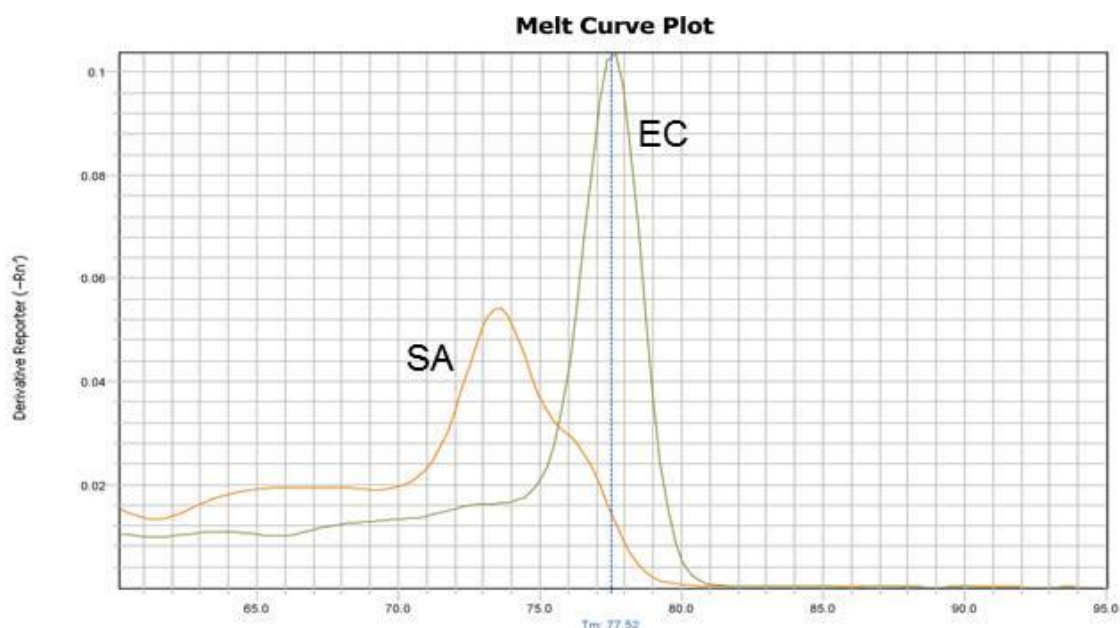


Figura 9 – Resultado típico das curvas de dissociação obtidas por PCRtr para *Escherichia coli* (EC) e *Streptococcus agalactiae* (SA). Reação contendo *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae*.

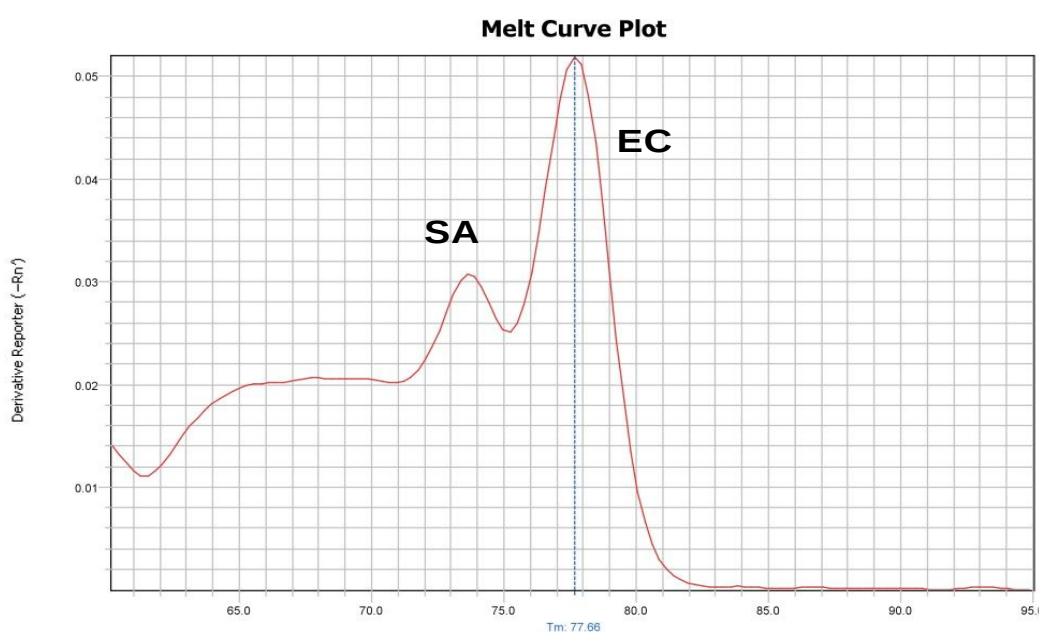


Figura 10 – Resultado típico das curvas de dissociação obtidas por PCRtr para *Escherichia coli* (EC) e *Streptococcus agalactiae* (SA). Sobreposição das curvas dos gráficos.

Estatisticamente não foi observada associação entre o tempo de ruptura de membranas amnióticas com a idade gestacional (pré-termo e a termo). Do mesmo modo que a idade gestacional não apresentou associação com a presença das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e o DNA

genômico de bactérias identificado pelo *primer* universal (Tabela 3). Porém, houve um predomínio da *Escherichia coli* seguida pela *Listeria monocytogenes* nos recém-nascidos pré-termo. Nos recém-nascidos a termo a bactéria mais prevalente foi a *Listeria monocytogenes* seguida pela *Escherichia coli*.

Tabela 3 - Classificação de idade gestacional (pré-termo e a termo) em função do tempo de ruptura prematura das membranas (horas) e a presença de bactérias

Variáveis	Idade gestacional		Total (n=101) % (n)	Valor de p ⁽²⁾
	Pré-termo (G1) (n=84)	À termo (G2) (n=17)		
	% (n)	% (n)		
	Tempo de ruptura das membranas (em horas)			
0 a 23 (T1)	33,3 (28)	58,8 (10)	37,6 (38)	0,09
24 a 47 (T2)	20,2 (17)	17,6 (3)	19,8 (20)	0,81
48 a 71 (T3)	9,5 (8)	0,0 (0)	7,9 (8)	0,40
≥ 72 (T4)	36,9 (31)	23,5 (4)	34,7 (35)	0,43
Presença de bactérias				
<i>Streptococcus agalactiae</i>	22,6 (19)	5,9 (1)	19,8 (20)	0,22
<i>Escherichia coli</i>	67,8 (57)	47,0 (8)	64,3 (65)	0,17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,2 (1)	5,9 (1)	2,0 (2)	0,76
<i>Listeria monocytogenes</i>	42,9 (36)	64,7 (11)	46,5 (47)	0,17
DNA bacteriano ⁽²⁾	92,8 (78)	94,1 (16)	93,1 (94)	0,99

T1: Tempo de ruptura de membranas amniótica 1; T2: Tempo de ruptura de membranas amniótica 2; T3: Tempo de ruptura de membranas amniótica 3; T4: Tempo de ruptura de membranas amniótica 4. G1: Recém-nascidos com idade gestacional ≤ 38 semanas. G2: Recém-nascidos com idade gestacional >38 semanas. ⁽¹⁾ teste Qui-quadrado. ⁽²⁾ *Primer* universal

Não foram identificadas associações entre o tempo de ruptura das membranas e a presença das bactérias estudadas nos recém-nascidos pré-termo e a termo (Tabela 4).

Tabela 4 - Classificação do tempo de ruptura prematura das membranas (horas) em relação a presença de bactérias em recém-nascidos pré-termo e a termo

Número de bactérias por idade gestacional	Tempo de ruptura das membranas (em horas)					Valor de p ⁽¹⁾
	0 a 23 (T1) % (n)	24 a 47 (T2) % (n)	48 a 71 (T3) % (n)	≥ 72 (T4) % (n)	TOTAL % (n)	
Pré termo (G1) (n=84)						
<i>Streptococcus agalactiae</i>	36,8 (7)	31,6 (6)	10,5 (2)	21,1 (4)	22,6 (19)	0,34
<i>Escherichia coli</i>	29,8 (17)	22,8 (13)	7,0 (4)	40,4 (23)	67,8 (57)	0,39
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,2 (1)	0,57
<i>Listeria monocytogenes</i>	36,1 (13)	16,7 (6)	11,1 (4)	36,1 (13)	42,8 (36)	0,87
DNA bacteriano ²	33,3 (26)	20,5 (16)	7,7 (6)	38,5 (30)	92,8 (78)	0,20
À termo (G2) (n=17)						
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	5,9 (1)	0,69
<i>Escherichia coli</i>	62,5 (5)	12,5 (1)	0,0 (0)	25,0 (2)	47,0 (8)	0,87
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,0 (0)	100,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	5,9 (1)	0,16
<i>Listeria monocytogenes</i>	45,5 (5)	18,2 (2)	0,0 (0)	36,4 (4)	64,7 (11)	0,21
DNA bacteriano ⁽²⁾	58,8 (10)	17,6 (3)	0,0 (0)	17,6 (3)	100,0 (17)	0,18

T1: Tempo de ruptura de membranas amniótica 1; T2: Tempo de ruptura de membranas amniótica 2; T3: Tempo de ruptura de membranas amniótica 3; T4: Tempo de ruptura de membranas amniótica 4. G1: Recém-nascidos com idade gestacional ≤ 38 semanas. G2: Recém-nascidos com idade gestacional >38 semanas. ⁽¹⁾ teste Qui-quadrado. ⁽²⁾ Primer universal

Dentre os recém-nascidos pré-termo e a termo 34,9% (n=29) e 17,6% (n=3), respectivamente, não apresentaram nenhuma das bactérias estudadas em seu sangue. Sendo que os demais recém-nascidos apresentaram uma ou mais bactérias em seu sangue (Figura 11). Não houve recém-nascidos a termo com tempo de ruptura de membrana entre 48 e 71 horas e no tempo ≥ 72 horas todos (n=4) os recém-nascidos apresentaram apenas uma bactéria no sangue. Nas figuras 12 e 13 estão apresentados os números de recém-nascidos pré-termo e a termo com DNA genômico das bactérias nos diferentes tempos de ruptura das membranas.

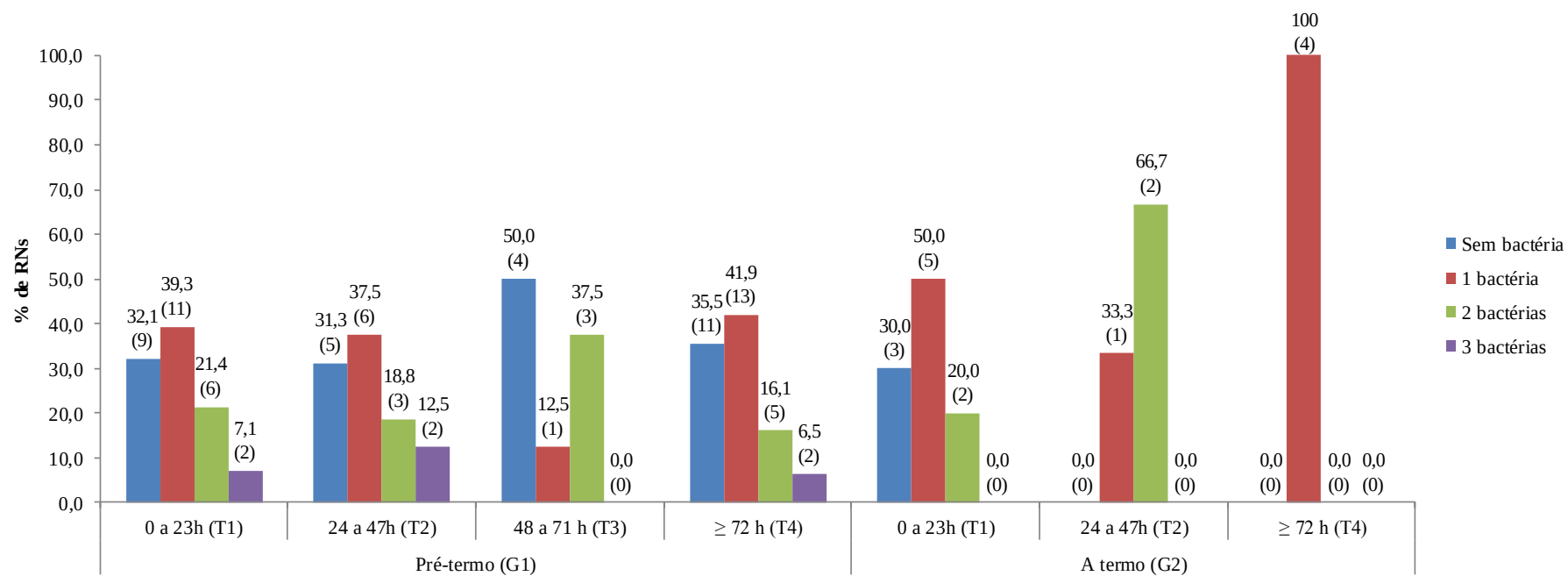


Figura 11 – Percentual de recém-nascidos em função da prevalência das bactérias estudadas.

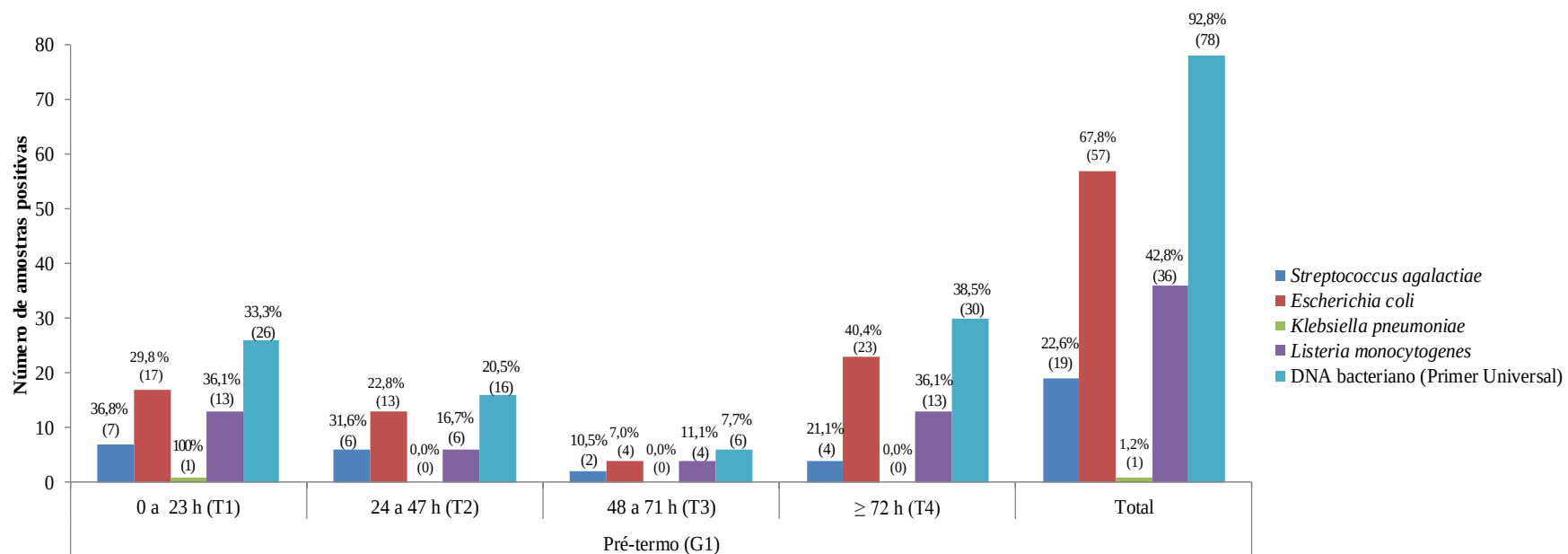


Figura 12 – Presença do DNA genômico das bactérias em função do tempo de ruptura das membranas amnióticas nos recém-nascidos pré-termo.

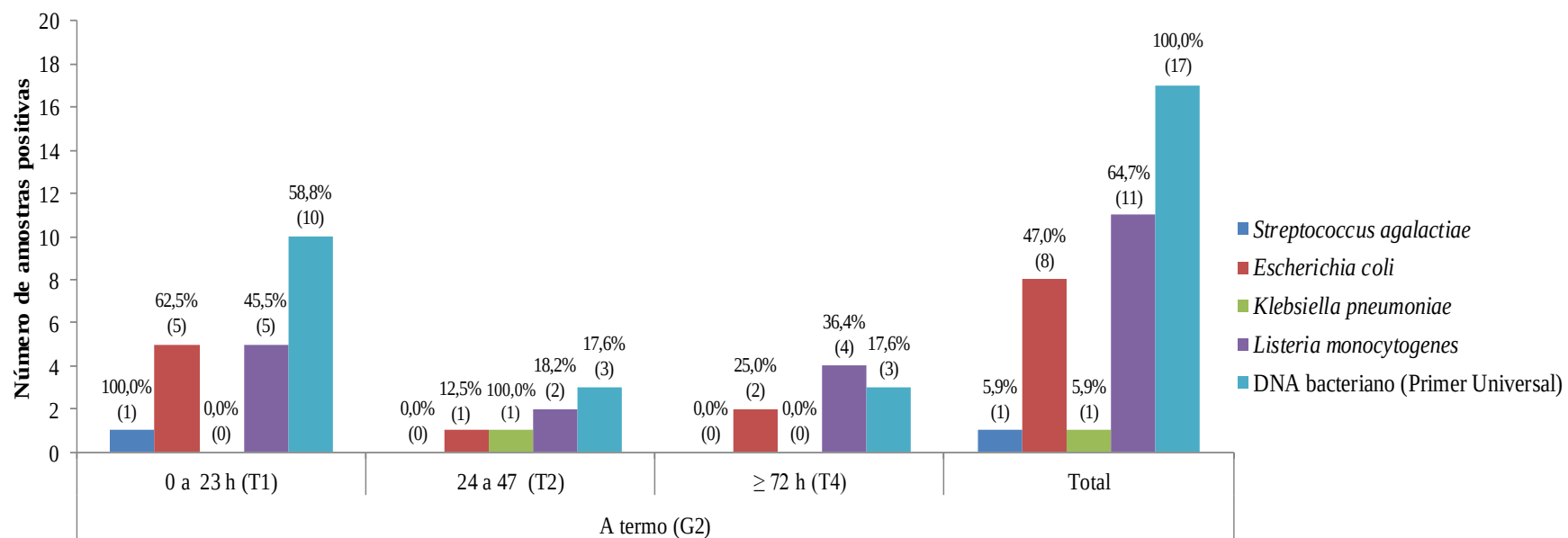


Figura 13 – Presença do DNA genômico das bactérias em função do tempo de ruptura das membranas amnióticas nos recém-nascidos a termo.

Um recém-nascido foi excluído desta análise, pois os dados do prontuário estavam incompletos sem informações hematológicas. Não houve associação entre o tempo de ruptura das membranas e a relação I/T e plaquetas nos recém-nascidos pré-termo e a termo. Por outro lado, apesar de não ser identificada associação significativa entre o tempo de ruptura das membranas e plaquetas nos recém-nascidos pré-termo houve associação significativa entre os recém-nascidos a termo e o número de leucócitos ($p=0,005$), sendo que os 100% dos recém-nascidos cujo tempo de RPM foi de 24 a 72 horas apresentaram leucopenia (Tabela 5).

Tabela 5– Características hematológicas dos recém-nascidos em função do tempo de ruptura prematura das membranas (RPM)

Características hematológicas por Idade gestacional	Tempo de ruptura das membranas (em horas)						Valor de p ⁽¹⁾
	0 a 23 (T1)	24 a 47 (T2)	48 a 71 (T3)	≥ 72 (T4)	TOTAL		
	% n	% n	% n	% n	% n		
Pré termo (G1) (n=83)							
Relação I/T							
<0,2	31,9 (23)	19,4 (14)	9,7 (7)	38,9 (28)	86,7 (72)		0,83
≥0,2	45,5 (5)	18,2 (2)	9,1 (1)	27,3 (3)	13,3 (11)		
Plaquetas							
<150.000	26,7 (4)	20,0 (3)	6,7 (1)	46,7 (7)	18,1 (15)		0,83
≥150.000	35,3 (24)	19,1 (13)	10,3 (7)	35,3 (24)	81,9 (68)		
Leucócitos							
<25.000	33,3 (26)	20,5 (16)	10,3 (8)	35,9 (28)	94,0 (78)		0,51
≥25.000	40,0 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	60,0 (3)	6,0 (5)		
À termo (G2) (n=17)							
Relação I/T							
<0,2	58,3 (7)	16,7 (2)	0,0 (0)	25,0 (3)	70,6 (12)		0,96
≥0,2	60,0 (3)	20,0 (1)	0,0 (0)	20,0 (1)	29,4 (5)		
Plaquetas			0,0 (0)				
<150.000	66,7 (8)	16,7 (2)	0,0 (0)	16,7 (2)	70,6 (12)		0,53
≥150.000	40,0 (2)	20,0 (1)	0,0 (0)	40,0 (2)	29,4 (5)		
Leucócitos							
<25.000	66,7 (10)	6,7 (1) ^b	0,0 (0)	26,7 (4)	88,2 (15)		0,005
≥25.000	0,0 (0)	100,0 (2) ^a	0,0 (0)	0,0 (0)	11,8 (2)		

T1: Tempo de ruptura de membranas amniótica 1; T2: Tempo de ruptura de membranas amniótica 2; T3: Tempo de ruptura de membranas amniótica 3; T4: Tempo de ruptura de membranas amniótica 4. G1: Recém-nascidos com idade gestacional ≤ 38 semanas. G2: Recém-nascidos com idade gestacional >38 semanas. Dados de 1 RN incompletos no prontuário, sem informações hematológicas e portanto, excluídos desta análise. ⁽¹⁾Teste do Qui-quadrado, letras diferentes na coluna indicam associação entre o número de leucócitos e o tempo de ruptura das membranas amnióticas.

Ao associar a relação I/T e a presença do DNA genômico das bactérias no grupo pré-termo foi identificado DNA genômico de todas as bactérias investigadas neste estudo, exceto *Klebsiella pneumoniae* com relação I/T $\geq 0,2$. Para os recém-nascidos a termo, as bactérias *Streptococcus agalactiae* e *Klebsiella pneumoniae* não foram identificadas nos neonatos cuja relação I/T $< 0,2$. Apesar destas evidências, não houve associação entre o DNA genômico bacteriano com a relação I/T $< 0,2$ ou $\geq 0,2$ para nenhuma das bactérias investigadas, independentemente da relação I/T (Tabela 6).

Não foi identificada associação estatisticamente significativa entre a presença das bactérias estudadas e a nota de escore de apgar ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Relação I/T e o escore de Apgar dos recém-nascidos e presença de DNA das diferentes bactérias associadas à infecção neonatal

DNA genômico bacteriano por idade gestacional	Relação I/T		Valor de p	Apgar		Valor de p
	$< 0,2$	$\geq 0,2$		0 a 7	8 a 10	
	% n	% n		% n	% n	
Pré termo (G1)	(n=69)	(n=15)		(n=5)	(n=79)	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	26,1 (18)	6,7 (1)	0,17	40,0 (2)	21,5 (17)	0,68
<i>Escherichia coli</i>	65,2 (45)	80,0 (12)	0,42	80,0 (4)	67,1 (53)	0,91
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,4 (1)	0,0 (0)	0,64	0,0 (0)	1,3 (1)	0,80
<i>Listeria monocytogenes</i>	43,5 (30)	40,0 (6)	0,80	80,0 (4)	40,5 (32)	0,21
DNA bacteriano ¹	94,2 (65)	86,7 (13)	0,64	100,0 (5)	92,4 (73)	0,52
À termo (G2)	(n=11)	(n=6)		(n=3)	(n=14)	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0 (0)	16,7 (1)	0,75	0,0 (0)	7,1 (1)	0,63
<i>Escherichia coli</i>	54,5 (6)	33,3 (2)	0,74	0,0 (0)	57,1 (8)	0,24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0 (0)	16,7 (1)	0,75	33,3 (1)	0,0 (0)	0,38
<i>Listeria monocytogenes</i>	54,5 (6)	83,3 (5)	0,51	66,7 (2)	64,3 (9)	0,94
DNA bacteriano ⁽¹⁾	90,9 (10)	100,0 (6)	0,45	100,0 (3)	92,9 (13)	0,63

G1: Recém-nascidos com idade gestacional ≤ 38 semanas. G2: Recém-nascidos com idade gestacional > 38 semanas.

⁽¹⁾Primer universal

Não houve associação entre febre materna e ITU nas gestações pré-termo em nenhuma das bactérias analisadas neste estudo, independentemente do tempo de ruptura de membrana ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Na tabela 7 é possível observar que não houve associação entre febre materna e ITU em nenhuma das bactérias analisadas neste estudo, independentemente do tempo de ruptura de membrana ($p > 0,05$). Não foi calculada associação entre estas variáveis para as gestantes a termo, pois o número de gestantes com febre e ITU não diferiu entre elas, inviabilizando os cálculos estatísticos, exceto na análise de DNA bacteriano no

momento entre 24 e 47 horas (T2), entretanto, também não houve associação entre elas ($p=1,0$).

Tabela 7– Associação do DNA genômico em função do tempo de ruptura de membranas amnióticas e febre materna e ITU nas gestações pré-termo e a termo

Tempo de ruptura das membranas (em horas)	Presença das bactérias por sintoma materno					
	Pré-termo (G1)			A termo (G2)		
	Febre % n	ITU % n	Valor de $p^{(1)}$	Febre % n	ITU % n	Valor de $p^{(1)}$
<i>Streptococcus agalactiae</i>						
0 a 23 (T1)	14 (1)	71 (5)	0,28	0	100 (1)	-
24 a 47 (T2)	17 (1)	50 (3)	1,0	0	0	-
48 a 71 (T3)	0	0	-	-	-	-
≥ 72 (T4)	0	25 (1)	-	0	0	-
<i>Escherichia coli</i>						
0 a 23 (T1)	12 (2)	59 (10)	1,0	0	60 (3)	-
24 a 47 (T2)	0	38 (5)	-	0	0	-
48 a 71 (T3)	0	25 (1)	-	-	-	-
≥ 72 (T4)	4 (1)	35 (8)	0,35	0	0	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>						
0 a 23 (T1)	0	0	-	0	0	-
24 a 47 (T2)	0	0	-	100 (1)	100 (1)	-
48 a 71 (T3)	0	0	-	-	-	-
≥ 72 (T4)	0	0	-	0	0	-
<i>Listeria monocytogenes</i>						
0 a 23 (T1)	15 (2)	46 (6)	1,0	0	40 (2)	-
24 a 47 (T2)	17 (1)	50 (3)	1,0	100 (2)	50 (1)	-
48 a 71 (T3)	0	50 (3)	-	-	-	-
≥ 72 (T4)	0	23 (3)	-	0	0	-
DNA bacteriano ⁽²⁾						
0 a 23 (T1)	12 (3)	46 (12)	0,58	0	60(6)	-
24 a 47 (T2)	13 (2)	44 (7)	0,17	67 (2)	33 (1)	1,0
48 a 71 (T3)	0	20 (1)	-	-	-	-
≥ 72 (T4)	7 (2)	27 (8)	0,06	0	0	-

T1: Tempo de ruptura de membranas amniótica 1; T2: Tempo de ruptura de membranas amniótica 2; T3: Tempo de ruptura de membranas amniótica 3; T4: Tempo de ruptura de membranas amniótica 4. G1: Recém-nascidos com idade gestacional ≤ 38 semanas. G2: Recém-nascidos com idade gestacional >38 semanas. ⁽¹⁾ Teste exato de Fisher. ⁽²⁾ Primer universal.

6 DISCUSSÃO

A média de idade materna da população deste estudo foi semelhante ao observado por Pierre *et al.* (2003) e Patriota *et al.* (2014). No entanto, alguns autores não a identificaram como fator de risco para o desenvolvimento da ruptura de membranas (HACKENHAAR *et al.* 2014), semelhante a este estudo.

No presente estudo não foi observada a associação entre infecção de trato urinário materno e idade gestacional. No entanto, a presença da infecção do trato urinário materno é um fator que pode ocasionar a RPM. Segundo Krupa *et al.* (2005), a ITU pode desencadear a atividade uterina ou ainda promover alterações na síntese e degradação de colágeno das membranas, portanto a infecção pode preceder a ruptura das membranas.

As manifestações clínicas de sepse são inespecíficas. Sendo necessária a associação de fatores de risco tanto maternos quanto neonatais para se suspeitar de sepse e iniciar a investigação laboratorial no recém-nascido. No entanto, existem apresentações clínicas mais evidentes, como dificuldade respiratória (taquipneia, gemência, retrações torácicas, batimentos de asas nasais), apneia, letargia, febre ou hipotermia, icterícia sem outra causa determinante, vômitos e diarreia, ou ainda manifestações cutâneas, incluindo petéquias, abscesso e escleredema (BRASIL, 2011b).

Os sinais clínicos observados nos recém-nascidos do presente estudo estão de acordo com o apresentado por Vieira (2004). Segundo este autor, os achados clínicos inespecíficos que podem ser interpretados como suspeita de infecção são: recusa alimentar, hipoatividade, irritabilidade ou simplesmente a impressão de que o recém-nascido não está bem. Outros sinais, como: dificuldade respiratória, apneia, letargia, desequilíbrio no controle térmico corporal, icterícia sem causa definida, vômitos, diarreia, petéquias, abscessos e escleredema são mais evidentes e geram um grau de desconfiança mais pronunciado na suspeita de infecção.

No estudo desenvolvido por Pinheiro *et al.* (2007), dos recém-nascidos que foram diagnosticados com sepse neonatal precoce, 75% apresentaram desconforto respiratório, 37,5% hipotermia e 12,5%, hipertermia. A síndrome de má-perfusão foi observada em 37,5%, a icterícia inexplicada em 12,5%, a distensão abdominal em 31,2% e a avaliação subjetiva de “recém-nascido parece não estar bem” foi observada em 12,5%. Outras alterações clínicas significativas foram relatadas em 6,2%.

A ruptura de membrana é um importante fator de risco para o parto cesárea, sendo este tipo de parto uma das principais consequências da RPM, porém sua adoção não é

exclusivamente devido a ocorrência da ruptura (GOLINO et al., 2006). De uma maneira geral a maior frequência de realização do parto cesárea é observada quando a indução do trabalho de parto não é bem sucedida ou quando há urgência para a resolução da gravidez de risco (ROCHA et al., 1999).

De maneira semelhante a este trabalho, Cabral *et al.* (2003) observaram maior incidência de realização de partos cesáreas em gestantes diagnosticadas com RPM. Os autores atribuíram estes resultados a imaturidade do colo uterino, o que por sua vez não possibilita a realização do parto vaginal.

No presente estudo não foi detectado o crescimento das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* na hemocultura. Sendo assim, a viabilidade da hemocultura como técnica de diagnóstico etiológico da infecção neonatal foi questionável.

Supostamente, problemas na técnica de isolamento e identificação dos microrganismos; e uso de antibióticos maternos possam explicar os resultados negativos obtidos na hemocultura. Descarta-se a hipótese de problemas com a colheita do material biológico, uma vez que foram utilizadas todas as técnicas recomendadas e a presença do DNA bacteriano (93,1%) das amostras detectado pela PCR universal, confirmou a presença de DNA genômico das bactérias em associação às manifestações clínicas.

De maneira semelhante ao presente estudo, Silva Junior (2015), que coletou seus dados no mesmo hospital deste estudo, observou que 97% das amostras de hemocultura apresentaram resultados negativos para presença de microrganismos associados à sepse neonatal.

Embora a hemocultura seja considerada como o padrão ouro para o diagnóstico da sepse neonatal, a taxa de resultados positivos foi baixa em outro estudo (CAMACHO-GONZALEZ *et al.*, 2013), fato este que pode dificultar o diagnóstico etiológico de sepse. Além disso, a utilização de antibióticos no anteparto e o volume de sangue para a hemocultura podem limitar a obtenção de resultados fidedignos (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012).

O presente estudo demonstra claramente a limitação da técnica de hemocultura, visto que não foi observada as bactérias alvos do estudo, porém a presença de DNA genômico das bactérias foi demonstrada com a utilização da PCRtr.

Logo, admite-se que é necessário rever o conceito de que a hemocultura é o método padrão ouro para o diagnóstico dos microrganismos associados à sepse. Os trabalhos desenvolvidos por Cezarino *et al.* (2008), Lucignano *et al.* (2011), Tejada *et al.* (2011) e

Labib *et al.* (2013) demonstraram que a PCR é uma técnica mais específica e sensível na identificação dos agentes etiológicos da infecção neonatal. O presente estudo, por sua vez, também reforça este fato.

De maneira semelhante a este estudo, Lajos *et al.* (2008), não observaram resultados positivos na pesquisa de *Streptococcus agalactiae* por meio da hemocultura em neonatos com infecção precoce nascidos de gestantes com trabalho de parto prematuro ou com RPM. Estes autores observaram apenas uma hemocultura positiva para *Streptococcus pneumoniae*, sendo que este agente também estava presente na endocérvice materna, e ainda, atribui à baixa prevalência de hemoculturas neonatais positivas devido ao uso materno de antibiótico profilático durante o período anteparto. Nestes casos, a cultura endocervical materna poderia auxiliar a equipe de neonatologia, visto que a colonização genital por estreptococos do grupo B aumenta significativamente o risco de sepse neonatal precoce por este agente patogênico.

No presente estudo não há informações relacionada à cultura endocervical das gestantes, sendo assim, não se pode afirmar com veemência que os microrganismos alvos do estudo estavam ou não presentes no trato genital das gestantes.

A capacidade de diagnóstico por hemocultura tem melhorado nos últimos anos, com o advento de sistemas automatizados para a monitorização contínua de hemocultura. Embora os sistemas automatizados possam economizar tempo, subculturas para ensaios específicos como testes bioquímicos ainda são necessários para a identificação de bactérias patogênicas. Neste sentido, os avanços na microbiologia molecular forneceram novas ferramentas para a suspeita de diagnóstico da sepse de maneira mais rápida em relação à hemocultura. Com ensaios moleculares os resultados podem ser obtidos em até 12 horas (PAMMI *et al.*, 2014).

A utilização do *primer* universal demonstrou alta incidência de DNA genômico bacteriano nos recém-nascidos corroborando a suspeita do diagnóstico de sepse. Neste sentido, a utilização do *primer* universal é uma importante ferramenta na suspeita do diagnóstico de sepse neonatal.

De maneira semelhante ao presente estudo Dutta *et al.* (2009) explicaram que o uso do *primer* universal na PCR é uma ferramenta precisa e bastante sensível na confirmação do diagnóstico de sepse em recém-nascidos com hemocultura positiva. No entanto, os autores ressaltam que esta ferramenta pode dificultar o diagnóstico caso o recém-nascido já esteja recebendo antibióticos. Os antibióticos além de eliminar o microrganismo também permite a

rápida eliminação do DNA genômico bacteriano da corrente sanguínea ou a observação de DNA genômico de bactéria morta.

Galves (2013), estudando a presença de DNA genômico bacteriano por meio da PCR com a utilização de *primer* universal, observou que esta técnica apresentou índices de amostras positivas muito superiores em relação à técnica de hemocultura, sendo assim esta técnica foi considerada como adequada para a suspeita de diagnóstico de infecção neonatal devido a sua sensibilidade.

Devido aos resultados obtidos a partir da PCR convencional com a utilização do *primer* universal, sendo observado DNA genômico bacteriano (93,1% - (n=94) nas amostras pesquisadas (n=101) surgiu a necessidade de identificar as bactérias presentes nas amostras. Por meio da PCRtr foi identificada a presença das bactérias *Streptococcus agalactiae* (19,8% - n=20), *Escherichia coli* (64,3% - n=65), *Listeria monocytogenes* (46,5% - n=47) e *Klebsiella pneumoniae* (2,0% - n=2).

A *Escherichia coli* foi a bactéria mais prevalente nos recém-nascidos independentemente da idade gestacional e do tempo de RPM. Sendo, portanto, o principal microrganismo associado à infecção. Estes resultados são corroborados por outros trabalhos semelhantes a este, como Miglioli (2009), que também constatou a alta prevalência da bactéria *Escherichia coli* detectada com a utilização da PCRtr em amostras de secreção traqueal, secreção gástrica e sangue periférico proveniente de recém-nascidos com diagnóstico de sepse neonatal no mesmo hospital de coleta deste estudo. Van Den Brand *et al.* (2014) observaram que a *Escherichia coli* foi a bactéria mais prevalente durante o desenvolvimento de ensaio da PCR multiplex em tempo real para o diagnóstico de sepse neonatal precoce e Silva Junior (2015) que utilizou a técnica de PCRtr heptaplex observou 76% (n=114/150) de amostras positivas para *Escherichia coli* em sangue de recém-nascidos com diagnóstico de sepse neonatal, como observado na presente pesquisa.

Atualmente microrganismos gram-negativos tem se destacado como agentes etiológicos da sepse neonatal, principalmente em recém-nascidos prematuros e com baixo peso ao nascer (BERCAITE *et al.*, 2012). Silva Junior (2015), também sugere o predomínio de bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* como responsáveis pela sepse neonatal de início precoce em uma população de recém-nascidos na região centro-oeste do Brasil.

Dentre os microrganismos gram-negativos a *Escherichia coli* tem se destacado como agente etiológico relacionado à infecção neonatal, principalmente em recém-nascidos prematuros ou com baixo peso ao nascer (STOLL *et al.*, 2011; BERCAITE *et al.*, 2012;

TSAI *et al.* 2012). Já, outros autores, como Zaidi *et al.* (2009) demonstraram que a *Escherichia coli* foi a segunda bactéria mais frequente em recém-nascidos diagnosticados com sepse neonatal em países em desenvolvimento, sendo esta bactéria isolada em 15% das amostras. No entanto, este fato não foi observado neste estudo, uma vez que não foi detectada associação entre a idade gestacional e tempo de RPM com a prevalência das bactérias pesquisadas, incluindo a *Escherichia coli*.

O desenvolvimento de diretrizes precocinando a profilaxia intraparto com a utilização de antibióticos, visando à redução dos casos de sepse neonatal causada pela bactéria *Streptococcus agalactiae*, tem ocasionado a redução da incidência de sepse devido a esta bactéria nos últimos anos (BERCAITE *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2012). Corroborando estas informações Zaidi *et al.* (2009) observaram que o *Streptococcus agalactiae* é um dos patógenos menos associados com a sepse neonatal em recém-nascidos em países em desenvolvimento e de acordo com estes autores, apenas 7% dos casos de sepse estão associados a este agente etiológico. Provavelmente este fato esteja relacionado à profilaxia intraparto com a utilização de antibióticos.

A baixa prevalência da bactéria *Streptococcus agalactiae* também foi constatada em outros estudos. Miglioli (2009) utilizando a PCRtr para identificação do DNA genômico de *Streptococcus* em sangue, aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento, observou resultados positivos em 3,13% das amostras de sangue.

Contrapondo o exposto pelos autores supracitados, o presente estudo demonstra que a prevalência da *Streptococcus agalactiae* foi alta, visto que 19,8% das amostras dos recém-nascidos independentemente da idade gestacional e tempo RPM foram positivas para a *Streptococcus agalactiae*. De maneira semelhante a este estudo, Silva Junior (2015) observou 13,3% (n=20/150) de amostras positivas para *Streptococcus agalactiae* em recém-nascidos diagnosticados com sepse neonatal.

Fiolo *et al.*(2012) descrevendo os casos e o perfil microbiológico dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* provenientes de recém-nascidos em um Centro de Referência da Saúde da Mulher na região sudeste do Brasil confirmaram a presença da *Streptococcus agalactiae* em 100% (n=6/6) das amostras provenientes de recém-nascidos com infecção causada pela referida bactéria.

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria pouco pesquisada em estudos de microrganismos patogênicos associados à sepse neonatal. Embora, os poucos trabalhos existentes tenham demonstrado que a incidência deste patógeno é baixa (PINHEIRO *et al.*,

2007; LAZARUS *et al.*, 2013) a sua importância como agente etiológico deve ser valorizada, uma vez que a gravidade da listeriose é dependente das condições imunológicas do indivíduo, sendo assim, esta patologia é preocupante quando os pacientes são gestantes e parturientes que estão em situação de risco.

Gestantes infectadas por *Listeria monocytogenes* podem apresentar sintomas de um resfriado e transmitir a doença ao feto através da placenta causando aborto, parto prematuro ou meningite após o nascimento. O feto pode infectar-se no útero via hematogênica ou via ascendente a partir do trato genital materno, apresentando sinais de pneumonia e apneia; pústulas na face e no corpo; granulomas no fígado, baço e cérebro (SCHWAB; EDELWEISS, 2003).

A alta incidência da *Listeria monocytogenes* nos recém-nascidos deste estudo (46,5% - n=47) demonstra que esta bactéria deve ser considerada como importante agente etiológico da sepse neonatal, sendo necessário o desenvolvimento de estudos para o melhor entendimento acerca da listeriose em neonatos.

No Brasil, Pinheiro *et al.* (2007) observaram a presença da *Listeria monocytogenes* em três recém-nascidos da mesma população. Na França, a incidência de listeriose materna e em recém-nascidos é de 50 casos ao ano (LAZARUS *et al.*, 2013).

A presença de amostras negativas para *Listeria monocytogenes* na hemocultura possivelmente foi devido à administração de antibióticos aos recém-nascidos e às gestantes. Corroborando esta informação, Monnier *et al.* (2011) concluíram que a hemocultura é considerada um método de baixa sensibilidade para detecção da presença de *Listeria monocytogenes* em recém-nascidos que receberam antibióticos. No entanto, o DNA genômico bacteriano deste microrganismo foi isolado com o uso da PCRtr, que se mostrou ser uma técnica muito sensível.

De acordo com Zaidi *et al.* (2009), a ocorrência de sepse neonatal causada por *Listeria monocytogenes* varia de 0,2 a 0,5%. De maneira semelhante Vergnano *et al.* (2011), observaram que na Inglaterra a *Listeria monocytogenes* é responsável por apenas 6% dos casos de sepse neonatal precoce.

Camacho-Gonzalez *et al.* (2012) explicam que a maioria dos casos de listeriose neonatal são causados pelos sorotipos 1, 2 e 4, sendo o último sorotipo responsável pelos casos de meningite. A suspeita de sepse por *Listeria monocytogenes* pode aumentar em recém-nascidos cujas mães tenham consumido leite cru, queijos não pasteurizados ou quaisquer produtos alimentícios não processados e contaminados por esta bactéria.

Nos últimos anos observou-se um aumento significativo no isolamento de *Klebsiella pneumoniae* em amostras clínicas, e a elevada importância deste microrganismo é devida principalmente a sua resistência aos antimicrobianos. Esta bactéria normalmente apresenta um baixo grau de virulência, ocorrendo principalmente em pacientes debilitados ou baixa capacidade de resposta do sistema imunológico. É considerado um patógeno oportunista e, frequentemente, responsável por infecções hospitalares, estando entre os agentes etiológicos de sepse e infecções de ferida operatória (LOPES *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2008).

A *Klebsiella pneumoniae* foi o patógeno com menor prevalência entre os recém-nascidos que compuseram o presente estudo. De maneira semelhante a este estudo, Silva Junior (2015) utilizando a técnica de PCRtr heptaplex relatou prevalência da *Klebsiella pneumoniae* de 5,3% (n=8) em recém-nascidos com sepse neonatal na região centro-oeste do Brasil. No entanto, a incidência de *Klebsiella pneumoniae* em recém-nascidos com sepse neonatal relatada em outras pesquisas científicas é bastante superior a prevalência aqui relatada.

Lopes *et al.* (2008), ao determinarem a frequência e o perfil das infecções hospitalares para neonatos, observaram que a *Klebsiella pneumoniae* foi o microrganismo com maior frequência de isolamento (13,5%). O mesmo foi constatado por Tragante *et al.* (2008) e Santos e Poveda (2012), que observaram a presença desta bactéria em 47% e 23,7% dos recém-nascidos que compunham o seus estudos, respectivamente.

Na Itália, Lucignano *et al.* (2011), utilizando PCR multiplex detectaram *Klebsiella pneumoniae* em 10,1%, enquanto que Labib *et al.* (2013), observaram esta bactéria em 26,9% de recém-nascidos com até 28 dias de idade internados em um centro intensivo de cuidados neonatais no Egito.

Embora no presente estudo não tenha sido observada a associação entre o tempo de ruptura das membranas e a presença do DNA genômico das bactérias estudadas é sabido que esta ruptura de membranas é um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecção neonatal em recém-nascidos, principalmente em prematuros com baixo peso ao nascer, pois possibilita que microrganismos patogênicos que estejam no canal de parto ascendam até o útero podendo então colonizar o feto que por sua vez poderá ou não desenvolver a infecção neonatal. No presente estudo acredita-se que a ausência de associação entre os tempos de ruptura das membranas e infecção neonatal pode ser decorrente da conduta adotada para gestantes com ruptura de membranas.

De uma maneira geral é adotada a conduta conservacionista, na qual a gestante é submetida a antibioticoterapia, cujo o intuito é prolongar a gestação e reduzir os casos de

morbidade perinatal. Assim, acredita-se que a utilização de antibióticos no anteparto nas gestantes que compuseram o estudo tenha impossibilitado a detecção da associação entre ruptura das membranas e infecção neonatal. Além disso, é importante ressaltar que com o agrupamento dos dados referentes à presença do DNA genômico das bactérias estudadas nos diferentes tempos de ruptura reduziu a casuística do estudo, ou seja, proporcionou pequeno número de observações o que possivelmente limitou a detecção do efeito do tempo de ruptura de membranas sobre a presença do DNA genômico das bactérias estudadas pelos métodos estatísticos empregados.

Tanto a literatura nacional quanto internacional elege a bactéria *Streptococcus agalactiae* como um das principais causadoras de sepse neonatal, no entanto, é importante destacar que as condutas adotadas como a administração de antibióticos têm alterado o cenário no tocante aos agentes etiológicos relacionados a esta doença, uma vez que, outros agentes patogênicos como bactérias gram-negativas têm sido mais associadas a esta patologia, a exemplo da *Escherichia coli*. Além disso, como já referenciado, o uso de antibióticos também pode reduzir a sensibilidade da hemocultura na identificação do agente patogênico, fato este que tornou esta técnica pouco adequada neste estudo. Nesse sentido, técnicas moleculares podem contribuir para um diagnóstico mais rápido e sensível, pois por meio da PCR é possível a detecção de microrganismos em recém-nascidos que receberam antibióticos ou que tenham baixa carga bacteriana.

É sugerido que a técnica da PCR, principalmente PRCtr, seja uma rotina nos diagnósticos de sepse precoce por ruptura prematura de membranas nas unidades neonatais de recém-nascidos com suspeita de infecção neonatal.

7 CONCLUSÕES

Houve uma associação clínica e fisiológica de sepse e ruptura prematura de membranas e a presença de DNA genômico de diferentes bactérias.

Independentemente da idade gestacional (pré-termo ou a termo) e do tempo de ruptura das membranas amnióticas foi observado alto percentual (93,1%) de amostras positivas para presença de DNA genômico bacteriano detectado pela PCR convencional com *primer* universal.

Pela técnica de PCRtr foi detectada a presença do DNA genômico das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* porém a presença das referidas bactérias não foram associada aos diferentes tempos de ruptura de membranas nos recém-nascidos pré-termo e a termo, sendo que a bactéria mais prevalente foi a *Escherichia coli* (64,3%), seguida da *Listeria monocytogenes* (46,5%) e *Streptococcus agalactiae* (19,8%).

As bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* não foram observadas quando se utilizou a técnica de hemocultura.

Não houve associação entre o tempo de ruptura das membranas amnióticas e a presença do DNA genômico das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* e hemocultura em recém-nascidos pré-termo e a termo.

Os principais sinais clínicos apresentados pelos recém-nascidos selecionados para o estudo foram cianose e taquipneia. Constatou-se também que os aspectos clínicos maternos como febre e ITU não foram associados à presença do DNA genômico das bactérias alvos deste estudo nos diferentes tempos de ruptura de membranas amnióticas tanto nas gestações pré-termo e a termo.

A técnica de PCR convencional com a utilização do *primer* universal na detecção do DNA genômico bacteriano, bem como a utilização da PCRtr na detecção do DNA genômico das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* demonstraram ser técnicas de diagnóstico mais sensíveis quando comparadas a hemocultura. No entanto, a utilização de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) específicos na PCRtr torna o diagnóstico etiológico de sepse mais fidedigno.

REFERÊNCIAS

- ABAY, S.; AYDIN, F.; SÜMERKAN, A.B. Molecular typing of *Listeria* spp. isolated from different sources. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 59, p. 183-190, 2012.
- ARAÚJO, M. C. K.; FERFEBAUM, R.; VAZ, F.A.C.; RAMOS, J.L.A. Infecção Neonatal, Rotura Prematura de Membranas Amnióticas e Corioamnionite. **Pediatria**, v. 16, p. 95-101, 1994.
- BALLARD, J.L.; KHOURY, J.C.; WEDIG, L.; WANG, L.; EILERS-WALSMAN, B.L.; LIPP, R. New Ballard score, expanded to include extremely premature infants. **The Journal of Pediatrics**, v.119, p.417-23, 1991.
- BASTOS, A.N.; BASTOS, R.V.; DIAS, V.C.; BASTOS, L.Q.A.; SOUZA, R.C.; BASTOS, V.Q.A. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: incidência em laboratório clínico de Juiz de Fora (MG) - 2007 a 2009. **HU Revista**, v. 38, p. 45-49, 2012
- BERALDO, C.; BRITO, A.S.J.; SARIDAKIS, H.O.; MATSUO. Prevalência da Colonização Vaginal e Anorretal por Estreptococo do Grupo B em Gestantes do Terceiro Trimestre. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, p.543-549, 2004.
- BERCAITE, E.; BARTUSEVICIUS, A.; TAMELIENE, R.; MALECKIENE, L.; VITKAUSKIENE, A.; NADISAUSKIENE, R.. Group B streptococcus and *Escherichia coli* colonization in pregnant women and neonates in Lithuania. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**. v.117, p.69-73, 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE AÇÕES PROGRAMÁTICAS E ESTRATÉGICAS. **Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde – cuidados gerais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE AÇÕES PROGRAMÁTICAS E ESTRATÉGICAS. **Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde – Intervenções comuns, icterícia e infecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011b.
- CABRAL, S.A.L.C.S.; COSTA, C.F.F.; CABRAL JÚNIOR, S.F. Correlação entre idade materna, paridade, gemelaridade, síndrome hipertensiva e ruptura prematura de membranas e a indicação de parto cesáreo. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, p. 739-744, 2003.
- CAMACHO-GONZALEZ, A.; SPEARMAN, P.W.; STOLL, B.J. Neonatal Infectious Diseases - Evaluation of Neonatal Sepsis. **Pediatric Clinics of North America**, v.60, p.367-389, 2013.
- CAMPOS, D.P.; SILVA, M.V.; MACHADO, J.R. Early-onset neonatal sepsis: cord blood cytokine levels at diagnosis and during treatment. **Jornal de Pediatria**, v. 86, p. 509-514, 2010.
- CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; GRUMACH, A. S. Peculiaridades da resposta imune do recém-nascido. In: DINIZ, E. M. A.; VAZ, F. A. C. **Infecções congênitas e perinatais**. São Paulo: Atheneu, 1991. p. 1 – 14.
- CASSETTARI, V.C.; SILVEIRA, I.R.; BALSAMO, A.C.; FRANCO, F. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk

neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 313-316, 2006.

CASTELLANO FILHO, D.S.; TIBIRIÇÁ, H.C.; DINIZ, C.G. Doença Perinatal associada aos estreptococos do Grupo B: aspectos clínico-microbiológicos e prevenção. **HU Revista**, v. 34, p. 127-134, 2008.

CAUGHEY, A. B.; ROBINSON, J. N.; NORWITZ, E. R. Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. **Reviews in Obstetrics & Gynecology**, v.1, p.11-22, 2008.

CECCON, M.E.J.; DINIZ, E.M.A.; VAZ, F.A.C.; RAMOS, J.L.A. Imunidade do feto e do recém-nascido. **Pediatria**, v. 19, p. 9-23, 1997.

CEZARINO, B.N.; YAMAMOTO, L.; NEGRO, G.M.B.D.; ROCHA, D.; OKAY, T.S. Diagnosis of neonatal group B Streptococcus sepsis by nested-PCR of residual urine samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.21-24, 2008.

COSTA, A.L.R.; LAMY FILHO, F.; CHEIN, M.B.C.; BRITO, L.M.O.; LAMY, Z.C.; ANDRADE, K.L. Prevalência de colonização por estreptococos do grupo B em gestantes atendidas em maternidade pública da região Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, p. 274-280, 2008.

COSTA, A.L.R.R.; ARAÚJO JÚNIOR, E.; LIMA, J.W.O. Fatores de risco materno associados à necessidade de unidade de terapia intensiva neonatal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, p. 29-34, 2014.

CUCHACOVICH, R. Clinical applications of the polymerase chain reaction: an update. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p. 735-58, 2006.

DINIZ, L.M.O.; FIGUEIREDO, B.C.G. O sistema imunológico do recém-nascido. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, p. 233-240, 2014.

DUTTA, S.; NARANG, A.; CHAKRABORTY, A.; RAY, P.. Diagnosis of Neonatal Sepsis Using Universal Primer Polymerase Chain Reaction Before and After Starting Antibiotic Drug Therapy. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v.163, p.6-11, 2009.

FERREIRA, J.; ANCHIETA, L.M.; JESUS, L.A.; PINTO, F.S.; ARMOND, G.A.; CLEMENTE, W.T.; BOUZDA, M.C.F.; ROMANELLI, R.M.C. Notificação de Infecções em Unidade Neonatal com Critérios Nacionais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v.3, p. 75-81, 2013.

FERREIRA, R.C.; MELLO, R.R.; SILVA, K.S. Neonatal sepsis as a risk factor for neurodevelopmental changes in preterm infants with very low birth weight. **Jornal de Pediatria**, v.90, p.293-299, 2014.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A.; BISPO, A.M.B.; VASCONCELOS, M.M.; M.Z.; CELESTINO, F.G. Infecção do trato urinário na gravidez: aspectos atuais. **FEMINA**, v. 37, p. 165-171, 2009.

FIOLO, K.; ZANARDI, C.E.; SALVADEGO, M. Taxa de infecção e sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, p. 544-549, 2012.

FUNÇÃO, J.M.; NARCHI, N.Z. Pesquisa do estreptococo do Grupo B em gestantes da Zona Leste de São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 47, p.22-29, 2013.

GALVES, TCB. **Determinação de DNA genômico de bactérias em neonatos com suspeita de sepse utilizando primer universal**. 79f. (Dissertação). Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2013.

GEME, J. W.; BELL, L. M.; BAUMGART, S.; DANGIO, C. T.; HARRIS, M. C. Distinguishing sepsis from blood cultures growing coagulase-negative staphylococci. **The Journal of Pediatrics**, v. 86, p.157 – 62, 1990.

GEME, J.W.; MURRAY, D.L.; CARTER, J.; HOBEL, C.J.; LEAKE, R.D.; ANTHONY, B.F.; THIBEAULT, D.C.; ROSS, I.B.; DRAGE, J.S. *et al.* Perinatal bacterial infection after prolonged rupture of amniotic membranes: an analysis of risk and management. **The Journal of Pediatrics**, v. 104, p. 608 – 13, 1984.

GERNA,G.; FURIONE, M.; BALDANTI, F.; PERCIVALLE, E.; COMOLI, P.; LACTELLI, F. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients. **British Journal of Haematology**, v. 91, p.674-83, 1995.

GLASER, P.; RUSNIOK, C.; BUCHRIESER, C.; CHEVALIER, F.; FRANGEUL, L.; MSADEK, T.; ZOUINE, M.; COUVÉ, E.; LALIOUI, L.; POYART, C.; TRIEU-CUOT, P.; KUNST, F. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. **Molecular Microbiology**, v.45, p. 1499-1513, 2002.

GOLINO, P.S.; CHEIN, M.B.C.; BRITO, L.M.O. Ruptura Prematura de Membranas: Fisiopatologia, Diagnóstico e Conduta. **Femina**, v. 34, p. 711-717, 2006.

GOULART, A.P.; VALLE, C.F.; DAL-PIZZOL, F.; CANCELIER, A.C.L. Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Sepse Neonatal Precoce em Hospital da Rede Pública do Brasil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, p.148-153, 2006.

GRASSI, M. S.; DINIZ, E. M. A.; VAZ, F. A. C.. Métodos laboratoriais para diagnóstico da infecção neonatal precoce por *Streptococcus beta hemolítico* do Grupo B. **Pediatria**, v. 23, p, 232-40, 2001.

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, p. 8390, 1989.

GUERINA, N. G. Bacterial and fungal infections, In: CLOHERTY, J. P.; STARK, A. R. **Manual of neonatal care**. 3. ed. Boston: Little Brown, p. 146 – 169, 1991.

GUIRAL, E.; BOSCH, J.; VILA, J.; SOTO, S.M. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: relationship with virulence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, p.170–173, 2011.

HACKENHAAR, A.A.; ALBERNAZ, E.P.; FONSECA, T.M.V. Preterm premature rupture of the fetal membranes: association with sociodemographic factors and maternal genitourinary infections. **Jornal de Pediatria**, v.90, p.197-202, 2014.

HERBST, A.; KÄLLÉN, K. Time between membrane rupture and delivery and septicemia in term neonates. **Obstetrics & Gynecology**, v.110, p.612-618, 2007.

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, p. 2574-2578, 2000.

KACEROVSKY, M.;MUSILOVA, I.; ANDRYS, C.; HORNYCHOVA, H.; PLISKOVA, L.; KOSTAL, M.; JACOBSSON, B. Prelabor rupture of membranes between 34 and 37

weeks: The intraamniotic inflammatory response and neonatal outcomes. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.210, p.325-335, 2014.

KISS, F.S.; ROSSATO, J.S.; GRAUDENZ, M.S.; GUTIERREZ, L.L.P. Prevalência da colonização por *Streptococcus agalactiae* em uma amostra de mulheres grávidas e não grávidas de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. **Scientia Medica**; v. 23, p. 169-174, 2013.

KLEIN, J. O.; MARCY, S. M. Bacterial sepsis and meningitis. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 3. ed. Phila, W. B. Saunders. p. 610 – 44, 1990

KRUPA, F.G.; CECATTI, J.G.; PIRES, H.M.B.; SURITA, F.; TEDESCO, R.P. Rotura prematura de membranas em gestações a termo: Revisão sobre condutas. **Revista de Ciências Médicas**, v.14, p.287-294, 2005.

LABIB, A.Z.; MAHMOUD, A.B.; EISSA, N.A.A.; EL GENDY, F.; SOLIMAN, M.A.; ALY, A.A. Early Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Molecular Approach and Detection of Diagnostic Markers Versus Conventional Blood Culture. **International Journal of Microbiological Research**, v.4, p.77-85, 2013.

LAJOS, G.J.; PASSINI JUNIOR, R.; NOMURA, M.L.; AMARAL, E.; PEREIRA, B.G.; MILANEZ, H.; PARPINELLI, M.A. Colonização bacteriana do canal cervical em gestantes com trabalho de parto prematuro ou ruptura prematura de membranas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, p. 393-399, 2008.

LARSSON, S.; CEDERBERG, A.; IVARSSON, S.; SVANBERG, L.; CRONBERG, S. *Listeria monocytogenes* causing hospital-acquired enterocolitis and meningitis in newborn infants. *British Medical Journal*, v. 6135, p. 473–474, 1978.

LAZARUS, C.; LECLERCQ, A.; LECUIT, M.; VAILLANT, V.; COIGNARD, B.; BLANCHARD, H.; NOVAKOVA, I.; ASTAGNEAU, P. Probable nosocomial transmission of listeriosis in neonates, **Journal of Hospital Infection**, v.85, p.159-160, 2013.

LINHARES, J.J.; CAVALCANTE NETO, P.G.; VASCONCELOS, J.L.M.; SARAIVA, T.V.; RIBEIRO, A.M.F.; SIQUEIRA, T.M.; ROCHA, F.R. Prevalência de colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas em maternidade do Ceará, no Brasil, correlacionando com os resultados perinatais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.33, p. 395-400, 2011.

LOPES, G.K.; ROSSETTO, E.G.; BELEI, R.A.; CAPOBIANGO, J.D.; MATSUO, T. Estudo epidemiológico das infecções neonatais no Hospital Universitário de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 30, p. 55-63, 2008.

LUCIGNANO, B.; RANNO, S.; LIESENFELD, O.; PIZZORNO, B.; PUTIGNANI, L.; BERNASCHI, P.; MENICHELLA, D. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p.2252-2258, 2011.

MANNING, S. D.; NEIGHBORS, K.; TALLMAN, P.A.; GILLESPIE, B.; BORCHARDT, S.M.; BAKER, C.J.; PEARLMAN, M.D.; FOXMAN, B. Prevalence of Group B *Streptococcus* colonization and potential for transmission by casual contact in healthy Young men and women. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 380-388, 2004.

MARCONI, C.; ROCCHETTI, T.T.; RALL, V.L.M.; CARVALHO, L.R.; BORGES, V.T.M.; SILVA, M.G. Detection of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant

women by using combined swab cultures: cross-sectional prevalence study. **São Paulo Medical Journal**, v. 128, p. 60-62, 2010.

MATALOUN, M.M.G.B.; PRESCINOTTI, E.A.P.; ARCAS, R.A.M.; RAMOS, J.L.A.; LEONE, C.R. Ruptura prolongada de membranas e infecção neonatal. **Jornal de Pediatria**, v. 73, p. 311-316, 1997.

MENEZES, E.A.; ALENCAR, A.M.; CUNHA, F.A.; ÂNGELO, M.R.F.; SALVIANO, M.N.C.; OLIVEIRA, I.R.N. Frequência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemoculturas no berçário de um hospital de Fortaleza, **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, p. 7-11, 2008

MIGLIOLI, A.M.D. **DNA genômico de Streptococos e Escherichia coli em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento**. 81f. (Tese) Doutorado em Ciências da Saúde - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2009.

MIGLIOLI, A.M.D. **PCR Multiplex para o diagnóstico precoce de Streptococos e Escherichia coli no sangue de cordão umbilical e placenta na hipótese de infecção neonatal**. 146f. (Dissertação) Mestrado em Medicina - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2003.

MONNIER, A.L.; ABACHIN, E.; BERETTI, J-L.; BERCHE, P.; KAYAL, S. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by Real-Time PCR for the hly gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.3917-3923, 2011.

MOREIRA, M.; LEMOS, S.; NETO, S.; OLIVEIRA, M. Prevention of early-onset group B Streptococcal disease in newborns in the 21st century: from past to future. **Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa**, v.7, p.180-189, 2013.

MOROBÉ, I.C.; OBI, C.L.; NYILA, M.A.; MATSHEKA, M.I.; GASCHÉ, B.A. Molecular Characterization and Serotyping of *Listeria monocytogenes* with a Focus on Food Safety and Disease Prevention. In: JIMENEZ-LOPEZ, J.C. **Biochemical Testing**, p. 197-216, 2012. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/biochemical-testing/molecular-characterization-and-serotyping-of-listeriamonocytogenes-isolates-from-various-foods-in-g> >. Acesso em 27 Jan. 2015

MUSSI-PINHATA, M.; REGO, M.A.C. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo: um desafio para a prevenção da sepse hospitalar. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p. 59-68, 2005.

NASCIMENTO, D. J. Profilaxia da transmissão vertical do GBS (Streptococcus Beta Hemolítico): quando tratar. **REVISTA SOGIPA**, v.22, 2002.

NAZARKO, J.; MIGLIOLI, A.M.D. Identificação de *Escherichia coli* no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos na Santa Casa de Campo Grande – MS. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v.14, p. 57-63, 2011.

NOMURA, M.L.; PASSINI JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, U.M.; KALIL, R. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, p.397-403, 2009.

OHLSSON, A.; VERNCOMBE, M. Congenital and nosocomial sepsis in infants born in a regional perinatal unit: cause, outcome, and white blood cell response. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 156, p. 407 – 13, 1987.

- PAMMI, M.; FLORES, A.; LEEFLANG, M. Molecular assays in the diagnosis of neonatal sepsis: A systematic review and meta-analysis. **Pediatrics**, v.128, 973-986, 2014.
- PATRIOTA, A.F.; GUERRA, G.V.Q.; SOUZA, A.S.R. Ruptura prematura das membranas antes da 35ª semana: resultados perinatais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.36, p.296-302, 2014.
- PAULA, G.M.; SILVA, L.G.P.; MOREIRA, M.R.; BONFIM, O. Repercussões da amniorrexe prematura no pré-termo sobre a morbimortalidade neonatal. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, p.2521-253, 2008.
- PEREIRA, C.; DIAS, A.; OLIVEIRA, H.; RODRIGUES, F. Bacteriêmias por *Escherichia coli* num serviço de urgência pediátrica (1995-2010). **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, p. 207-212, 2011.
- PÉREZ-TRALLERO, E.; ZIGORRAGA, C.; ARTIEDA, J.; ALKORTA, M.; MARIMÓN, J.M. Two Outbreaks of *Listeria monocytogenes* Infection, Northern Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, p.2155-2157, 2014.
- PIERRE, A.L.M.; BASTOS, G.Z.G.; OQUENDO, R.; ALENCAR JÚNIOR, C.A. Repercussões Maternas e Perinatais da Ruptura Prematura das Membranas até a 26ª Semana Gestacional. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, p.109-114, 2003.
- PINHEIRO, R.S.; FERREIRA, L.CL.L.; BRUM, I.R.; GUILHERME, J.P.; MONTE, R.L. Estudos dos fatores de risco materno associados à sepse neonatal precoce em hospital terciário da Amazônia Brasileira. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, p. 387-395, 2007.
- PODSCHUN, R.; ULLMAN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy Typing Methods, and Pathogenicity Factors, **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 589–603, 1998.
- POGERE, A.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; FREITAS, P.F.; D'ACAMPORA, A.J.; ZUNINO, J.N. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas em ambulatório de pré-natal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, p.174-180, 2005.
- POLIN, R.; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN. Management of neonates with suspect or proven early-onset bacterial sepsis. **Pediatrics**, v. 129, p.1006-1015, 2012.
- REIS, R.B.J. **Prevalência de DNA genômico para *Staphylococcus epidermidis* plasmôcoagulase negativa em neonatos pré-termo maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção**. 64f. (Dissertação) Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2013.
- RICCI, S. S. **Enfermagem Materno Neonatal e saúde da Mulher**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008, 736p.
- ROCHA, J. E. S.; TOMAZ, A.C.P.; ROCHA, D.B.; BEZERRA, A.F.; LOPES, A.L.C.; BRENDA, A.M.O.; SOUZA, S.D.A. Morbidade Materna e Morbimortalidade Perinatal Associada à Infecção Ascendente na Rotura Prematura das Membranas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, p. 15-20, 2002.
- ROCHA, J.E.S.; DUARTE, G.; CUNHA, S.P.; NOGUEIRA, A.A.; MAUAD FILHO, F. Antibioticoprofilaxia com Ampicilina na Rotura Prematura das Membranas. Estudo Randomizado e Duplo Cego. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.21, p.251-258, 1999.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SANTOS, A.P.S.; SILVA, M.L.C.; SOUZA, N.L.; MOTA, G.M.; FRANÇA, D.F. Diagnósticos de enfermagem de recém-nascidos com sepse em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.22, p. 255-261, 2014.

SANTOS, M.C.P.; POVEDA, V.B. Microbiological profile of cultures in a neonatal intensive care unit. **Journal of Nursing**, v. 5, p. 1165-1172, 2012.

SCHUCHAT, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. **Clinical Microbiology Reviews**, 11:497-513, 1998.

SCHUCHAT, A., HILGER, T., ZELL, E. *et al.* Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.7, p.92-99, 2001.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 111-114, 2003.

SILVA JUNIOR, W.P. **Desenvolvimento e aplicação de um teste de PCR multiplex para a detecção rápida dos principais patógenos bacterianos na sepse neonatal precoce**. 99f. (Dissertação) - Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2015.

SILVEIRA, R.C.; GIACOMINI, C.; PROCIANOY, R.S. Sepse e choque séptico no período neonatal: atualização e revisão de conceitos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.22, p.280-290, 2010.

SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S. Uma revisão atual sobre sepse neonatal. **Boletim Científico de Pediatria**, v.1, p. 29-35, 2012.

STOLL, B.J.; HANSEN, N.I.; SÁNCHEZ, P.J.; FAIX, R.G.; POINDEXTER, B.B.; VAN MEURS, K.P.; BIZZARRO, M.J.; GOLDBERG, R.N.; FRANTZ III, I.D.; HALE, E.C.; SHANKARAN, S.; KENNEDY, K.; CARLO, W.A.; WATTERBERG, K.L.; BELL, E.F.; WALSH, M.C.; SCHIBLER, K.; LAPTOOK, A.R.; SHANE, A.L.; SCHRAG, S.J.; DAS, A.; HIGGINS, R.D.; EUNICE KENNEDY SHRIVER NATIONAL INSTITUTE OF CHILD HEALTH AND HUMAN; DEVELOPMENT NEONATAL RESEARCH NETWORK. Early Onset Neonatal Sepsis: The Burden of Group B Streptococcal and *Escherichia coli* Disease Continues. **Pediatrics**, v.127, p. 816-826, 2011.

TEJADA, B. M.; PFISTER, R.E.; RENZI, G.; FRANÇOIS, P.; IRION, O.; SCHRENZEL, J. Intrapartum group B streptococcus detection by rapid polymerase chain reaction assay for the prevention of neonatal sepsis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1786–1791, 2011.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of comensal *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.8, p.207-217, 2010.

TRAGANTE, C.R.; CECCON, M.E.J.R.; FALCÃO, M.C.; SEITI, M.; SAKITA, N.; VIEIRA, R.A. Prevalência de sepse por bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal. **Revista Paulista de Pediatria**, v.1, p.59-63, 2008.

TSAI, C-H.; CHEN, Y-Y.; WANG, K-G.; CHEN, C-Y.; CHEN, C-P. Characteristics of early-onset neonatal sepsis caused by *Escherichia coli*. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.51, p.26-30, 2012.

VAN DEN BRAND, M.V.D.; PETERS, R.P.H.; CATSBURG, A.; RUBENJAN, A.; BROEKE, F.J.; VAN DEN DUNGEN, F.A.M.; VAN WEISSENBRUCH, M.M.; VAN FURTH, A.M.; KÖRESSAAR, T.; REMM, M.; SVELKOU, P.H.M.; BOS, M.P. Development of a multiplex real-time PCR assay for the rapid diagnosis of a neonatal late onset sepsis. **Journal of Microbiological Methods**. V.106, p.8-15, 2014.

VERGNANO, S.; MENSON, E.; KENNEA, N. Neonatal infections in England: the NeonIN surveillance network. **Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition**, v.96, p. F9–F14, 2011.

VIEIRA, A.A. **Sepse no período neonatal**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 564p.

WARREN, W.P.; BALCAREK, K.; SMITH, R.; PASS, R.F. - Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with isolation in tissue culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p.786-9, 1992.

WILSON, C. B. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 17 – 56, 1990.

WRIGHT, P.A.; WYNFORD, T.D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **The Journal of Pathology**, v. 162, p. 99-117, 1990.

ZAIDI, A.K.M.; THAYER, D.; ALI, S.A.; KHAN, T.A. Pathogens associated with sepsis in newborns and Young infants in developing countries. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.28, p. 10-18, 2009.

ZANGWILL, K. M.; SCHUCHAT, A.; WENGER, J. D. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. **MMWR Surveillance Summary**, v. 41, p.25-32, 1992.

ZUGAIB, M. **Obstetrícia**. Barueri: Editora Manole, 2008. 1344p.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado à parturiente e/ou responsável legal pelo recém-nascido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador: Kelly Lopes de Araújo Appel

Orientador: Durval Batista Palhares

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, de uma pesquisa médico-científico. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado(a) de forma alguma.

Título do Projeto: ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA GENÔMICO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* E *ESCHERICHIA COLI* EM SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS COM TEMPO DE ROTURA PREMATURA DE MEMBRANA EM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS.

Pesquisador Responsável: Durval Batista Palhares

Telefone para contato: (67) 3345-3113

Pesquisadora participante: Kelly Lopes de Araújo Appel

Telefones para contato: (67) 33815006/ (67) 92999506

A infecção, no período neonatal, constitui-se uma das grandes preocupações do setor de pediatria, por ser patologia difícil de ser reconhecida e comprovada, simultaneamente grave, e apresentar índices de mortalidade que variam de 20 a 75%.

A infecção neonatal pode ser congênita (recém-nascido adquire durante a gestação), adquirida durante o parto, ou adquirida após o parto. As características epidemiológicas, a evolução clínica e o prognóstico diferem entre estes tipos de infecções. A forma adquirida antes ou durante o parto é que será alvo desta exposição.

Essa infecção precoce do período neonatal costuma manifestar-se principalmente nos primeiros três dias após o parto, sendo que grande parte dos recém-nascidos com esse tipo de infecção já estão sintomáticos no momento do parto ou nas primeiras 48 horas de vida e aqueles que apresentam manifestações clínicas, antes de 24 horas de vida, têm maiores índices de mortalidade.

O objetivo desta pesquisa será identificar a presença de infecção neonatal congênita, correlacionando o tempo de bolsa rota (ruptura prematura de membranas), com as diferentes idades gestacionais, pesquisando duas bactérias frequentes chamadas *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, responsáveis por essas infecções.

Poderão participar recém-nascidos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) e Unidade Intermediária Neonatal (UIN) do HUMAP/UFMS/EBSERH, Maternidade Cândido Mariano e Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS), nascidos de mães que apresentaram bolsa rota (ruptura prematura de membrana) por tempo prolongado.

O sangue será colhido no momento do parto, do coto umbilical ou de veia periférica, aproveitando a oportunidade de coleta de material da rotina do serviço e analisado laboratorialmente. Esse procedimento será realizado de forma asséptica, sem nenhum prejuízo ao recém-nascido, pois estaremos em observância das normas de biossegurança de modo a minimizar possíveis riscos de infecção hospitalar. Todo material biológico (0,5 ml - sangue) coletado do recém-nascido, após análise da pesquisa, será descartado após tratamento regulamentado de acordo com o Programa Nacional de Controle de Qualidade que observa os regulamentos do Departamento de Inspeção de qualidade e Acreditação (DICQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), disponível em: <http://www.pncp.org.br/participantes/procedimentos.asp>. Este termo de consentimento possibilitará também o armazenamento adequado da amostra de sangue para posterior utilização em pesquisas sobre doenças infecciosas em recém-nascidos.

Durante o tempo de pesquisa, o responsável pelo recém-nascido estará sendo informado sobre a pesquisa e seus resultados, e se apresentar algum prejuízo no tratamento, terá garantia de ressarcimento e indenização aos danos causados.

Essa pesquisa auxiliará os pesquisadores inerentes aos tratamentos em recém-nascidos que nascem com infecções neonatais, terem mais confirmações sobre o método mais eficaz de tratamento médico e recuperação do recém-nascido internado, ou que possa ter riscos para adquirir infecções.

Voltamos a lembrar de que a participação é voluntária e que não perderá qualquer benefício a que tenha direito, caso não concorde em participar deste estudo, podendo até mesmo participar de outros estudos da Universidade.

Após ler, entender e esclarecer todas as dúvidas assine o termo anexo se concordar em participar voluntariamente desta pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO, LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG nº _____ SSP/_____
 responsável pela paciente _____, com registro
 nº _____, no Hospital _____,
 voluntariamente dou o meu consentimento para a participação no estudo **“ASSOCIAÇÃO
 DA PRESENÇA DE DNA GENÔMICO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* E
ESCHERICHIA COLI EM SANGUE DE RECÊM-NASCIDOS COM TEMPO DE
 ROTURA PREMATURA DE MEMBRANA EM DIFERENTES IDADES
 GESTACIONAIS”**.

Conheço os objetivos da pesquisa e estou ciente da sua realização. Deram-me oportunidade de esclarecer todas e quaisquer dúvidas.

Estou ciente de que a minha participação é voluntária e que os dados serão mantidos em absoluto sigilo, sendo de conhecimento apenas da pesquisadora e do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade.

Sei que poderei deixar de participar do estudo sem que com isso tenha o tratamento médico prejudicado, podendo até mesmo participar de outras pesquisas desta Universidade.

Autorizo que os dados possam ser utilizados pela pesquisadora ou Instituição (UFMS), com finalidade de publicação em órgão de divulgação científica.

Se tiver dúvidas a respeito deste estudo, poderei ligar para a pesquisadora Enfermeira Kelly Lopes de Araújo Appel, nos telefones (067) 33815006/ (67) 92999506.

Para perguntas sobre meus direitos como participante deste estudo, entrarei em contato com a Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS (PROP), Caixa Postal: 549, CEP: 79070-110, Município: Campo Grande-MS, onde tem o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67) 3345-7187 ou (67) 3345-7186, ou pelo e-mail: bioetica@propp.ufms.br.

Este documento foi realizado em duas vias, ficando uma comigo e outra com a pesquisadora.

Campo Grande - MS, ____ de _____ de 201 ____.

Assinatura da parturiente ou do responsável legal

ANEXOS

ANEXO A – Autorização da UTI/UIIN Neonatal HUMAP/UFMS/EBSERH



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Campo Grande, 29 de abril de 2013.

Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian
Unidade de Terapia Neonatal

Considerando a necessidade de dar andamento no projeto de Mestrado intitulado “Associação da presença de DNA genômico de *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* em sangue de recém-nascidos com tempo de bolsa rota em diferentes idades gestacionais”, sob minha responsabilidade e sob a orientação do Prof. Dr. Durval Batista Palhares, solicito autorização para coleta dos dados nos recém-nascidos com diagnóstico de infecção neonatal nascidos de bolsa rota neste hospital no período de julho a dezembro de 2013.

Informo que os pais serão informados quanto à pesquisa e apenas os pacientes cujos pais autorizarem e assinarem o termo de consentimento participará da pesquisa.

Segue cópia do projeto citado para conhecimento.

Atenciosamente,


Kelly Lopes de Araújo Appel
Mestranda
Programa de Pós-Graduação
em Saúde e Desenvolvimento
na Região Centro-Oeste

Autorizo
Silvia Nakashima
Silvia Nakashima
Pediatra-Neonatalogia
CRM-MS 3218
27/04/13

Sector de Pesquisa em Pediatria/NHU/UFMS
Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta-FAMED
Av. Filinto Muller, s/n, Ipiranga Fone: 67 3345.3221
CEP 79008-900 Campo Grande (MS)
<http://www.ufms.br> e e-mail: dbatista@nin.ufms.br

ANEXO B – Autorização da UTI/UIN Neonatal Maternidade Cândido Mariano

Campo Grande, 11 de março de 2014.

**PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA
MATERNIDADE CÂNDIDO MARIANO**

Título da Pesquisa: Associação da presença de DNA genômico de *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* em sangue de recém-nascidos com tempo de bolsa rota em diferentes idades gestacionais.

Nome do Pesquisadora: Kelly Lopes de Araújo Appel

Bases de dados a serem utilizados: Prontuários, Registros e material biológico.

Venho por meio deste, solicitar autorização para realizar o trabalho de pesquisa de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, intitulado “**Associação da presença de DNA genômico de *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* em sangue de recém-nascidos com tempo de bolsa rota em diferentes idades gestacionais**”.

A população será composta de RN de gestantes internadas na Maternidade do Núcleo de Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Hospital Regional Rosa Pedrossian e Maternidade Cândido Mariano, com diagnóstico de Rotura prematura de membrana, em qualquer idade gestacional, internados nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal ou Unidade Intermediária das mesmas Instituições, no período de março a agosto de 2014.

Como pesquisadora supra qualificada, comprometo-me com utilização das informações contidas nas bases de dados acima citadas, protegendo a imagem das pessoas envolvidas e a sua não estigmatização, garantindo a não utilização das informações em seu prejuízo ou das comunidades envolvidas, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e /ou econômico financeiro.

Declaro que estou ciente da necessidade de respeito à privacidade das pessoas envolvidas em conformidade com os dispostos legais citados* e que os dados das bases serão utilizados somente neste projeto, pelo qual se vinculam.

Todo e qualquer outro uso que venha a ser necessário ou planejado, deverá ser objeto de novo projeto de pesquisa e que venha, a ser necessário ou planejado, deverá ser objeto de novo projeto de pesquisa e que deverá, por sua vez, sofrer o trâmite legal institucional para o fim a que se destina.

*Constituição Federal Brasileira (1988) – art. 5º, incisos X e XIV

Código Civil – Art. 20-21

Código penal – Art. 153-154

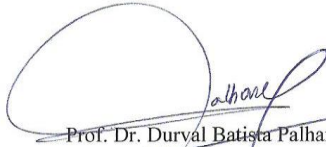
Código de Processo Civil – Art. 347,363,406

Código de Defesa do Consumidor – Art. 43-44

Medida Provisória – 2.200/2001

Resoluções da ANS (Lei n. 9.961/2000)


Kelly Lopes de Araújo Appel
Mestranda


Prof. Dr. Durval Batista Palhares
Orientador

Dr. Durval B. Palhares
Pediatra - Neonatologia
CRM - 662/MS


Dr. Alfeu Duarte de Souza
Diretor Presidente AAMI

*RECIBO de entrega
da Pesquisa
Pelo/la ao Juliano*

*autuado
validado
Regime de Souza
Enfermeira
BOREMS 143954*

ANEXO C- Autorização da UTI/UIN Neonatal HRMS

	GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE FUNDAÇÃO SERVIÇOS DE SAÚDE DE MS UNIDADES: HRMS	
---	--	---

AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA

Nr. 019/2014

A Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, declara estar informado da metodologia que será desenvolvida no projeto de pesquisa intitulado **“ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA GENÔMICO DE STREPTOCOCUS AGALACTIAE E ESCHERICHIA COLI EM SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS COM TEMPO DE BOLSA ROTA EM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS”**, trabalho Apresentado ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pela Mestranda **KELLY LOPES DE ARAÚJO APPEL**, sob orientação Dr. Durval Batista Palhares.

Ciente de que sua metodologia será desenvolvida conforme preconiza a resolução **CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012** e demais resoluções complementares. Autorizo a realização da pesquisa nesta instituição.



Dr.ª Magali da Silva Sanches Machado
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
Hospital Regional de Mato Grosso do Sul

Fundação Serviços de Saúde MS/HRMS
Rua Engenheiro Lutero Lopes, 36-Acro Rancho
Campo Grande-MS

ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL - UFMS 										
PARECER DO COLEGIADO										
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA GENÔMICO DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE E ESCHERICHIA COLI EM SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS COM TEMPO DE ROTURA PREMATURA DE MEMBRANA EM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS Pesquisador: Kelly Lopes de Araújo Appel Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;); Versão: 2 CAAE: 16500813.4.0000.0021 Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 404.583 Data da Relatoria: 02/09/2013 Apresentação do Projeto: Trata-se de um estudo de coorte, transversal, exploratório, de caráter quantitativo, realizado na Unidade de Terapia Intensiva e Intermediária Neonatal do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul buscando relacionar a presença de DNA genômico de microrganismos na circulação de neonatos, e de hemoculturas positivas, cuja mãe apresentou ruptura de membrana amniótica. A população será composta de RN de gestantes internadas na Maternidade do Núcleo de Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), com diagnóstico de Ruptura prematura de membrana, em qualquer idade gestacional, internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal ou Unidade Intermediária da mesma Instituição, no período de julho a dezembro de 2013. As crianças serão  Edison dos Reis Vice-coordenador CEPIUFMS										
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Caixa Postal 549</td> <td>CEP: 79.070-110</td> </tr> <tr> <td>UF: MS</td> <td>Município: CAMPO GRANDE</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (67)3345-7187</td> <td>Fax: (67)3345-7187</td> </tr> <tr> <td colspan="2">E-mail: bioetica@propp.ufms.br</td> </tr> </table>	Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS		Bairro: Caixa Postal 549	CEP: 79.070-110	UF: MS	Município: CAMPO GRANDE	Telefone: (67)3345-7187	Fax: (67)3345-7187	E-mail: bioetica@propp.ufms.br	
Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS										
Bairro: Caixa Postal 549	CEP: 79.070-110									
UF: MS	Município: CAMPO GRANDE									
Telefone: (67)3345-7187	Fax: (67)3345-7187									
E-mail: bioetica@propp.ufms.br										

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 404.583

alocadas

de acordo com a idade gestacional (IG): RN de Termo (RNT) entre 38 á 42 semanas de IG completas, póstermo

(RNPT) maiores de 42 semanas de IG, Pré-termo (RNPT): menores de 37 semanas de IG, e Limítrofe (RNLT): entre 37 e 38 semanas incompletas.

Em cada grupo de RN, serão valorizados: a idade gestacional, peso de nascimento, sexo, perímetro cefálico, estatura e tempo de rotura prematura de membrana.

Critérios de exclusão:

1. Recém-nascidos não nascidos na Maternidade do Núcleo de Hospital Universitário da UFMS;
2. Recém-nascidos com diagnóstico de má formação congênita.
3. Recém-nascidos cujas mães ou responsáveis legais não concordarem com sua participação no estudo.
4. Recém-nascidos filhos de indígenas.

As gestantes participantes, ou seus responsáveis legais, darão seu consentimento na participação do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação do tempo de rotura prematura de membrana com a presença das bactérias *Streptococcus agalactiae* e *Eschericia coli*, em recém-nascidos de diferentes idades gestacionais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a associação do tempo de rotura prematura de membrana com a presença de DNA genômico das bactérias *Streptococcus agalactiae* e *Eschericia coli* pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), em recém-nascidos de diferentes idades gestacionais.
- Analisar a associação do tempo de rotura prematura de membrana com a presença das bactérias *Streptococcus agalactiae* e *Eschericia coli* pelo teste de hemocultura, em recém-nascidos de diferentes idades gestacionais.
- Associar a presença de DNA genômico pelo método PCR convencional aos resultados das hemoculturas para *Streptococcus agalactiae* e *Eschericia coli* dos recém-nascidos internados na UTI.

Edison dos Reis
Vice-coordenador
CEPIUFMS

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS

Bairro: Caixa Postal 549

CEP: 79.070-110

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail: bioetica@propp.ufms.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 404.583

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os recém-nascidos serão submetidos a exames de rotina de avaliação antropométrica após o nascimento, de modo que acreditamos que a pesquisa não introduzirá novos riscos aos mesmos. A coleta de sangue será feita através do cordão umbilical o que a princípio, não submeterá o sujeito da pesquisa a situação de dor ou estresse adicional. Respeitadas as medidas de biossegurança, acreditamos que a pesquisa possui benefícios que superam em muito os riscos inerentes aos procedimentos executados. O melhor conhecimento da associação entre as infecções mais frequentes e o tempo de ruptura da bolsa permitirá uma melhor abordagem médica sobre os recém-nascidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante, conduzida por equipe qualificada para atendimento dos objetivos, autorizada institucionalmente, com fonte orçamentária e cronograma adequados e sem conflito de interesses.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está presente e necessitou de adequações que foram atendidas.

O destino do material biológico após a realização da pesquisa não foi definido após solicitação. A Assentimento Livre e Esclarecido é dispensado neste caso por tratar-se de crianças menores que 4 anos. Todas as demais pendências foram atendidas.

Recomendações:

A pesquisa foi erradamente classificada como sendo pesquisa genética em humanos, quando na realidade trata-se de pesquisa de genética de microrganismos. Esta classificação poderá implicar na remessa equivocada do protocolo à CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Por ter atendido todas as exigências explícitas na resolução 466/2012, somos de parecer pela aprovação do protocolo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Edilson dos Reis
Vice-coordenador
CEPIUFMS

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
UF: MS Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br

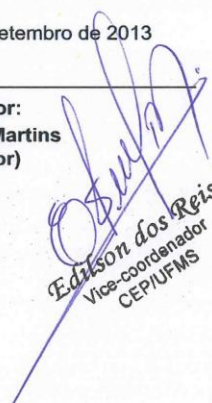
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 404.583

CAMPO GRANDE, 24 de Setembro de 2013

Assinador por:
Odair Pimentel Martins
(Coordenador)


Edison dos Reis
Vice-coordenador
CEPI/UFMS

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
UF: MS Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br

ANEXO E – Instrumento de coleta de dados

PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÃO NEONATAL

HOSPITAL: _____

MÃE: _____

IDADE _____

RG Nº _____ SSP/ _____

PAI: _____

IDADE _____

1. ANTECEDENTES MATERNOS

- ☐ Gestação na adolescência (18 anos incompletos)
☐ Gestação gemelar
☐ Prematuridade
☐ Febre em qualquer momento da gestação
☐ Diagnóstico de infecção Urinária nesta ou em gestação anterior
☐ Bolsa rota **há** _____

Gesta _____ Para _____ Abortos _____ Natimortos _____

Prematuros _____ Filhos Vivos _____ Filhos Mortos _____

Teve problemas de saúde durante as gestações? _____

Tomou medicamentos? _____

Quais? _____

2. GESTAÇÃO ATUAL

DUM _____ Duração da Gestação _____ semanas.

Apresentou algum problema de saúde? _____

Teve febre? _____

Tomou algum medicamento? _____

Quais? _____

Ruptura da Bolsa _____ Sofrimento Fetal _____

Data do Nascimento ____ / ____ / ____ Hora ____ : ____ Minutos

Parto _____ Apresentação _____

Bolsa rota _____ horas do parto Peso: _____ Kg Sexo: () MASC () FEM

Perímetro Cefálico _____ Perímetro Abdominal _____ Estatura: _____

Líquido Amniótico: Claro _____ Esverdeado _____ Fino _____ Espesso _____

Grumos _____ Odor (Fétido/ característico) _____

Condições ao nascer _____

Índice de APGAR 1º minuto _____ 5º minuto _____

Aspiração (tipo resultado) _____

Antes do 1º movimento respiratório? _____

Reanimação? _____

Observações: _____

RESULTADOS: _____ HMG _____ completo: _____

Hemocultura: _____

PCR: _____

Pesquisador (a)

ANEXO F – Autorização de utilização das amostras de sangue pertencentes ao Walter Peres da Silva Júnior



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

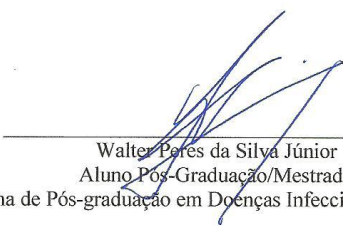


Campo Grande, 26 de maio de 2014.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a pesquisadora Kelly Lopes de Araújo Appel, que conduz a pesquisa intitulada “*Associação da presença de DNA genômico de Streptococcus agalactiae e Escherichia coli em sangue de recém-nascidos com tempo de rotura prematura de membrana em diferentes idades gestacionais*”, em nível de mestrado, a utilização das amostras de sangue de recém-nascidos, que foi conduzida pelo pesquisador Walter Peres da Silva Júnior intitulado “*Perfil diagnóstico dos principais agentes bacterianos na infecção neonatal precoce através da técnica PCR Multiplex*”, cujas amostras encontram-se estocadas no Laboratório de Biologia Molecular/Pediatria/UFMS, para fins exclusivos de utilização na pesquisa em curso de responsabilidade da requerente, vinculada ao programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste.

Serão utilizados para o trabalho desta pesquisadora, apenas as amostras que estejam condizentes com o critério de inclusão contidos no Projeto de Pesquisa apresentado ao Comitê de Ética/UFMS (Recém-nascidos internados com diagnóstico de ruptura prematura de membranas (bolsa rota)), sendo mantido o sigilo requerido para trabalhos desta natureza.



Walter Peres da Silva Júnior
Aluno Pós-Graduação/Mestrado
Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias

ANEXO G – TCLE: Pesquisador Walter Peres da Silva Júnior

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (*) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa PERFIL DIAGNÓSTICO DOS PRINCIPAIS AGENTES BACTERIANOS NA INFECÇÃO NEONATAL PRECOCE ATRAVÉS DA TÉCNICA PCR MULTIPLEX, de responsabilidade do pesquisador WALTER PERES DA SILVA JUNIOR com orientação do PROF. DR. DURVAL BATISTA PALHARES. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver.

Alguns bebês podem adquirir infecção antes do nascimento, durante o parto ou após o parto. Isto pode ocorrer devido a sua baixa imunidade e também pelo uso de procedimentos invasivos. O propósito deste trabalho é fazer o exame para detectar se os bebês internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal estão infectados por alguns dos principais tipos de bactérias que podem acarretar riscos à saúde deles. O diagnóstico destas infecções é realizado hoje em dia somente através de um exame chamado hemocultura que utiliza sangue e que será coletado do seu filho(a) ou representado, independente da sua participação no estudo. O PCR multiplex é um exame novo e acredita-se que seja melhor e mais rápido do que a hemocultura para o diagnóstico das infecções nos recém-nascidos. Este exame será realizado através da coleta de uma pequena quantidade de sangue retirado de uma veia do bebê, aproveitando o momento da coleta da hemocultura, que já será coletada pela equipe da UTI.

Os riscos contidos neste estudo são próximos de zero, estando relacionados principalmente com o desconforto que é usual durante a coleta de amostras de sangue, devido a dor no local da picada

da agulha. Se houver qualquer efeito adverso ou dano a integridade do paciente devido ao procedimento realizado, o paciente tem a garantia de atendimento médico-hospitalar pleno por conta do Hospital participante do estudo. Os benefícios esperados com este estudo são um tratamento mais rápido e mais adequado das infecções nos primeiros dias de vida, levando a uma melhora mais rápida e um tempo de internação menor do recém-nascido na UTI Neonatal. **Este termo de consentimento possibilitará também o armazenamento adequado da amostra de sangue para posterior utilização em pesquisas sobre doenças infecciosas em recém-nascidos.**

Não haverá custo algum para o paciente e sua família. Independente da participação no estudo o recém-nascido tem a garantia de atendimento médico-hospitalar pleno. Se houver participação no estudo, os resultados do exame de PCR multiplex serão imediatamente repassados aos responsáveis pelo tratamento do paciente e os bebês que tiverem resultados positivos serão imediatamente e devidamente tratados.

Sua participação é voluntária e não tem fins lucrativos. Você poderá deixar de participar do estudo no momento em que desejar e, neste caso, a amostra será descartada.

Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo, assim como do seu filho(a) ou representado. A menos que requerido por lei, somente o pesquisador, a equipe do estudo, o Comitê de Ética independente e inspetores de agências regulamentadoras do governo (quando necessário) terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo.

Você será informado periodicamente de qualquer nova informação que possa modificar a sua vontade em continuar participando do estudo.

Se tiver dúvidas a respeito do estudo poderá ligar a qualquer momento para o Médico Pediatra (Pesquisador responsável) Walter Peres da Silva Junior, no telefone (67) 81024357.

Se houver dúvidas sobre seus direitos como participante deste estudo poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67) 3345 7187.

Sua participação no estudo é voluntária. Você pode escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento. Seu filho(a) ou representado não perderá qualquer benefício ao qual

tem direito. Se você desistir do estudo, seu filho(a) ou representado pode receber o procedimento padrão para o diagnóstico de infecção neonatal (hemocultura) conforme já mencionado. Você não será proibido de participar de novos estudos.

Este documento foi realizado em duas vias de igual teor, sendo que uma via ficará com você e outra com o pesquisador.

Eu, _____, RG nº _____, responsável legal por _____, Registro nº _____, declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Campo Grande (MS), ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador

ANEXO H – Autorização do laboratório de pediatria HUMAP/UFMS/EBSERH



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Campo Grande, 22 de maio de 2014.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a pesquisadora Kelly Lopes de Araújo Appel, que conduz a pesquisa intitulada *“Associação da presença de DNA genômico de Streptococcus agalactiae e Escherichia coli em sangue de recém-nascidos com tempo de bolsa rota em diferentes idades gestacionais”*, em nível de mestrado, a utilização das amostras de sangue de recém nascidos, que foi conduzida pelo pesquisador Walter Peres da Silva Júnior intitulado *“Perfil diagnóstico dos principais agentes bacterianos na infecção neonatal precoce através da técnica PCR Multiplex”*, cujas amostras encontram-se estocadas no Laboratório de Biologia Molecular/Pediatria/UFMS, para fins exclusivos de utilização na pesquisa em curso de responsabilidade da requerente, vinculada ao programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste.

Serão utilizados para o trabalho desta pesquisadora, apenas as amostras que estejam condizentes com o critério de inclusão contidos no Projeto de Pesquisa apresentado ao Comitê de Ética/UFMS (Recém-nascidos internados com diagnóstico de ruptura prematura de membranas (bolsa rota)), sendo mantido o sigilo requerido para trabalhos desta natureza.

Durval Batista Palhares
Professor Titular Doutor da Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta
FAMED/UFMS
Diretor do Laboratório de Biologia Molecular/Pediatria/UFMS

Dr. Durval B. Palhares
Pediatria - Neonatologia
CRM - 662/MS