

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
PARASITÁRIAS**

**WALTER PERES DA SILVA JUNIOR**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM TESTE PCR MULTIPLEX PARA A  
DETECÇÃO RÁPIDA DOS PRINCIPAIS PATÓGENOS BACTERIANOS NA SEPSE  
NEONATAL PRECOCE**

**CAMPO GRANDE**

**2015**

**WALTER PERES DA SILVA JUNIOR**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM TESTE PCR MULTIPLEX PARA A  
DETECÇÃO RÁPIDA DOS PRINCIPAIS PATÓGENOS BACTERIANOS NA SEPSE  
NEONATAL PRECOCE**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Durval Batista Palhares.

**CAMPO GRANDE**

**2015**

**WALTER PERES DA SILVA JUNIOR**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM TESTE PCR MULTIPLEX PARA A  
DETECÇÃO RÁPIDA DOS PRINCIPAIS PATÓGENOS BACTERIANOS NA SEPSE  
NEONATAL PRECOCE**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Durval Batista Palhares.

A banca examinadora, após avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito \_\_\_\_\_.

Campo Grande (MS), 27 de Fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

NOTA/CONCEITO

---

Prof. Dr. Durval Batista Palhares (Orientador)  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

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

---

Prof. Dra. Anna Maria Duarte Miglioli  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

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

Dedico este trabalho

A **Jesus Cristo**, por ter me dado saúde e disposição para realizar este sonho.

A minha amiga, minha esposa, e acima de tudo, ao amor da minha vida, **Raquel Cristina Rodrigues**, por acreditar nos meus sonhos e estar sempre ao meu lado com tanta dedicação.

A minha amada filha **Láís Peres Rodrigues**, por me inspirar a cada dia e por me fazer acreditar que tudo é possível.

## AGRADECIMENTOS

A minha família pela paciência, apoio, força e amor. Vocês me fizeram seguir em frente mesmo diante de tantas dificuldades.

Agradeço ao **Prof. Dr. Durval Batista Palhares** por ter acreditado em mim e aceitado me orientar. Cada conversa e cada precioso ensinamento ficarão para sempre guardados na minha memória.

Agradeço de forma muito especial ao **Prof. Dr. Almir de Sousa Martins** pela paciência, inspiração, conselhos e por sua co-orientação, fundamental na construção desta dissertação.

A **Drª Paula Cristhina Niz Xavier**, por todo o auxílio desde o início do projeto.

As enfermeiras das UTI Neonatais, especialmente a **Sandra Morales, Evelin Sona, Mayara Cañedo, Mikaelle dos Santos e Beliza Costa**, por terem me ajudado na realização das coletas das amostras.

Aos professores do Programa de Pós Graduação, em especial a **Prof. Drª Inês Aparecida Tozetti**, que sempre esteve disposta a me ajudar e aconselhar.

Aos Hospitais por terem aceitado a realização desta pesquisa, em especial, a Chefe da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da Santa Casa de Campo Grande, **Dra. Priscilla Costa**, e a Chefe do Setor Materno-Infantil do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, **Dra. Helenita Liberatti**.

*Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.*

Fernando Pessoa

## RESUMO

**Introdução:** A sepse ainda é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no período neonatal. Quando a etiologia da sepse é bacteriana o diagnóstico confirmatório depende de exames microbiológicos baseados em hemoculturas que, apesar de serem ainda consideradas o padrão-ouro, demoram de 48 a 72 horas para oferecer resultados, além de possuírem baixa sensibilidade. **Objetivo:** Padronizar um novo método molecular, através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real multiplex (PCRtr), capaz de inferir diagnóstico rápido e específico dos principais agentes na sepse bacteriana neonatal precoce (SNP). **Metodologia:** O estudo foi desenvolvido no período de setembro de 2013 a fevereiro de 2014. Amostras de sangue de recém-nascidos internados nas UTI neonatais da SCCG, HRMS e HU foram coletadas e analisadas através do método PCRtr heptaplex para detecção de *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* e *Staphylococcus aureus*. Também foi incluído o *primer* universal nas análises. **Resultados:** Foram estudados 150 recém-nascidos com sepse clínica e 10 recém-nascidos controles saudáveis. Do grupo com sepse clínica 100% apresentaram positividade para presença de DNA genômico bacteriano através do *primer* universal. O grupo controle apresentou negatividade no PCRtr e na hemocultura. As hemoculturas do grupo com sepse foi negativa em 97% dos casos. A análise das curvas da PCRtr heptaplex demonstrou que 76% das amostras foram positivas para *Escherichia coli*, 34,7% para *Staphylococcus aureus*, 13,3% para *Streptococcus agalactiae*, 7,3% para *Pseudomonas aeruginosa* e 0,7% para *Enterobacter sp.* e *Serratia sp.*, cada um. A PCRtr heptaplex dos pacientes com sepse clínica foram microbiologicamente confirmadas no sangue em 8,1% das amostras. A taxa de concordância entre o PCRtr heptaplex e a hemocultura positiva pela mesma bactéria foi de 75%. **Discussão:** Os resultados confirmam uma maior taxa de positividade do PCRtr em comparação com os métodos baseados em cultura. A taxa de concordância das hemoculturas positivas com a detecção da mesma bactéria no PCRtr heptaplex está de acordo com o encontrado na literatura. Foi encontrado um predomínio de bactérias gram-negativas entre o total, corroborando o achado em outras populações semelhantes em países em desenvolvimento. **Conclusão:** O desenvolvimento deste novo teste baseado em PCRtr multiplex para a detecção rápida e sensível de importantes patógenos causadores de SNP pode potencialmente se sobressair em comparação com os métodos microbiológicos baseados em cultura, com o objetivo de facilitar a progressão para um terapia antimicrobiana que seja mais específica, evitando o uso abusivo de antibióticos nas UTI neonatais.

Palavras chave: Sepse, Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex, Técnicas de Diagnóstico Molecular

## ABSTRACT

**Introduction:** Sepsis is still a major cause of morbidity and mortality in the neonatal period. When the etiology of sepsis is bacterial, confirmatory diagnosis depends on microbiological tests based on blood cultures that, although they are still considered the gold standard, take 48-72 hours to deliver results, and possess low sensitivity.

**Objective:** To standardize a new molecular method by polymerase chain reaction method in real time (PCRrt) multiplex technique, capable of rapid and specific diagnosis of the main pathogens in the early neonatal bacterial sepsis (EOS).

**Methodology:** The study was carried out from September 2013 to February 2014. Blood samples of newborns admitted to the neonatal intensive care unit (ICU) from SCCG, HRMS and HU were collected and analyzed by PCRrt heptaplex for detecting *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* and *Staphylococcus aureus*. Also included is the universal primer in the analyzes.

**Results:** We studied 150 infants with clinical sepsis and 10 healthy newborns controls. Into the group with clinical sepsis, 100% were positive for the presence of bacterial genomic DNA through universal primer. The control group showed negativity in PCRrt and in blood culture. Blood cultures of the group with sepsis was negative in 97% of cases. The analysis of PCRrt heptaplex curves showed that 76% of the samples were positive for *Escherichia coli*, 34.7% for *Staphylococcus aureus*, 13.3% for *Streptococcus agalactiae*, 7.3% for *Pseudomonas aeruginosa* and 0.7% for *Enterobacter sp.* and *Serratia sp.*, each. The PCRrt heptaplex of patients with clinical sepsis were microbiologically confirmed in blood in 8.1% of samples. The concordance rate between the heptaplex PCRrt and positive blood cultures by the same bacteria was 75%.

**Discussion:** These results confirm a higher positivity rate PCRrt compared to culture-based methods. The concordance rate of positive blood cultures in the detection of the same bacteria in the PCRrt heptaplex is consistent with findings in the literature. Predominance of gram-negative bacteria was found between total, corroborating the findings in other similar populations in developing countries.

**Conclusion:** The development of this new test based on multiplex PCRrt for the rapid and sensitive detection of EOS important pathogens can potentially stand in comparison with microbiological culture based methods, in order to facilitate progression to antimicrobial therapy that is more specifically, avoiding the overuse of antibiotics in neonatal ICU.

Keywords: Sepsis, Multiplex Polymerase Chain Reaction, Molecular Diagnostic Techniques



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos Oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ).....	50
Tabela 2 – Características maternas e assistenciais, relacionadas aos recém-nascidos com sepse neonatal precoce clínica nas UTI Neonatais do HR, SCCG e HU, em Campo Grande – MS.....	55
Tabela 3 – Características dos recém-nascidos com sepse neonatal precoce clínica, nas UTI Neonatais do HR, SCCG e HU, em Campo Grande – MS.....	56
Tabela 4 – Achados laboratoriais relacionados aos recém-nascidos com sepse neonatal precoce clínica, nas UTI Neonatais do HR, SCCG e HU, em Campo Grande – MS.....	57
Tabela 5 – Características maternas e assistenciais, relacionadas aos recém-nascidos do grupo controle e com sepse neonatal precoce clínica, em Campo Grande – MS.....	57
Tabela 6 – Características clinico-epidemiológicas relacionadas aos recém-nascidos do grupo controle e com sepse neonatal precoce clínica, em Campo Grande – MS.....	58
Tabela 7 – Achados laboratoriais relacionados aos recém-nascidos do grupo controle e com sepse neonatal precoce clínica, em Campo Grande – MS.....	59
Tabela 8 – Comparação dos resultados das hemoculturas e do PCRtr com <i>primer</i> universal e heptaplex, na população estudada, em Campo Grande – MS.....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resultados típicos obtidos pela PCRtr heptaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade dos *primers*. (SA) = *S. aureus*. (AG) = *S. agalactiae*. (EC) = *E. coli*. (PA) = *P. aeruginosa*. (KP) = *K. pneumoniae*. (EN) = *Enterobacter sp.* (SE) = *Serratia sp.*.....60

Figura 2 – Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida, da PCRtr heptaplex, para o diagnóstico de sete espécimes bacterianas. Colunas: (M) = marcador 50pb *ladder*. (1) = *S. agalactiae*. (2) = *E. coli*. (3) = *Enterobacter sp.* (4) = *S.aureus*. (5) = *Serratia sp.* (6) = *P. aeruginosa*. (7) = *K. pneumoniae*. (8) = mix de *primers*.....60

Figura 3 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primer* universal (n=150).....61

Figura 4 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr. O gráfico representa as curvas de dissociação utilizando o *primer* universal no grupo controle (n=10).....62

Figura 5 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr heptaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primers* selecionados (n=150).....62

Figura 6 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr octaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade dos *primers*. (SA) = *S. aureus*. (AG) = *S. agalactiae*. (EC) = *E. coli*. (PA) = *P. aeruginosa*. (KP) = *K. pneumoniae*. (EN) = *Enterobacter sp.* (SE) = *Serratia sp.* (UN) = *primer universal*.....63

Figura 7 - Curvas de dissociação padrão obtidas pelo PCRtr após a modificação dos *primers*, demonstrando diferenciação entre *Staphylococcus aureus* (SA) e *Streptococcus agalactiae* (AG) e entre *Escherichia coli* (EC) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA).....63

Figura 8 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr octaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo para *S. agalactiae* ou *S. aureus* e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primers* selecionados (n=12).....64

Figura 9 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr octaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo para *E. coli* ou *P. aeruginosa*, e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primers* selecionados (n=125).....64

Figura 10 – Resultado final de detecção das 7 bactérias por *primers* específicos através de PCRtr: (SA) = *S. aureus*. (AG) = *S. agalactiae*. (EC) = *E. coli*. (PA) = *P. aeruginosa*. (KP) = *K. pneumoniae*. (ENT) = *Enterobacter sp.* (SE) = *Serratia sp.* (INESP) = Bactéria inespecífica.....65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIG	Adequado para a idade gestacional
%	Porcento
CPAP	<i>Continuous Positive Airway Pressure</i>
CRP	Proteína C Reativa
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DICQ	Departamento de Inspeção e Credenciamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
ESBL	Beta-lactamase de espectro extendido
<i>et al.</i>	Colaboradores
GIG	Grande para a idade gestacional
g	Grama
HU-UFMS	Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
HR	Hospital Regional
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN	Interferon
IG	Idade Gestacional
IL	Interleucina
Kg	Kilograma
LCR	Líquido Cefalo-Raquidiano
M	Marcador de peso molecular ( <i>Ladder</i> )
mL	Mililitro
Mm	Milimolar
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilino-suscetível
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilino-resistente
NA	Não aferido

NUFIGEN	Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica Funcional
nn	Nanômetros
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PCRtr	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PCT	Procalcitonina
PIG	Pequeno para a Idade Gestacional
pmol	picomol
PL	Punção Lombar
RN	Recém-nascido
SCCG	Santa Casa de Campo Grande
SCN	Estafilococo coagulase-negativo
SGB	Estreptococo do grupo B
SNP	Sepse Neonatal Precoce
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
µg	Micrograma
µl	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 SEPSE NEONATAL PRECOCE</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3 FISIOPATOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4 FATORES DE RISCO</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5 PATÓGENOS</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5.1 Estreptococo do grupo B (<i>Streptococcus agalactiae</i>)</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5.2 <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>26</b>
<b>2.5.4 <i>Staphylococcus aureus</i> e Estafilococo Coagulase Negativo (SCN)</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.1 Outras bactérias Gram-negativas</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6 DIAGNÓSTICO</b> .....	<b>28</b>
<b>2.6.1 Clínico</b> .....	<b>28</b>
<b>2.6.2 Laboratorial</b> .....	<b>29</b>
<b>2.6.2.1 Testes Hematológicos</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6.2.2 Reações de Fase Aguda</b> .....	<b>31</b>
<b>2.6.2.3 Outros biomarcadores</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6.2.4 Hemocultura</b> .....	<b>34</b>
<b>2.6.2.5 Métodos Moleculares</b> .....	<b>35</b>
<b>2.6.3 Análise Líquórica</b> .....	<b>39</b>
<b>2.7 TRATAMENTO</b> .....	<b>40</b>
<b>2.8 MORBIMORTALIDADE</b> .....	<b>42</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>44</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>44</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1.1 Submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)</b> .....	<b>45</b>

<b>4.2 TIPO DE ESTUDO.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.1 Critérios de Inclusão.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.2 Critérios de Exclusão.....</b>	<b>47</b>
<b>4.4 COLETA, PROCESSAMENTO E DESCARTE DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>47</b>
<b>4.4.1 Coleta das Amostras de Sangue e Processamento das Hemoculturas....</b>	<b>48</b>
<b>4.4.2 Coleta das Amostras de Sangue para PCRtr Multiplex.....</b>	<b>48</b>
<b>4.4.3 Extração do DNA Genômico das Amostras Sanguíneas.....</b>	<b>49</b>
<b>4.4.4 Seleção dos Oligonucleotídeos iniciadores (<i>Primers</i>).....</b>	<b>49</b>
<b>4.4.5 Técnica PCRtr Multiplex.....</b>	<b>51</b>
<b>4.4.5 Descarte do Material Biológico.....</b>	<b>51</b>
<b>4.5 RECRUTAMENTO E COLETA DE DADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>4.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICES E ANEXO.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Países em desenvolvimento são responsáveis por 99% das mortes neonatais, sendo que mais de um milhão destas mortes são atribuídas a causas infecciosas, incluindo sepse neonatal, meningite e pneumonia. De um total estimado de 130 milhões de nascimentos anualmente no mundo, 4 milhões morrem nos primeiros 28 dias de vida e cerca de metade no primeiro dia (MUHAMMAD *et al.*, 2010; VERGNANO *et al.*, 2005).

A sepse ainda é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no período neonatal, particularmente em prematuros (CECCON, 2008; WU *et al.*, 2008). Sinais e sintomas precoces de infecção são, em geral, mínimos e podem facilmente ser mal interpretados como sendo devido a causas não infecciosas. Porém, embora o início da doença seja frequentemente inespecífico, o curso clínico pode ser fulminante, levando ao choque séptico, coagulação intravascular disseminada e morte dentro de horas do início das manifestações clínicas (CLOHERTY *et al.*, 2012; NG, 2004).

Quando a etiologia da sepse é bacteriana, a forma mais comum, o diagnóstico confirmatório depende de exames microbiológicos baseados em técnicas de hemoculturas que, apesar de serem ainda consideradas o padrão-ouro, demoram, usualmente, de 48 a 72 horas para oferecer resultados, e possuem baixa sensibilidade (FUJIMORI *et al.*, 2010; FURTADO, 2011; FURTADO *et al.*, 2014; JORDAN *et al.*, 2006; YADAV *et al.*, 2005). A recomendação atual, todavia, prevê o início de antibioticoterapia de amplo espectro na primeira hora após o diagnóstico clínico ou suspeita da sepse. Assim, na grande maioria das vezes, a terapêutica antibiótica é iniciada de forma empírica, baseada em critérios clínicos e no conhecimento sobre a microbiota local mais frequente (MIURA; SILVEIRA; PROCIANOY, 1999).

Um diagnóstico rápido e correto, acompanhado por um pronto tratamento, consiste em importante fator na redução da mortalidade resultante da sepse neonatal (DARK; DEAN; WARHURST, 2009; WU *et al.*, 2008). Há evidências mostrando que a escolha inicial correta de antibióticos salva mais vidas do que



virtualmente qualquer outra intervenção na unidade de terapia intensiva (EILAND III *et al.*, 2010). A terapêutica empírica, por sua vez, leva ao uso indiscriminado de antibióticos, o que pode induzir à resistência bacteriana, aumento das taxas de infecção por fungos, elevação de custos do tratamento e aumento da mortalidade, especialmente em prematuros extremos (BALLOT *et al.*, 2012).

Infelizmente, nenhum dos sinais clínicos ou dos testes laboratoriais disponíveis no momento são capazes de detectar precocemente a sepse neonatal (BROZANSKI *et al.*, 2006). Assim, exames mais rápidos e específicos são necessários para evitar o uso inapropriado de antibióticos, agilizando o diagnóstico etiológico da sepse e permitindo, com isso, a implementação de condutas terapêuticas seguras e adequadas para cada caso (RUPPENTHAL *et al.*, 2005).

Testes de Amplificação do Ácido Nucleico tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são de realização rápida e têm sido utilizados com sucesso para o diagnóstico de uma grande variedade de doenças infecciosas, sejam elas virais, fúngicas ou bacterianas, com altas taxas de sensibilidade e especificidade (PALKA-SANTINI *et al.*, 2009; VENKATESH *et al.*, 2010). *Primers* para PCR com propósito de identificar as sequências de gene *rDNA* permitem a amplificação de virtualmente qualquer espécie bacteriana (RUPPENTHAL *et al.*, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCRtr), ainda incipiente no Brasil, permite identificar o material genético dos agentes nos espécimes clínicos de maneira rápida e de forma quantitativa, possibilitando sua utilização tanto em estudos epidemiológicos quanto na prática clínica (MIGLIOLI, 2009). Da mesma forma, tem ocorrido nos últimos anos o desenvolvimento de um método diagnóstico denominado PCR Multiplex. As reações realizadas por este teste permitem amplificar simultaneamente, em tempo real e em um único tubo, diferentes sequências gênicas e, conseqüentemente, detectar e identificar vários genes de interesse ao mesmo tempo (EILAND III *et al.*, 2010).

As técnicas de PCR constituem-se métodos rápidos e de alta especificidade e podem inferir o diagnóstico de infecções (REIER-NILSEN *et al.*, 2009). Assim, sua eficácia, segurança e rapidez podem transformá-las em ferramentas imprescindíveis para um tratamento mais específico e eficiente, favorecendo assim uma redução no tempo de tratamento, na morbidade, mortalidade e nos custos hospitalares. A aplicação de tais técnicas para detectar e identificar os patógenos tem o potencial

para revolucionar o diagnóstico e manejo da sepse (EILAND III *et al.*, 2010; BROZANSKI *et al.*, 2006).

Atualmente não há teste ou combinação de testes disponíveis com suficiente especificidade ou sensibilidade para o diagnóstico da sepse neonatal precoce (BENITZ, 2010). Ao contrário das culturas microbiológicas, o diagnóstico por PCR confirma a presença ou ausência do patógeno, com a identificação da espécie, que pode estar disponível para o clínico em poucas horas (DARK; DEAN; WARHURST, 2009). Entretanto, ainda existem poucos estudos com uso de testes moleculares baseados em PCR em amostras sanguíneas para o diagnóstico da sepse neonatal, inexistindo até o momento estudos relativos à sepse neonatal precoce (SNP) (DUTTA *et al.*, 2009). Tal situação estimulou o desenvolvimento deste projeto, que tem em seu principal objetivo a padronização de um novo método molecular capaz de um diagnóstico rápido e específico dos principais agentes na sepse bacteriana neonatal precoce, visando desta maneira contribuir para a elaboração de uma terapêutica mais racional e específica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SEPSE NEONATAL PRECOCE

Infecção é um problema sempre presente em uma unidade de terapia intensiva neonatal, não apenas por ser comum, mas também porque se apresenta de diversas maneiras, envolvendo quase todos os sistemas do corpo, e estando na lista de diagnósticos diferenciais ou como possível complicação de praticamente qualquer condição que afete o recém-nascido (MIURA; SILVEIRA; PROCIANOY, 1999).

O termo sepse neonatal é usado para descrever qualquer infecção bacteriana sistêmica documentada por uma cultura sanguínea positiva em crianças com até 28 dias de vida (MARTIN; FANAROFF; WALSH, 2011). A sepse no RN é classificada em precoce ou tardia com base na idade em que o paciente apresenta o início dos sinais e sintomas. Apesar de existir na literatura uma grande variação com relação a definição desta idade, a que parece mais consistente é a adotada pela Rede Vermont Oxford e Academia Americana de Pediatria, que considera Sepse Neonatal Precoce aquela que ocorre nos primeiros três dias de vida (STOLL *et al.*, 2011; SHANE; STOLL, 2013).

A SNP está relacionada com fatores de risco maternos (principalmente ruptura prematura de membranas por mais de 18 horas, febre/corioamnionite materna, colonização materna por *Estreptococo* do grupo B e infecção do trato urinário) e tem como principais agentes bacterianos, os transmitidos verticalmente da mãe antes ou durante o parto. Este tipo de sepse usualmente tem um início fulminante com comprometimento multissistêmico, apresentando uma alta taxa de mortalidade (CLOHERTY *et al.*, 2012), sendo que na era pré-antibiótico a sepse neonatal era praticamente fatal. As taxas de mortalidade diminuíram dramaticamente após a introdução de agentes microbianos e com os avanços tecnológicos nos

cuidados neonatais. Nas últimas duas décadas, a taxa de mortalidade tem declinado para aproximadamente 5 a 10% nos países desenvolvidos podendo atingir taxas de até 50% em algumas séries, especialmente com patógenos gram-negativos (REMINGTON *et al.*, 2011).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

A incidência de sepsé comprovada por cultura varia de um a oito casos por mil nascidos vivos, sendo que em recém-nascidos de muito baixo peso, pode atingir até 300 por mil nascidos vivos (LEVENE; TUDEHOPE; SINHA, 2010). A incidência de SNP varia bastante, sendo reportada incidência de 0.77 a 8 casos por 1000 nascidos vivos em países desenvolvidos como os Estados Unidos ou Canadá e de 4.8 a 20.7 casos por 1000 nascidos vivos em países em desenvolvimento como a Índia ou Egito (BHAT; BABY, 2011; WESTON *et al.*, 2011).

A incidência de SNP em prematuros de extremo baixo peso são superiores; para recém-nascidos com peso de nascimento menor de 1000 gramas, nos Estados Unidos, a incidência está estimada em cerca de 26 casos por 1000 nascidos vivos (WESTON *et al.*, 2011). No Brasil, ainda existem poucos estudos de incidência de SNP, os quais demonstram uma grande variabilidade nos índices, como o observado no estudo de Goulart *et al.* (2006), realizado em Santa Catarina cuja incidência de SNP foi de 50,3 casos por 1000 nascidos vivos e no estudo realizado por Silva *et al.* (2009), no Pará que evidenciou uma incidência de 9,8 casos por 1000 nascidos vivos.

## 2.3 FISIOPATOLOGIA

Os organismos causadores da SNP são tipicamente colonizadores do trato genitourinário materno, levando a contaminação do líquido amniótico, placenta, cérvix ou canal vaginal (POLIN; ST GEME III, 1992). Tais agentes infecciosos podem ser transmitidos ao neonato de diversas maneiras. A transmissão transplacentária está bem documentada nas infecções virais congênitas, mas não nas infecções perinatais bacterianas, com a exceção de infecções causadas pelo *Treponema pallidum* e *Listeria monocytogenes*.

Sabe-se que a infecção ascendente intra-amniótica acompanhada por aspiração do líquido amniótico pode resultar em infecção neonatal sistêmica, especialmente se houver presença de ruptura prolongada de membranas ou algum procedimento que atinja a integridade do conteúdo uterino, como amniocentese, cerclagem cervical ou cordocentese. Aproximadamente 1 a 4% dos recém-nascidos de mãe com infecção intra-amniótica desenvolvem infecção sistêmica, sendo que a infecção neonatal pode também ser adquirida durante o parto vaginal por bactérias colonizadoras do trato genital baixo materno (LEVENE; TUDEHOPE; SINHA, 2010).

Infecção da mãe no momento do parto, particularmente infecção genital, pode representar um importante parte no desenvolvimento de infecção no neonato. Infecção hematogênica transplacentária durante ou logo após o parto é possível, embora seja mais provável, como foi descrito anteriormente, que a infecção ocorra logo antes ou durante a passagem pelo canal de parto (REMINGTON *et al.*, 2011).

A lavagem inadequada das mãos pelos profissionais de saúde pode promover a transmissão de microrganismos de um neonato infectado, ou das mãos, para um não infectado. O uso de instrumentação, incluindo tubo endotraqueal, tubo nasogástrico, cateteres umbilicais, cateteres venosos centrais e cateteres urinários, também aumenta o risco de infecção neonatal (MARTIN; FANAROFF; WALSH, 2011; CHIESA; PANERO; OSBORN, 2004).

O grau de imaturidade do sistema imune do prematuro, incluindo baixos níveis de imunoglobulinas relacionados a transferência materna reduzida de IgG, aumenta o risco de sepse no neonato pré-termo. Já, a função de barreira da pele e das membranas mucosas está diminuída em prematuros e está adicionalmente comprometida em prematuros doentes devido aos múltiplos procedimentos

invasivos, como acessos venosos e intubação (GHAZAL; DICKINSON; SMITH, 2013).

## 2.4 FATORES DE RISCO

Fatores de risco para SNP incluem os maternos e os relacionados ao recém-nascido. Riscos maternos, como ingestão de alimentos contaminados, podem ocorrer antes do trabalho de parto e do parto propriamente, sendo a contaminação por *Listeria monocytogenes* em alimentos refrigerados o mais importante exemplo.

Alguns procedimentos durante a gestação, tais como cerclagem cervical e amniocentese podem também aumentar as taxas de infecção intra-amniótica e subsequente sepse neonatal. Durante o trabalho de parto, fatores de risco maternos incluem ruptura prolongada de membrana, febre, colonização vaginal e/ou bacteriúria por *Streptococcus agalactiae*. A história de filho anterior com infecção por *Streptococcus agalactiae* é outro fator de risco materno identificado para sepse em gestações subsequentes (CDC, 2010).

Corioamnionite, definida por febre materna, leucocitose, taquicardia materna, dor/desconforto uterino, odor fétido do líquido amniótico e taquicardia fetal ao nascimento, é também um importante fator de risco para SNP (TITA; ANDREWS, 2010). Fatores maternos associados com o desenvolvimento de corioamnionite incluem tempo prolongado de trabalho de parto e de ruptura de membranas, múltiplos exames de toque, inserção de aparelhos de monitorização internos fetais ou uterinos, início espontâneo de trabalho de parto e líquido amniótico meconial. O risco de SNP aumenta para 1% quando as membranas estiverem rompidas por mais de 18 horas antes do parto, e o risco de SNP de recém-nascidos de mães com corioamnionite está estimado entre 1 e 4% (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012).

Também são fatores de risco maternos: doença periodontal, pré-natal pobre ou tardio, infecção do trato urinário, baixo nível sócio-econômico, nutrição pobre e uso de drogas ilícitas (PUOPOLO; ESCOBAR, 2013; BARROS, 2014).

Os fatores de risco para SNP relacionados ao recém-nascido e ao parto incluem: sexo masculino, prematuridade, baixo peso ao nascer, anomalias congênitas, necessidade de uso de fórceps, parto complicado, e baixos escores de Apgar (menor de 7 no quinto minuto) (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012).

## 2.5 PATÓGENOS

As bactérias responsáveis pela SNP variam de acordo com o local e o período de tempo. Os organismos mais frequentemente envolvidos na sepse precoce nos Estados Unidos são o Estreptococo do grupo B (SGB) e a *Escherichia coli*, que juntos perfazem aproximadamente 70% das infecções (SHANE; STOLL, 2013). Outros patógenos a se considerar, os quais são responsáveis pelos casos restantes, são: bacilos entéricos gram-negativos tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter sp.* e *Listeria monocytogenes* (SIMONSEN *et al.* 2014). O Estafilococo coagulase-negativo e os Enterococo podem ocorrer na SNP, porém são mais comumente causadores de sepse nosocomial (SATAR; ÖZLÜ, 2012; CLOHERTY *et al.* 2012). Quando prematuros e neonatos com muito baixo peso são considerados separadamente, o número de casos atribuíveis a *Escherichia coli* e outros Gram-negativos está aumentado, tornando a sepse por Gram-negativos a etiologia mais comum da SNP nesta população (FALCIGLIA *et al.* 2012).

A etiologia da SNP em países em desenvolvimento difere do encontrado nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, com predominância de infecções causadas por Gram-negativos. Em uma revisão combinada de SNP na América Latina, Caribe, Ásia e África, o patógeno mais comum causador de sepse nos

primeiros 3 dias de vida foi a *Klebsiella pneumoniae*, responsável por 26% casos, seguida do *Staphylococcus aureus*, SGB e *Escherichia coli*, como os mais frequentes patógenos isolados, causando entre 13 a 17% das infecções (ZAIDI *et al.*, 2009).

Infecções virais podem também estar implicadas com a SNP, devendo ser clinicamente diferenciada da sepse bacteriana, o que muitas vezes não é fácil. Fungos são raramente associados com SNP (SIMONSEN *et al.*, 2014)

### 2.5.1 Estreptococo do grupo B (*Streptococcus agalactiae*)

Nas últimas duas décadas, o SGB tem sido o mais comum organismo causador de doença invasiva em neonatos nos Estados Unidos e Europa, apesar da implementação da sua antibioticoprofilaxia. O SGB coloniza frequentemente o trato genital e o trato gastrointestinal humano, bem como o trato respiratório alto em crianças pequenas, podendo ser isolado ainda de vários outros locais e fluidos como a garganta, pele, urina, cérvix, vagina e líquido cerebrospinal.

O *Streptococcus agalactiae*, designação da espécie do SGB, é um diplococo gram-positivo facultativo. Em cultura, o SGB exhibe colônias mucoides brancas/acinzentadas, lisas, com 3 a 4 mm de diâmetro, no Ágar Sangue, com uma pequena zona de beta-hemólise. A identificação do Estreptococo como Lancefield do grupo B requer uso de antissoro grupo específico, e é realizada em laboratórios clínicos utilizando testes de aglutinação de látex (REMINGTON *et al.*, 2011).

Na gestação o SGB é carregado assintomaticamente na membrana mucosa genital, retal e faríngea. As taxas de colonização variam conforme o local, sendo que nos Estados Unidos, a taxa de colonização materna está estimada entre 20 e 30%. São fatores de risco para a colonização materna: raça negra, idade menor de 20 anos, baixa paridade e diabetes. A presença de colonização materna por SGB resulta em colonização do neonato intraparto ou intraútero em aproximadamente 50% dos casos. Bacteriúria por SGB durante a gestação está associada com grande colonização do trato retovaginal e é considerado um fator de risco significativo para



SNP. Estima-se que cerca de 85% dos casos de SNP são atualmente evitados através da correta profilaxia antibiótica anteparto (SIMONSEN *et al.*, 2014).

Duas formas de sepse neonatal por SGB são reconhecidas: doença de início precoce, cujos sintomas costumam iniciar nas primeiras 4-6 horas de vida e que apresenta-se como septicemia, estresse respiratório e choque séptico, que se não for tratado rapidamente pode ser fatal, com uma taxa de mortalidade estimada em cerca de 8%. A segunda forma é a de início tardio, caracterizada por meningite, que desenvolve-se após cerca de 5 a 7 dias (LEVENE; TUDEHOPE; SINHA, 2010).

Como a infecção por SGB no neonato ocorre em somente 1% das mulheres colonizadas, duas estratégias para reduzir o risco tem sido descritas: a primeira baseia-se na testagem de todas as mulheres com idade gestacional entre 35 e 37 semanas quanto a colonização para SGB; e a segunda baseia-se no tratamento daquelas positivas com penicilina intraparto, se houver indicação (Penicilina G Cristalina é administrada para mulheres colonizadas em trabalho de parto com dois ou mais fatores de risco incluindo gestação menor de 37 semanas, ruptura de membranas superior a 18 horas e febre materna superior a 38°C) (CDC, 2010).

### 2.5.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa aeróbia encontrada universalmente no trato intestinal e comumente na vagina e trato urinário humano, sendo considerada a segunda principal causa de SNP em neonatos nos Estados Unidos, responsável por cerca de 25% dos episódios de SNP, 80% destes em neonatos prematuros. Se forem considerados somente os recém-nascidos de muito baixo peso, *Escherichia coli* torna-se o principal agente causador. O motivo para o aumento da incidência de sepse por organismos gram-negativos pode estar ocorrendo em parte devido ao aumento da frequência do uso de profilaxia antibiótica para SGB na mãe (SIMONSEN *et al.*, 2014).

Apesar da estrutura antigênica da *Escherichia coli* ser complexa, alguns fatores de virulência tem sido especificamente identificados como sendo importantes na sepse neonatal. O antígeno K1 capsular presente em algumas cepas está fortemente ligado à meningite neonatal e é o principal fator de virulência descrito (CAMACHO-GONZALEZ; SPEARMAN; STOLL, 2013).

### 2.5.3 *Staphylococcus aureus* e Estafilococo Coagulase-Negativo (SCN)

Tanto *Staphylococcus aureus* quanto SCN colonizam a pele e a mucosa. Tais microrganismos são mais frequentemente causadores de sepse neonatal de início tardio, especialmente em recém-nascidos de muito baixo peso. Entretanto, há relatos de sepse neonatal precoce e infecção materno-fetal por *Staphylococcus aureus*, principalmente em países em desenvolvimento. As espécies de SCN (principalmente *Staphylococcus epidermidis*) são raramente associadas com sepse de início precoce.

Já que os SCN estão presentes na pele, o isolamento destes organismos em uma simples cultura de sangue podem representar uma contaminação. Assim, o crescimento da bactéria em duas culturas de sangue em lugares distintos pode auxiliar na diferenciação de contaminação e doença invasiva (REMINGTON *et al.*, 2011).

### 2.5.4 Outras bactérias gram-negativas

Outras bactérias gram-negativas além da *Escherichia coli*, são causas menos frequentes de SNP em países desenvolvidos, mas permanecem causas muito importantes principalmente em países em desenvolvimento, onde podem aparecer inclusive como patógenos principais. *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.* e *Serratia sp.* são os principais representantes, possuindo cápsulas polissacarídicas que contribuem para sua virulência através da prevenção da opsonização, fagocitose e lise bacteriana (SIMONSEN *et al.*, 2014).

## 2.6 DIAGNÓSTICO

### 2.6.1 Clínico

Um dos mais desafiadores aspectos no manejo dos neonatos com sepse é fazer seu diagnóstico. Os sinais mais precoces de sepse costumam ser súbitos e inespecíficos. A maioria das complicações da prematuridade, incluindo doença da membrana hialina e cardiopatias congênitas, tem manifestações similares àquelas relacionadas a sepse (SHANE; STOLL, 2013).

Sinais e sintomas de sepse em recém-nascidos variam de acordo com a idade gestacional e a severidade da infecção. Cerca de 90% dos neonatos com sepse terão pelo menos um sintoma e a maioria terão três ou mais sintomas. Os sintomas costumam apresentar-se nas primeiras 6 horas de vida, sendo que a grande maioria dos neonatos (80-90%) irão apresentar sintomas nas primeiras 24 a 48hs de vida (GERDES, 2004). Embora um exame físico normal seja evidência de que sepse não esteja presente, bacteremia pode ocorrer na ausência de sinais clínicos (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012).

Como pneumonia é uma forma frequente de apresentação, sintomas respiratórios são comuns e podem incluir apnéia, taquipnéia, gemência, batimento de asa nasal e retrações intercostais. Sintomas cardíacos podem incluir cianose, dessaturação, taquicardia ou bradicardia, perfusão pobre, redução do enchimento capilar e hipotensão. Raramente o recém-nascido apresentará febre, a não ser que nasça de uma mãe febril e tenha febre imediatamente após o nascimento. A apresentação mais comum em um neonato com sepse é a hipotermia. Este sinal sistêmico é um dos principais marcadores não específicos de sepse. Sintomas gerais incluem letargia, hipotermia, dificuldade para alimentar-se, distensão abdominal, vômitos, icterícia, convulsão ou aparência de que não está bem, bem como sinais não específicos que podem incluir anúria e acidose (RUSSEL, 2011).

O diagnóstico da SNP deve ser o mais precoce possível em função da sua elevada morbimortalidade. Desta forma, e em função disto, atualmente ele baseia-se em fatores de risco maternos e neonatais; manifestações clínicas do recém-nascido e exames laboratoriais. Segundo Silveira e Procianoy (2012), a presença de três ou mais sinais clínicos do recém-nascido ou no mínimo dois destes sinais, associados a fatores de risco maternos permite diagnóstico de sepse clínica ou síndrome séptica.

### 2.6.2 Laboratorial

Os exames tipicamente a serem solicitados em um neonato com suspeita de sepse incluem um hemograma completo, hemocultura simples e punção lombar para análise celular e cultura. Em adição, podem ser solicitados as reações de fase aguda como proteína C reativa (CRP) e procalcitonina (PCT). A necessidade de uma radiografia de tórax é usualmente determinada pela presença de sintomas respiratórios (RUSSEL, 2011). A análise urinária não faz parte do exames de triagem em paciente com suspeita de sepse neonatal precoce, com exceção dos

neonatos com diagnóstico fetal de mal-formação do trato urinário (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012; GERDES, 2004).

#### 2.6.2.1 Testes hematológicos

Contagem de leucócitos, diferencial, contagem absoluta de neutrófilos e a relação entre neutrófilos imaturos e totais no sangue são largamente utilizados como testes de *screening* para sepse neonatal. Infelizmente, nenhum destes testes tem sido particularmente útil na identificação da maioria dos pacientes sépticos. O número absoluto de neutrófilos imaturos e a contagem absoluta de neutrófilos tem uma sensibilidade subótima e baixo valor preditivo positivo para SNP pois sua elevação não distingue de forma consistente uma resposta inflamatória de uma etiologia não infecciosa (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012; SHANE; STOLL, 2013).

Considera-se como leucocitose no período neonatal precoce, o número total de leucócitos superior a 25.000, que pode estar presente em condições como asfixia perinatal, febre materna e àquelas condições associadas ao estresse do trabalho de parto. A leucopenia (número inferior a 5.000 leucócitos) também pode estar associada à asfixia, à hipertensão materna, hemorragia peri-intraventricular e hemólise. Neutropenia (contagem de neutrófilos inferior a 1.500) tem maior valor diagnóstico para a SNP, com uma sensibilidade, em média, de 50%. A neutropenia é preditora da gravidade da sepse porque representa uma depleção da reserva medular de neutrófilos. Uma relação máxima normal de neutrófilos imaturos sobre totais (relação I/T) tem um valor preditivo negativo muito alto (99%), mas um pobre valor preditivo positivo (25%) para sepse neonatal. A relação I/T é considerada de valor preditivo para sepse quando seu índice for igual ou superior a 0,2 ( $I/T \geq 0,2$ ) (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012).

O uso de um elaborado escore hematológico, descrito por Rodwell, Leslie e Tudehope (1988), envolvendo sete variáveis, sugeriu que um escore mais alto estaria associado com a presença de sepse. Usando um limite maior ou igual a 3, o escore mostrou uma sensibilidade alta de 96%, mas um valor preditivo positivo desapontador de 31%. Assim, o número total de leucócitos, contagem absoluta de neutrófilos e relação I/T estão longe de serem testes adjuntos perfeitos para o diagnóstico de sepse neonatal; entretanto, a informação obtida por estes testes, particularmente o alto valor preditivo negativo dos testes normais, podem ser bastante úteis no desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamento (GERDES, 2004).

As contagens plaquetárias não costumam ser muito sensíveis ou específicas no diagnóstico de sepse neonatal e também não são úteis na monitorização da resposta ao tratamento. Trombocitopenia e trombocitose costumam ser achados tardios em infecções fúngicas e bacterianas (SHANE; STOLL, 2013; SIMONSEN *et al.*, 2014).

#### 2.6.2.2 Reações de Fase Aguda

Proteínas de fase aguda são produzidas principalmente pelo fígado como parte de uma resposta inflamatória imediata a infecção ou à injúria tecidual. Uma grande variedade de reações tem sido avaliadas em neonatos com sepse bacteriana suspeita, entretanto Proteína C reativa e procalcitonina são os dois reagentes de fase aguda mais comumente estudados e que dispõe de estudos mais adequados (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012).

Os níveis de CRP aumentam dentro de 6 a 8 horas da infecção e alcançam o pico em 24 horas, sendo estimulados pelo aumento de interleucina 6 (IL-6). A CRP tem seu melhor valor preditivo se mensurada dentro de 24 a 48 horas da infecção. Um aumento no valor do nível de CRP é um preditor melhor do que medidas

isoladas. Duas determinações normais (entre 8 a 24 horas do nascimento e 24 horas após) tem demonstrado um valor preditivo negativo de 99,7% para sepse neonatal precoce comprovada, levando a CRP a ser rotineiramente utilizada de forma seriada para auxiliar na decisão quanto à suspensão da antibioticoterapia, no caso de ocorrer rápida redução de seus níveis (BENITZ *et al.*, 1998). Assim, valores de CRP repetidamente normais são uma evidência bastante forte contra infecção bacteriana e podem auxiliar na suspensão segura dos antibióticos (SIMONSEN *et al.*, 2014). Pacientes prematuros tem menores valores de CRP de base e menor aumento em resposta à infecção.

Uma variedade de condições não infecciosas como síndrome de aspiração meconial, febre materna, uso de esteroide pré-natal, doença hipertensiva específica da gestação, injúria tecidual isquêmica ou traumática, hemólise e corioamnioíte clínica podem causar uma elevação dos níveis de CRP (HOFER *et al.*, 2012).

Os dados são ainda insuficientes para recomendar a mensuração sequencial das concentrações de CRP com finalidade de determinar a duração da terapia antimicrobiana em um paciente com valores elevados. Os valores de CRP considerados anormais diferem entre laboratórios, de forma geral, são aqueles superiores a 10 mg/L (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012).

Procalcitonina (PCT) é um propeptídeo de calcitonina produzido principalmente por monócitos e hepatócitos que é significativamente elevada durante infecções em neonatos. Os valores parecem aumentar cerca de 2 horas após a exposição ao patógeno, com pico em 12 horas e retorno aos valores basais em 48 a 72 horas (SHANE; STOLL, 2013). O nível normal em neonatos com mais de 72 horas de vida é usualmente <0.1ng/ml. Em geral, procalcitonina é mais sensível e menos específica para detecção precoce da sepse do que a CRP (BENITZ, 2010). Os níveis de procalcitonina costumam ser mais elevados durante infecções bacterianas do que virais e declina rapidamente com terapia apropriada. Entretanto, um aumento fisiológico da PCT ocorre nas primeiras 24 horas de vida, e níveis elevados podem ocorrer em condições não infecciosas como doença da membrana hialina, instabilidade hemodinâmica, e em trauma severo (NG, 2004).

Desta maneira, embora a PCT seja um marcador mais sensível de infecção do que a CRP, marcadores tais como PCT, CRP e índices leucocitários tem similar

sensibilidade e especificidade quando analisados sozinhos. Já, uma combinação destes parâmetros fornece melhores resultados, sugerindo que a análise conjunta, associada ao mínimo de volume de sangue coletado, seja de mais valia para o diagnóstico da SNP (CELIK *et al.*, 2012).

### 2.6.2.3 Outros biomarcadores

Evidências recentes demonstram que neonatos reagem a sepse bacteriana com uma resposta inflamatória exagerada, que pode contribuir para a alta mortalidade observada na SNP (SATAR, 2012). Citocinas são mediadores químicos endógenos que desempenham importante função na cascata inflamatória, as quais pode-se incluir a interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interferon gama (IFN- $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (PUSTERLA *et al.*, 2006; SRINIVASAN; HARRIS, 2012). A razão para a investigação deste grupo diverso de mensageiros intercelulares é que os índices leucocitários e CRP são marcadores tardios e não mostram-se sensíveis o suficiente para o diagnóstico precoce da sepse neonatal (NG, 2004).

A expressão dos antígenos de superfície celular dos leucócitos é conhecida por ser regulada para mais ou para menos, durante a infecção bacteriana. Com o avanço na tecnologia de citometria de fluxo foi possível identificar e quantificar os marcadores de superfície celular em células específicas com pouco volume de sangue. Dentre estes antígenos de superfície, os potenciais marcadores de infecção recentemente estudados são CD11B, CD64, e CD 69 (SRINIVASAN; HARRIS, 2012).

O aumento dos níveis de citocinas e expressão dos antígenos de superfície celular ocorrem antes do neonato desenvolver sinais e sintomas de sepse e eventualmente antes dos testes laboratoriais tornarem-se positivos. No entanto, atualmente, nenhum deles tem sido utilizado na rotina clínica devido a muitos fatores



como as dificuldades operacionais envolvidas na detecção, a falta de especificidade e o custo e necessidade de equipamento sofisticado para realização destes testes (SHAH; PADBURY, 2014).

#### 2.6.2.4 Hemocultura

O isolamento de um microrganismo patogênico do sangue (ou de outro fluido corporal) é atualmente o único método para estabelecer definitivamente o diagnóstico de sepse/bacteremia neonatal.

Os métodos para detecção da presença de bacteremia são fundamentados no cultivo de sangue em meios de cultura propícios para o crescimento microbiano. Esses métodos são conhecidos como hemoculturas. A cultura sanguínea é o padrão ouro para o diagnóstico de sepse neonatal (SHAH; PADBURY, 2014).

Existem diversos sistemas comerciais para a realização de hemoculturas, sendo a grande maioria baseados em características do crescimento microbiano associado ao comportamento desses no meio de cultura, seja por hemólise, turbidez, produção de gás, “chocolatização” do sangue e presença de colônias visíveis. A cultura é incubada por 5 dias, embora os sistemas modernos de cultura sejam capazes de identificar quase todos os patógenos neonatais responsáveis pela SNP dentro de 48 horas (BENITZ, 2010).

Os métodos para a realização de hemocultura podem ser tanto convencionais quanto automatizados. Os automatizados apresentam como vantagens o menor tempo para detecção dos patógenos e a monitorização contínua do crescimento microbiano (FERREIRA *et al.*, 2011).

O volume de sangue necessário para hemocultura de neonatos é substancialmente menor do que o necessário em adultos, pois neonatos tendem a ter concentração de bactérias no seu sangue maiores do que em adultos. Como resultado, 0.5ml foi tradicionalmente considerado o volume padrão de sangue

adequado para detectar bacteremia em neonatos. Entretanto, cerca de 25% de todos os neonatos com sepse tem bacteremia envolvendo baixas contagens de colônias no sangue (menor de 4 UFC/ml). Uma amostra sanguínea com 0.5ml de volume tem se mostrado insuficiente para detectar a maioria dos neonatos com estes níveis de bacteremia, enquanto 1ml dobra a chance de positividade. O sangue é frequentemente coletado de veia periférica, podendo também ser obtido de cateter arterial umbilical logo após inserção ou de veia umbilical duplamente clampeada e preparada adequadamente (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012; SHANE; STOLL, 2013).

O grande problema da cultura sanguínea em neonatos é que a sensibilidade para identificar sepse é somente 50 a 80% em condições ideais (GERDES, 2004). O aumento atual do uso de antibióticos na mãe tem reduzido a taxa de positividade para níveis de até 3% (OTOLINNI *et al.*, 2002). Assim, uma cultura sanguínea positiva com um organismo patogênico é diagnóstica de sepse neonatal, entretanto, uma cultura negativa não descarta a possibilidade da doença.

#### 2.6.2.5 Métodos Moleculares

As técnicas associadas à biologia molecular progrediram muito desde a década de 50, quando o DNA teve sua estrutura descrita. Desde lá, tem havido um grande interesse no desenvolvimento de tecnologias moleculares para o diagnóstico de sepse bacteriana. A maioria destes testes promete uma detecção rápida, diretamente do sangue, sem realização de cultura prévia e com mais alta especificidade e sensibilidade quando comparado às culturas, podendo detectar patógenos em concentrações muito baixas (SIMONSEN *et al.*, 2014).

Dentre as diversas técnicas de biologia molecular desenvolvidas, destaca-se a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Esta técnica foi proposta primeiramente como uma estratégia para desvendar o mecanismo envolvido na síntese química de

genes e somente quinze anos mais tarde o método foi utilizado na prática através da amplificação de DNA de células de mamíferos. O aperfeiçoamento da técnica se deu com a substituição da enzima DNA polimerase I por uma enzima termoestável isolada do microrganismo *Thermus aquaticus*, possibilitando que o método da PCR pudesse ser utilizado de forma crescente e rotineira em pesquisa e nos laboratórios de biologia molecular (FERREIRA *et al.*, 2011).

Basicamente, a técnica da PCR consiste de uma reação bioquímica *in vitro* que permite a síntese de grandes quantidades de uma sequência de ácidos nucléicos pré-determinada. A PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima DNA-polimerase, a mesma que participa da replicação do material genético nas células. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento (o iniciador, ou *primer*, em inglês) já esteja ligado a uma das cadeias do DNA no ponto escolhido para o início da síntese. Os *primers* definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência DNA com bilhões de cópias (EILLAND III *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011).

Métodos moleculares baseados na tecnologia da reação em cadeia da polimerase têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de infecção e identificação de patógenos. Estes métodos baseiam-se na detecção e reconhecimento do DNA do patógeno no sangue, ou também em outros espécimes clínicos, com o potencial para obter resultados em um tempo muito mais curto (horas) do que é possível com as culturas convencionais (VENKATESH *et al.*, 2010).

Para patógenos bacterianos, o uso de *primers* específicos que detectam organismos particulares ou de *primers* universais que ligam-se à sequências conservadas em bactérias (principalmente ligadas aos genes *16S rRNA* ou *23S rRNA*), tem potencial para detectar virtualmente qualquer patógeno bacteriano existente (DARK; DEAN; WARHURST, 2009).

Considera-se hoje que técnicas moleculares como a PCR sejam métodos importantes para detectar agentes etiológicos de infecção, pois não requerem o cultivo do microrganismo causal, sendo dependentes apenas da habilidade para detectar sua assinatura genômica. Além disso, tais técnicas possuem uma maior sensibilidade quando comparados a ensaios imunológicos e métodos de coloração.

A PCR pode amplificar quantidades diminutas de DNA (10 a 100 cópias em amostras clínicas) em poucas horas (NG, 2004).

Assim, os métodos moleculares tornaram-se uma ferramenta valiosa para identificação de patógenos, possuindo um custo efetivo menor do que métodos convencionais, considerando o tempo de internação dos pacientes e o uso de antibioticoterapia empírica (MAKHOUL *et al.*, 2005). A detecção através da amplificação de uma região específica do genoma bacteriano pode auxiliar no diagnóstico da sepse, bem como ampliar o leque de possibilidades etiológicas, hoje baseadas apenas no raciocínio clínico (NATARAJAN *et al.*, 2006). De forma crescente, o uso de métodos de PCR para detectar as áreas conservadas 16Sr RNA e 23S rRNA, presentes em todas as espécies bacterianas, tem sido reportadas para distinguir sepse neonatal de outras condições que podem mimetizá-la (SIMONSEN *et al.*, 2014).

Ultimamente, uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em tempo real (PCRtr), vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite, segundo Novais e Pires-Alves (2004), o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais rápida, com melhor sensibilidade, precisão, reprodutibilidade, acurácia, controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação em relação à PCR convencional.

A PCR em tempo real realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (CT). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado, pode ser observado nas curvas de amplificação.

Os principais compostos fluorescentes, moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, são o *SYBR Green* e *TaqMan*. O *SYBR Green* se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. Suas vantagens são

o baixo custo, a facilidade no uso e a sensibilidade. Já o *TaqMan* é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma das extremidades um fluoróforo (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

O uso de PCR em tempo real baseado no gene 16S rDNA, por exemplo, é capaz de detectar uma grande quantidade de patógenos comuns encontrados na sepse neonatal, com uma sensibilidade e especificidade diagnóstica de 99 e 100%, respectivamente (DARK; DEAN; WARHURST, 2009; JORDAN; DURSO, 2005).

O grande desafio dos métodos individuais de PCR é que eles falham em detectar a maior parte das causas de infecções neonatais. Como resultado, vários pesquisadores e laboratórios tem descrito o Sistema PCR Multiplex, em que os DNAs de vários patógenos neonatais bacterianos podem ser amplificados em conjunto, paralelamente.

Por definição, a Reação em Cadeia pela Polimerase Múltipla (PCR Multiplex) é uma variante da PCR na qual dois ou mais *loci* são simultaneamente amplificados na mesma reação. Através deste método, busca-se amplificar distintas sequências em um único tubo, implicando na necessidade de que todos os oligonucleotídeos, os iniciadores previamente desenhados para corresponder ao DNA respectivo de cada bactéria a ser identificada, assim como os demais reagentes utilizados na PCR, estejam necessariamente misturados e o programa utilizado seja adequado para permitir a detecção de cada fragmento específico e não inibir as demais (YADAV *et al.*, 2005).

Desta forma, o uso de PCR Multiplex pode diferenciar vários agentes etiológicos responsáveis pela sepse, baseados no peso molecular dos fragmentos amplificados (YADAV *et al.*, 2005), contribuindo para a detecção simultânea de um número cada vez maior de doenças, a partir de um número também crescente de tipos de amostras clínicas, com menores quantidades de amostra (FERREIRA *et al.*, 2011).

Considera-se fundamental a identificação do microrganismo causador da infecção e o início mais precoce possível do antibiótico adequado. Uma antibioticoterapia inicial inadequada na sepse encontra-se associada a um aumento da mortalidade em até cinco vezes. Por outro lado, a antibioticoterapia indiscriminada é responsável pelo surgimento crescente de bactérias

multirresistentes e infecções fúngicas (BALLOT *et al.*, 2012). Estudos comparando hemoculturas e testes moleculares para detecção de microrganismos associados à sepse têm destacado um diagnóstico significativamente mais rápido e sensível quando utilizadas técnicas baseadas na PCR. Neste contexto, uma extração rápida de DNA com sistema PCR Multiplex mostrou ser possível, com resultados disponíveis em menos de três horas e com boa sensibilidade, auxiliando médicos a realizar decisões mais ágeis no manejo efetivo do paciente com sepse evitando o uso abusivo de antibióticos (LOUIE *et al.*, 2002, MISHRA *et al.*, 2006).

### 2.6.3 Análise Liquórica

Enquanto a punção lombar (PL) é um importante meio de obter líquido cérebro-espinhal (LCR) para descartar a presença de meningite em crianças com sepse, sua rotina em neonatos é controversa. O risco de meningite concomitante em neonatos de alto risco que parecem bem ou naqueles em que os sinais clínicos parecem ser devido a condições não infecciosas tais como síndrome do desconforto respiratório são muito baixas, de 0,25/1000 nascidos vivos (WISWEL *et al.*, 1995). Porém, mais de 23% dos neonatos com bacteremia irão apresentar meningite concomitante, segundo Shane e Stoll (2013). Assim, um número significativo de neonatos com meningite não terão este diagnóstico a menos que a PL seja realizada. Por esta razão há indicação de obter LCR através de PL em neonatos que apresentem quadro clínico sugestivo de sepse neonatal (sintomáticos) ou que apresentem hemocultura positiva (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012).

Idealmente, a realização da PL deve se dar antes do início da terapia antimicrobiana, porém existem algumas condições que podem levar a não realização imediata ou ao adiamento da realização da PL, as quais incluem pacientes com quadro clínico muito severo com instabilidade hemodinâmica e/ou respiratória ou em casos de abaulamento da fontanela anterior (indicando realização

de Tomografia Computadorizada ou Ressonância Nuclear Magnética anterior à realização da PL para afastar sinais de hipertensão intracraniana), a presença de trombocitopenia severa ou infecção na região lombossacra (SIMONSEN *et al.* 2014).

## 2.7 TRATAMENTO

O tratamento empírico é usualmente iniciado em neonatos que estão sob o risco de sepse, baseado nos sinais e sintomas clínicos e/ou nos fatores de risco relacionados a gestação (SHANE; STOLL, 2013). Historicamente, entre 11 e 23 neonatos não-infectados são tratados com antibióticos para cada um com sepse comprovada (GERDES, 2004).

O espectro e severidade dos sintomas requeridos para iniciar-se em um curso diagnóstico e terapêutico para sepse faz parte do julgamento clínico e não pode ser ditado por protocolos escritos (GERDES, 2004). A seleção dos antibióticos utilizados empiricamente, em um momento inicial na SNP, é direcionada contra as bactérias patogênicas mais prováveis de acordo com estudos epidemiológicos. Uma vez as culturas coletadas, a combinação de ampicilina e gentamicina é ainda a mais apropriada para cobrir os organismos mais comuns neste grupo etário (DARMSTADT; BATRA; ZAIDI, 2009). O uso desta combinação minimiza o custo e causa mínima morbidade e mortalidade relacionada ao tratamento. Se houver suspeita de meningite, e enquanto estiver esperando-se o resultado final das culturas e suscetibilidades, cefotaxime pode ser associado à ampicilina, embora vários estudos têm reportado rápido desenvolvimento de resistência quando este antibiótico foi utilizado rotineiramente para o tratamento da sepse neonatal precoce (BRYAN *et al.*, 1985). Ceftriaxone não é recomendado para neonatos com suspeita de meningite devido ao risco de encefalopatia bilirrubínica causada pelo deslocamento da bilirrubina livre. Carbapenêmicos são uma classe de antibióticos que podem ser utilizados em pacientes em que a bactéria apresentar-se resistente a

outros antibióticos, seja pela produção de penicilinases, ou estando relacionada a beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) (FALCIGLIA *et al.* 2012).

Apesar de não haver definição precisa do tempo necessário para o tratamento nos protocolos atualmente disponíveis, considera-se que o tempo de tratamento para paciente com sepse comprovada por cultura positiva deverá ser de 10 a 14 dias, baseada no organismo específico. Quando houver meningite, a duração deverá ser de pelo menos 14 dias se for causada por SGB e de pelo menos 21 dias nas meningites por gram-negativos (GERDES, 2004).

Nos casos em que o agente etiológico não puder ser identificado em culturas e houver forte suspeita de infecção, usualmente um curso empírico de 7 a 10 dias de antibiótico é realizado. A decisão quanto a duração da terapia em pacientes com hemocultura negativa deve incluir a consideração quanto ao curso clínico bem como aos riscos associados com longos cursos de agentes microbianos (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012).

Há razoável evidência mostrando a associação de tratamento empírico com antibióticos (por um tempo superior a 5 dias), com mortalidade, enterocolite necrosante e subsequente infecção. (COTTEN, 2013). Assim, devido ao potencial prejuízo ocasionado ao paciente devido a cursos longos de antibióticos desnecessários, e ao potencial risco da emergência de resistência antibiótica, a suspensão do esquema antibiótico caso o organismo não seja isolado e não haja evidência clínica de infecção, é de fundamental importância (JOHNSTON; ANTHONY, 2013).

O tratamento específico para SGB permanece essencialmente inalterado, devendo ser realizado com penicilina ou ampicilina. Bacteremia não complicada é tratada por 10 dias, enquanto bacteremia complicada com meningite é usualmente por 14 dias, embora alguns autores recomendem o tratamento por 21 dias.

*Escherichia coli* e outros bacilos Gram-negativos devem ser tratados com gentamicina ou amicacina por 14 dias na bacteremia não complicada, enquanto meningite deve ser tratada por um mínimo de 21 dias. Nos casos de infecções por *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), meropenem tem sido usado com sucesso em neonatos. Para outros organismos



Gram-negativos, a duração do tratamento é similar ao da *Escherichia coli*, porém com uma maior incidência de algumas complicações nas infecções meningéas, tais como abscesso cerebral associado com *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Serratia sp.*, que podem necessitar de tratamentos com duração mais prolongada. Bacteremia não complicada deve ser tratada por 10 a 14 dias. Para infecções invasivas associadas com meningite, o tempo de tratamento deve ser de 14 a 21 dias.

Quando outros organismos gram-positivos que não SGB forem os causadores da SNP, vancomicina deve ser iniciada empiricamente até o antibiograma for conhecido. Se o organismo identificado for *Staphylococcus aureus* meticilino-suscetível (MSSA), o tratamento deve ser substituído por nafcilina ou oxacilina devido a sua melhor atividade bactericida. *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA) usualmente requerem tratamento com vancomicina (SIMONSEN *et al.*, 2014).

## 2.8 MORBIMORTALIDADE

Antes do advento dos antibióticos, quase todos os recém-nascidos com sepse neonatal morriam. Atualmente, das cerca de 4 milhões de mortes neonatais que ocorrem todo ano, em torno de um terço são creditadas à sepse neonatal, tornando-a ainda a principal causa de mortalidade infantil no mundo (REMINGTON *et al.*, 2011). Embora países desenvolvidos tenham apresentado um importante progresso na sua redução, em países em desenvolvimento, ainda há um grande número de intervenções promissoras e de baixo custo que tem o potencial de reduzir significativamente o número de casos de sepse neonatal no mundo (SHANE; STOLL, 2014, SATAR; ÖZLÜ, 2012).

O risco de mortalidade na SNP aumenta com o grau de prematuridade e das morbidades associadas. Os sistemas imunes inato e adaptativo não estão

funcionando em níveis ótimos no período perinatal, com significativo aumento do risco do neonato desenvolver doença invasiva (SIMONSEN *et al.*, 2014).

A longo prazo, a exposição a inflamação intrauterina na corioamnioíte e a SNP estão associados com um risco aumentado de desenvolvimento de displasia broncopulmonar em pacientes prematuros. Também está documentada a associação de infecção perinatal e inflamação com injúria cerebral, incluindo leucomalácia periventricular, atraso nos marcos do desenvolvimento e paralisia cerebral (SHANE; STOLL, 2014). Por exemplo, sequelas significativas podem desenvolver-se em 17 a 60% dos neonatos sobreviventes de meningite neonatal causada por bacilos entéricos gram-negativos ou pelo SGB, incluindo sequelas motoras, retardo mental, atraso no desenvolvimento, desordens convulsivas, hidrocefalia e perda auditiva (REMINGTON *et al.*, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo é desenvolver e aplicar um teste PCRtr multiplex para a detecção rápida dos principais patógenos bacterianos na sepse neonatal precoce.

#### 3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Desenhar oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a detecção dos sete microrganismos associados à infecção neonatal precoce na população alvo selecionada;

3.2.2 Adaptar o método PCRtr para detecção dos sete microrganismos associados à infecção neonatal precoce na população alvo selecionada;

3.2.3 Avaliar a presença de infecção definida através do método PCRtr com utilização do *primer* universal na população alvo selecionada;

3.2.4 Avaliar a presença de infecção definida através do método PCRtr para detecção dos sete microrganismos associados à infecção neonatal precoce na população alvo selecionada;

3.2.5 Caracterizar a população estudada quanto ao sexo, idade gestacional, peso, presença de fatores de risco maternos para infecção, achados laboratoriais e sintomatologia do recém-nascido.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

#### 4.1.1 Submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi iniciado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob protocolo nº355.636 / CAAE 16465613.7.0000.0021 em 09/08/2013.

#### 4.1.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Os pais ou responsáveis pela criança foram informados quando solicitado o consentimento para a participação na pesquisa, sobre os objetivos, riscos, benefícios e responsabilidade do pesquisador, e que poderiam retirar o seu filho da pesquisa a qualquer momento (Apêndice A).

## 4.2 TIPO DE ESTUDO

Estudo Descritivo Observacional Transversal.

## 4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população do estudo foi composta por 174 recém-nascidos (RN) com diagnóstico de sepse clínica admitidos nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) das seguintes instituições: Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (HU), Santa Casa de Campo Grande (SCCG) e Hospital Regional do Mato Grosso do Sul (HR), e por 10 recém-nascidos saudáveis, como grupo controle, admitidos na Unidade de Alojamento Conjunto da SCCG, no período de setembro de 2013 a fevereiro de 2014.

### 4.3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo os recém-nascidos (pré-termo, a termo ou pós-termo) que apresentaram sepse clínica no período compreendido da internação até 72 horas de vida e que receberam ciclo completo de antibioticoterapia para sepse neonatal precoce.

O diagnóstico de sepse clínica foi definido segundo os critérios descritos por Silveira e Procianoy (1999), baseados na presença de três ou mais sinais clínicos do recém-nascido ou no mínimo dois destes sinais, associados a fatores de risco

maternos, dentre os descritos a seguir: a) fatores de risco maternos tais como febre (temperatura axilar superior a 38°C), corioamnionite, ruptura prematura de membranas por um período maior que 18 horas, colonização por *Estreptococo* do grupo B e infecção urinária; b) achados clínicos tais como apnéia, dificuldade para respirar, cianose, taquicardia ou bradicardia, déficit de perfusão ou choque; hipo ou hiperglicemia; irritabilidade, letargia, hipotonia, convulsões; distensão abdominal, vômito, intolerância à dieta, resíduo gástrico, hepatomegalia; icterícia sem causa definida; temperatura instável; petéquias ou púrpura; e uma aparência de que “não parece bem”.

No grupo controle foram incluídos recém-nascidos que não apresentavam nenhum fator de risco para sepse neonatal precoce e que encontravam-se assintomáticos nas primeiras 72 horas de vida.

#### 4.3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os recém-nascidos que não se enquadravam nos critérios de inclusão, e os que apresentassem: malformações congênitas; infecção materna, durante a gestação, por HIV, sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e/ ou herpes vírus 1 e 2. Também foram excluídos do estudo recém-nascidos indígenas e aqueles em que o consentimento informado não pôde ser obtido.

#### 4.4 COLETA, PROCESSAMENTO E DESCARTE DAS AMOSTRAS

#### 4.4.1 Coleta de Amostras de Sangue e Processamento das Hemoculturas

As amostras de sangue para hemocultura foram colhidas pelos serviços de neonatologia nos casos de suspeita de infecção dos recém-nascidos de acordo com a rotina do serviço. No caso dos recém-nascidos do grupo controle as amostras de sangue foram colhidas no alojamento conjunto, após a autorização dos pais e assinatura do termo de consentimento informado. Foram colhidos o mínimo de 0,5 ml e o máximo de 1ml de sangue, intervalo de volume considerado suficiente para uma adequada taxa de sucesso na hemocultura, segundo Russel (2010). O sangue foi coletado em frasco pediátrico para hemocultura automatizada. As amostras colhidas foram transportadas imediatamente ao setor de microbiologia dos respectivos laboratórios, onde as amostras foram processadas e analisadas de acordo com o sistema automatizado BacT/ALERT (BioMérieux, Durham, NC, EUA). Este submeteu as amostras a uma temperatura constante de 37°C por um período de até cinco dias, realizando leituras a cada 10 minutos.

#### 4.4.2 Coleta de Amostras de Sangue para PCRtr Multiplex

As amostras de sangue foram colhidas de veia periférica ou de cateter arterial umbilical logo após sua passagem, com todo rigor de assepsia, e aproveitando-se a oportunidade de coleta de amostra sanguínea para hemocultura de acordo com a rotina das unidades.

Foram colhidos 0,5 ml de sangue em tubo com EDTA, o qual foi imediatamente transportado para o congelador a -80° C até a extração de DNA e posterior realização da técnica molecular.

Em todas as amostras de sangue processadas foram pesquisadas as seguintes bactérias: *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*

*pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* e *Staphylococcus aureus*.

#### 4.4.3 Extração do DNA Genômico das Amostras Sanguíneas

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o *Kit illustra blood genomicPrep mini spin* (GE Healthcare, Uk) seguindo as recomendações do fabricante (CABRAL, 2010), as alíquotas extraídas permaneceram congeladas a -80°C. O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro da marca *GeneQuant* (GE Healthcare, Uk), empregando-se os comprimentos de onda de 260nm e 280 nm.

O armazenamento das amostras e extração do DNA genômico foi realizado no Laboratório de Pesquisas Pediátricas da UFMS.

#### 4.4.4 Seleção dos Oligonucleotídeos Iniciadores (*Primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram elaborados exclusivamente para este estudo e selecionados para a detecção dos sete microrganismos associados à infecção neonatal precoce a partir da base de dados GenBank, com exceção dos *primers* para *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae*, os quais foram baseados na sequência alvo descrita por Miglioli (2009), com adaptação para PCRtr. Também foi incluído no PCRtr multiplex o *primer* universal descrito por Galves (2013), para a identificação do DNA genômico bacteriano nas amostras.



Todos os primers desenhados foram analisados no software BLAST antes de serem sintetizados. Os pares de oligonucleotídeos dos primers, bem como os seus respectivos tamanhos do produto estão identificada na tabela 1.

Após a análise inicial houve a necessidade de redesenhar o *primer* antisenso para *Staphylococcus aureus* e o *primer* senso para *Pseudomonas aeruginosa* para que houvesse a possibilidade de melhor diferenciação nas curvas de dissociação entre tais bactérias e o *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, respectivamente. Os *primers* redesenhados também estão descritos na tabela 1 (PSEUDOFOR 2 e SAUREV2).

Tabela 1 – Características dos Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*).

<i>Primer</i>	Microrganismo	Tamanho do produto (bp)
ECLOACFOR = 5'- GTC TAT TTC GCA CGT CGT GCT TTG C -3' ECLOACREV = 5'- CTT CTC AAC TGC GCG GAT GAG ACC -3'	<i>Enterobacter sp.</i>	171
SAUFOR = 5'- GAG GTA TTA GTG ATA TCG ATT TAA -3' SAUREV = 5'- GCT TTA ATG TCA CTT GTA TTG AT -3'	<i>Staphylococcus aureus</i>	139
SERFOR = 5'- CAG CGG CTC GGC GCC GTT GAT-3' SERREV = 5'- TTC GTC GCC GAC GAC GCA CTG- 3'	<i>Serratia sp.</i>	120
PSEUDFOR = 5'- CCA GCC ATG CCG CGT GTG TGA- 3' PSEUDREV = 5'- GTT GGT AAC GTC AAA ACA GCA AGG -3'	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	102
ECOFOR = 5'- CAT CAG ATG GAG CCG GGC ATG CCA – 3' ECOREV = 5'- GAG AAT TAC TCG TCT TCC AGT TCG – 3'	<i>Escherichia coli</i>	98
SAGAFOR = 5'- TTG CAG CCA GTT GAA GAT CGT TAT-3' SAGAREV = 5'- TAA TTC CAT AAA TCG CTT TGT ATC-3'	<i>Streptococcus agalactiae</i>	90
KLEBFOR = 5'- GCA CTG CGT GGT GAT GTC GC -3' KLEBREV = 5'- TGT AAC GAC GGG CAA TCT TCA -3'	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	82
RW01 5' AAC TGG AGG AAG GTG GGGAT-3' DG74 5'- AGG AGG TGA TCC AAC CGCA-3'	Universal	380
PSEUDFOR2 = 5'- GCC GCG TGT GTG AAG AAG GTC TTC-3' PSEUDREV = 5'- GTT GGT AAC GTC AAA ACA GCA AGG -3'	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
SAUFOR = 5'- GAG GTA TTA GTG ATA TCG ATT TAA -3' SAUREV2=5'-ATG CCT GCT TTC AAA TCG ACA ACT C-3'	<i>Staphylococcus aureus</i>	139

#### 4.4.5 Técnica PCRtr Multiplex

A técnica de PCRtr Multiplex foi realizada no Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica Funcional do Instituto de Ciências Biológicas (NUFIGEN-ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para a reação de PCR em tempo real multiplex (heptaplex) foi utilizado o kit *SYBR Green PCR core Reagents* (PE Biosystems). Foram utilizados o aparelho ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) e o aparelho AB Vii A7 (Applied Biosystems). Foi utilizado o 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 controles positivos e negativo (*no-template*-PCR) foram incluídos. O valor de CT foi determinado para cada amostra positiva.

Como controle negativo foi utilizada água ultrapura (Mili-Q) autoclavada e como controle positivo foi utilizado ácido nucléico total purificado dos microrganismos pesquisados, através do acondicionamento de colônias de cada espécie bacteriana em frasco com 1ml de solução de lise e posterior extração do DNA, através do método descrito por Grimberg *et al.* (1989). Todos os isolados das bactérias pesquisadas foram escolhidos de culturas isoladas no Setor de Microbiologia do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, durante o ano de 2014. Todos os patógenos foram cultivados em meios específicos a 37°C por 24 horas antes da extração.

#### 4.4.6 Descarte do Material Biológico

O material biológico (sangue total) foi submetido a uma solução de hipoclorito de sódio puro por 24 horas e depois descartado em recipientes apropriados e que atendam ao Programa Nacional de Controle de Qualidade do DICQ (Departamento de Inspeção e Credenciamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas) (Anexo A). Todo o procedimento esteve de acordo com a autorização dos Chefes das UTI Neonatais das instituições envolvidas.

#### 4.5 RECRUTAMENTO E COLETA DOS DADOS

Após e durante a internação dos recém-nascidos elegíveis, as mães ou responsáveis foram procurados para explicações com relação ao objetivo do estudo e solicitação do consentimento por escrito (Apêndice A).

A coleta de dados do recém-nascido foi realizada através de preenchimento de formulário padronizado (Apêndice B), utilizando informações obtidas através de entrevista com a mãe e análise das informações contidas no prontuário do paciente durante sua internação na unidade. A idade gestacional foi calculada de acordo com o método New Ballard (BALLARD *et al.*, 1991) e os recém-nascido foram classificados quanto ao peso e idade gestacional utilizando a curva de crescimento intrauterino descrita por Fenton (2003).

Com relação aos achados laboratoriais, considerou-se leucopenia um número de leucócitos inferior a 5.000 leucócitos/mm<sup>3</sup> e leucocitose um número superior a 30.000 leucócitos/mm<sup>3</sup>. Já neutropenia foi definida como um número de neutrófilos inferior a 1.500 neutrófilos/mm<sup>3</sup> e trombocitopenia foi definida como um número de plaquetas inferior a 150.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012). Os exames laboratoriais foram colhidos no período de 18 a 24 horas de vida, de acordo com a rotina dos serviços.

Corioamnioníte foi diagnosticada quando houve evidência de bactéria patogênica no líquido amniótico por Gram ou cultura, líquido amniótico purulento, leucocitose, febre materna ou dor/desconforto uterino (FLIDEL-RIMON *et al.*, 2012).

O período da coleta de dados foi de seis meses, compreendendo o período de setembro de 2013 a fevereiro de 2014.

#### 4.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

As variáveis relativas às características maternas, assistenciais e clinico-epidemiológicas dos recém-nascidos, bem como a comparação dos resultados hemoculturas e do PCRtr foram apresentadas no formato descritivo. Em relação aos demais dados, a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Sigma Stat* versão 3.5 e o *Systat* versão 12.0. Para analisar se os dados numéricos possuíam distribuição normal, utilizou-se do Teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Quando a distribuição demonstrou ser não paramétrica, utilizou-se o Teste de *Mann-Whitney* para comparar os grupos controle de com sepse clínica. Na ocorrência de normalidade, utilizou-se o Teste *t de Student*. Além disso, foi utilizado o Teste de *Goodman* para comparar a diferença de proporções entre as variáveis categóricas entre e dentro das populações multinomiais. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Foram avaliados 174 recém-nascidos com diagnóstico de sepse clínica, de ambos os sexos, sendo que destes, foram excluídos do estudo 24 recém-nascidos, os quais enquadravam-se nos critérios de exclusão (2 em que não foi possível obter o consentimento informado, 8 em que o recém-nascido apresentou alguma malformação congênita, 4 em que a mãe apresentou história de sífilis na gestação e 10 recém-nascidos em que não foi utilizada antibioticoterapia). Na tabela 2 encontram-se descritas as características maternas e assistenciais relacionadas aos recém-nascidos com SNP clínica, nos hospitais estudados. Já, na tabela 3 pode-se observar as características clinico-epidemiológicas relacionadas a tais recém-nascidos.

Quanto aos procedimentos assistenciais relacionados aos recém-nascidos avaliados, 54% (n=81), usaram algum tipo de cateter vascular (entre os quais, cateter umbilical venoso e/ou arterial, e outros cateteres vasculares), 53% (n=80) necessitaram de oxigenioterapia através de caixa de hood, 30% (n=45) utilizaram CPAP nasal e 40% (n=61) foram submetidos à ventilação mecânica. Ainda, 24% (n=37) receberam nutrição parenteral total, 17% (n=26) necessitaram de fototerapia devido a icterícia e todos utilizaram algum esquema antibiotico, sendo a associação entre ampicilina e gentamicina, aquela mais frequente, encontrada em 91% dos casos (n=137). Na tabela 4 estão descritos os achados laboratoriais mais frequentes entre os recém-nascidos com diagnóstico clínico de SNP.

Foram ainda incluídos no estudo, como grupo controle, 10 recém-nascidos, de ambos os sexos, que não apresentavam fatores de risco e nem sinais clínicos de infecção e que também apresentaram hemocultura negativa. Nas tabelas 5 e 6 encontram-se descritas as características relacionadas a estes recém-nascidos em comparação aos pacientes com sepse clínica. Já, na tabela 7 pode-se observar os achados laboratoriais relacionados a estes recém-nascidos também em comparação com o grupo com sepse clínica.

Não houve diferença estatística entre a mediana do número de consultas do grupo controle quando comparado ao grupo com sepse clínica (controle: 7±5

consultas; sepse:  $6 \pm 5$  consultas;  $p = 0,185$ ). Já, quanto a idade gestacional, observou-se que o grupo com sepse clínica apresentou idade gestacional (controle:  $39 \pm 2$  semanas; sepse:  $34 \pm 6$  semanas;  $p < 0,001$ ) e peso (controle:  $3310 \pm 890$ g; sepse:  $2097 \pm 1440$ g;  $p < 0,001$ ) mais baixos em relação ao grupo controle, com significância estatística.

Tabela 2 – Características maternas e assistenciais, relacionadas aos recém-nascidos com sepse neonatal precoce clínica nas UTI Neonatais do HR, SCCG e HU, em Campo Grande – MS.

Variável		Hospital			Total n(%)
		HR n(%)	SCCG n(%)	HU n(%)	
Realização de pré-natal	Sim	79 (92,9)	45 (95,7)	14 (77,8)	138 (92)
	Não	6 (7,1)	2 (4,3)	4 (22,2)	12 (8)
Uso de corticoide antenatal	Sim	34 (40)	13 (27,7)	1 (5,6)	48 (32)
	Não	51(60)	34 (72,3)	17 (94,4)	102 (68)
Screening antenatal para SGB	Sim	0 (0)	3 (6,4)	0 (0)	3 (2)
	Não	85 (100)	44 (93,6)	18 (100)	147 (98)
Uso de antibiótico anteparto	Sim	54 (63,5)	37 (78,7)	9 (50)	100 (66,7)
	Não	31 (36,5)	10 (21,3)	9 (50)	50 (33,3)
Doença Hipertensiva Específica da Gestação	Sim	15 (17,6)	13 (27,7)	4 (22,2)	32 (21,3)
	Não	70 (82,4)	34 (72,3)	14 (77,8)	118 (78,7)
Diabetes Gestacional	Sim	7 (8,2)	2 (4,3)	0 (0)	9 (6)
	Não	78 (91,8)	45 (95,7)	18 (100)	141 (94)
Infecção do trato urinário no 3º trimestre	Sim	51 (60)	33 (70,2)	9 (50)	93 (62)
	Não	34 (40)	14 (29,8)	9 (50)	47 (38)
Ruptura de membranas $\geq$ 18 horas antes do nascimento	Sim	26 (30,6)	9 (19,2)	2 (11,1)	37 (24,7)
	Não	59 (69,4)	38 (80,8)	16 (88,9)	113 (75,3)
Trabalho de parto prematuro	Sim	36 (42,4)	30 (63,8)	10 (55,6)	76 (50,7)
	Não	49 (57,6)	17 (36,2)	8 (44,4)	74 (49,3)
Corioamnionite	Sim	4 (4,7)	5 (10,6)	0 (0)	9 (6)
	Não	81 (95,2)	42 (89,4)	18 (100)	141 (94)
Rupreme	Sim	29 (34,1)	14 (29,8)	8 (44,4)	51 (34)
	Não	56 (65,9)	33 (70,2)	10 (55,6)	99 (66)
Líquido Amniótico meconial	Sim	6 (7,1)	6 (12,8)	0 (0)	12 (8)
	Não	79 (92,9)	41 (87,2)	18 (100)	138 (92)
Cesárea	Sim	61 (71,8)	22 (46,8)	11 (61,1)	94 (62,7)
	Não	24 (28,2)	25 (53,2)	7 (38,9)	56 (37,3)
<b>Total</b>		85 (56,7)	47 (31,3)	18 (12)	150 (100)

Nota: SGB = Estreptococo do grupo B, HR = Hospital Regional; HU = Hospital Universitário; SCCG = Santa Casa de Campo Grande

Tabela 3 – Características dos recém-nascidos com sepse neonatal precoce clínica, nas UTI Neonatais do HR, SCCG e HU, em Campo Grande – MS.

	Variável	Hospital			Total n(%)
		HRMS n(%)	SCCG n(%)	HU n(%)	
Sexo	Masculino	48 (56,5)	23 (48,9)	10 (55,6)	81 (54,0)
	Feminino	37 (43,5)	24 (51,1)	8 (44,4)	69 (46,0)
Peso ao nascer	≥ 2500g	30 (35,3)	12 (25,6)	5 (27,8)	47 (31,3)
	2499 – 1500g	33 (38,8)	15 (31,9)	8 (44,4)	56 (37,4)
	< 1500g	22 (25,9)	20 (42,5)	5 (27,8)	47 (31,3)
Idade gestacional	≥37 semanas	23 (27,1)	12 (25,6)	4 (22,2)	39 (26,0)
	<37 semanas	62 (72,9)	35 (74,4)	14 (77,8)	111 (74,0)
Classificação	AIG	66 (77,6)	36 (76,6)	13 (72,2)	115 (76,7)
	PIG	12 (14,1)	9 (19,1)	5 (27,8)	26 (17,3)
	GIG	7 (8,3)	2 (4,3)	0 (0,0)	9 (6,0)
Sinais clínicos	Disfunção respiratória	81 (95,3)	46 (97,9)	18 (100,0)	145 (96,6)
	Cianose	76 (89,4)	45 (95,7)	17 (94,4)	138 (92,0)
	Apnéia	26 (30,6)	22 (46,8)	2 (11,1)	50 (33,3)
	Déficit de perfusão	14 (16,5)	16 (34)	5 (27,8)	35 (23,3)
	Hipo/Hiperglicemia	24 (28,2)	6 (12,8)	0 (0,0)	30 (20,0)
	Instabilidade térmica	10 (11,8)	7 (14,8)	7 (38,9)	24 (16,0)
	Intolerância à dieta	7 (8,3)	5 (10,6)	1 (5,5)	13 (8,6)
	Letargia	8 (9,4)	3 (6,4)	2 (11,1)	13 (8,6)
	Hipotonia	4 (4,7)	0 (0,0)	6 (33,3)	10 (6,6)
	Irritabilidade	4 (4,7)	3 (6,4)	1 (5,5)	8 (5,3)
	Convulsão	7 (7,0)	1 (2,1)	0 (0,0)	8 (5,3)
	Aparência de que não está bem	2 (2,3)	1 (2,1)	6 (33,3)	9 (6,0)
	Distúrbio de coagulação	3 (3,5)	1 (2,1)	0 (0,0)	4 (2,6)
Apgar no 5 minuto < 7	Sim	4 (4,7)	2 (4,3)	0 (0,0)	6 (4,0)
	Não	81 (95,3)	45 (95,7)	18 (12,0)	144 (96,0)
Necessidade de reanimação	Sim	24 (28,2)	30 (63,8)	7 (38,9)	61 (40,7)
	Não	61 (71,7)	17 (36,2)	11 (61,1)	89 (59,3)
<b>Total</b>		<b>85 (56,7)</b>	<b>47 (31,3)</b>	<b>18 (12)</b>	<b>150 (100)</b>

Nota: AIG = Adequado para a idade gestacional; PIG = Pequeno para a idade gestacional; GIG = Grande para a idade gestacional; HR = Hospital Regional; HU = Hospital Universitário; SCCG = Santa Casa de Campo Grande

Tabela 4 – Achados laboratoriais relacionados aos recém-nascidos com sepse neonatal precoce clínica, nas UTI Neonatais do HR, SCCG e HU, em Campo Grande – MS.

Achados Laboratoriais	n(%)
Leucopenia	6 (4%)
Leucocitose	9 (6%)
Neutropenia	5 (3,3%)
Trombocitopenia	34 (22,7%)
RCP $\geq$ 1mg/dl	96 (64%)
Relação I/T $\geq$ 0,2	10 (6,7%)

Nota: RCP = Proteína C Reativa; I/T = Neutrófilos imaturos/ Neutrófilos totais; HR = Hospital Regional; HU = Hospital Universitário; SCCG = Santa Casa de Campo Grande.

Tabela 5 – Características maternas e assistenciais, relacionadas aos recém-nascidos do grupo controle e com sepse neonatal precoce clínica, em Campo Grande – MS.

Variável		Controle	Sepse
		n(%)	n(%)
Realização de pré-natal	Sim	10 (100)	138 (92)
	Não	0 (0)	12 (8)
Uso de corticoide antenatal	Sim	0 (0)	48 (32)
	Não	10 (100)	102 (68)
Screening antenatal para SGB	Sim	0 (0)	3 (2)
	Não	10 (100)	147 (98)
Uso de antibiótico anteparto	Sim	0 (0)	100 (66,7)
	Não	10 (100)	50 (33,3)
Doença Hipertensiva Específica da Gestação	Sim	0 (0)	32 (21,3)
	Não	10 (100)	118 (78,7)
Diabetes Gestacional	Sim	0 (0)	9 (6)
	Não	10 (100)	141 (94)
Infecção do trato urinário no 3 trimestre	Sim	0 (0)	93 (62)
	Não	10 (100)	47 (38)
Ruptura de membranas $\geq$ 18 horas antes do nascimento	Sim	0 (0)	37 (24,7)
	Não	10 (100)	113 (75,3)
Trabalho de parto prematuro	Sim	0 (0)	76 (50,7)
	Não	10 (100)	74 (49,3)
Corioamnioníte	Sim	0 (0)	9 (6)
	Não	10 (100)	141 (94)
Rupreme	Sim	0 (0)	51 (34)
	Não	10 (100)	99 (66)
Líquido Amniótico meconial	Sim	0 (0)	12 (8)
	Não	10 (100)	138 (92)
Cesárea	Sim	02 (20)	94 (62,7)
	Não	08 (80)	56 (37,3)
<b>Total</b>		10 (100)	150 (100)

Nota: SGB = Estreptococo do grupo B.



Tabela 6 – Características clínico-epidemiológicas relacionadas aos recém-nascidos do grupo controle e com sepse neonatal clínica, em Campo Grande – MS.

Variável		Controle n(%)	Sepse n(%)
Sexo	Masculino	5 (50,0)	81 (54,0)
	Feminino	5 (50,0)	69 (46,0)
Peso ao nascer	≥ 2500g	10 (100)	47 (31,3)
	2499 – 1500 g	0 (0)	56 (37,4)
	< 1500 g	0 (0)	47 (31,3)
Idade gestacional	≥37 semanas	10 (100)	39 (26,0)
	<37 semanas	0 (0)	111 (74,0)
Classificação	AIG	10 (100)	115 (76,7)
	PIG	0 (0)	26 (17,3)
	GIG	0 (0)	9 (6,0)
Sinais clínicos	Disfunção respiratória	0 (0)	145 (96,6)
	Cianose	0 (0)	138 (92,0)
	Apnéia	0 (0)	50 (33,3)
	Déficit de perfusão	0 (0)	35 (23,3)
	Hipo/Hiperglicemia	0 (0)	30 (20,0)
	Instabilidade térmica	0 (0)	24 (16,0)
	Intolerância à dieta	0 (0)	13 (8,6)
	Letargia	0 (0)	13 (8,6)
	Hipotonia	0 (0)	10 (6,6)
	Irritabilidade	0 (0)	8 (5,3)
	Convulsão	0 (0)	8 (5,3)
	Aparência de que não está bem	0 (0)	9 (6,0)
	Distúrbio de coagulação	0 (0)	4 (2,6)
Apgar no 5 minuto < 7	Sim	10 (100)	6 (4,0)
	Não	0 (0)	144 (96,0)
Necessidade de reanimação	Sim	10 (100)	61 (40,7)
	Não	0 (0)	89 (59,3)
<b>Total</b>		<b>10 (100)</b>	<b>150 (100)</b>

Nota: AIG = Adequado para a idade gestacional; PIG = Pequeno para a idade gestacional; GIG = Grande para a idade gestacional; HR = Hospital Regional; HU = Hospital Universitário; SCCG = Santa Casa de Campo Grande

Tabela 7 – Achados laboratoriais relacionados aos recém-nascidos do grupo controle e com sepse neonatal clínica, em Campo Grande – MS.

<b>Achados Laboratoriais</b>	<b>Controle</b>	<b>Sepse</b>	<b>p</b>
Leucócitos	16150 (3930)	12325 (8050)	0,056
Neutrófilos	10508 (4015)	7381 (2376)	0,064
Plaquetas	212500 (104000)	215000 (107000)	0,514
CRP (mg/dl)	0,8 (0,4)	4,7 (12,6)	0,133
Relação I/T	0,005 (0,02)	0,04 (0,07)	0,053

Nota: RCP = Proteína C Reativa; I/T = Neutrófilos imaturos/ Neutrófilos totais; HR = Hospital Regional; HU = Hospital Universitário; SCCG = Santa Casa de Campo Grande. Resultados apresentados através de mediana +- semi-amplitude. Análise estatística através do Teste de *Mann-Whitney*.

Para o desenvolvimento da PCRtr para diagnóstico das bactérias especificadas, foram extraídas amostras de DNA genômico das amostras e dos controles positivos, sendo quantificados como descrito na metodologia e mostrado no Apêndice C.

As amostras de DNA bacteriano foram testadas para a presença dos sete microrganismos, com objetivo de padronização dos *primers* e os resultados da amplificação dos fragmentos alvos demonstrando a especificidade dos *primers* selecionados, pelas curvas de amplificação e de dissociação na PCRtr multiplex (heptaplex), podem ser observados na figura 1. A figura 2 representa o géil de poliacrilamida realizado para demonstrar as bandas específicas dos *primers* das sete bactérias selecionadas para o diagnóstico.

As amostras de DNA dos pacientes foram testadas para a presença de microrganismos bacterianos através do *primer* universal, sendo demonstrada positividade nas 150 das amostras. Os resultados da amplificação dos fragmentos alvos demonstrando a especificidade do *primer* universal, observados pelas curvas de amplificação e de dissociação na PCRtr, podem ser observados na figura 3.

Figura 1 – Resultados típicos obtidos pela PCRtr heptaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade dos *primers*. (SA) = *S. aureus*. (AG) = *S. agalactiae*. (EC) = *E. coli*. (PA) = *P. aeruginosa*. (KP) = *K. pneumoniae*. (EN) = *Enterobacter sp.* (SE) = *Serratia sp.*

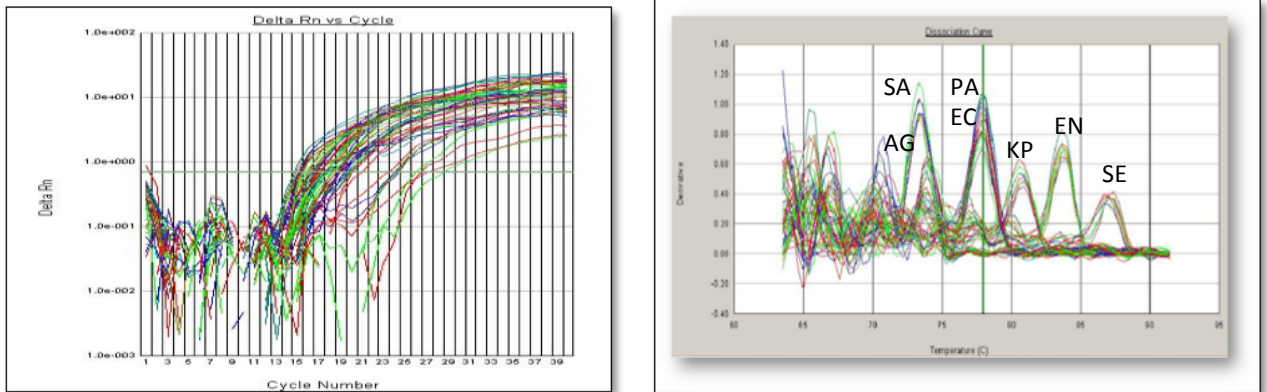


Figura 2 – Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida, da PCR heptaplex, para o diagnóstico de sete espécimes bacterianas. Colunas: (M) = Marcador 50pb ladder. (1) = *S. agalactiae*. (2) = *E. coli*. (3) = *Enterobacter sp.* (4) = *S. aureus*. (5) = *Serratia sp.* (6) = *P.aeruginosa*. (7) = *K. pneumoniae*. (8) = mix de *primers*.

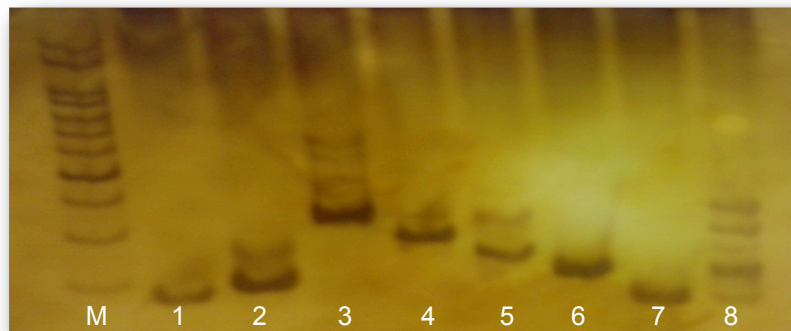
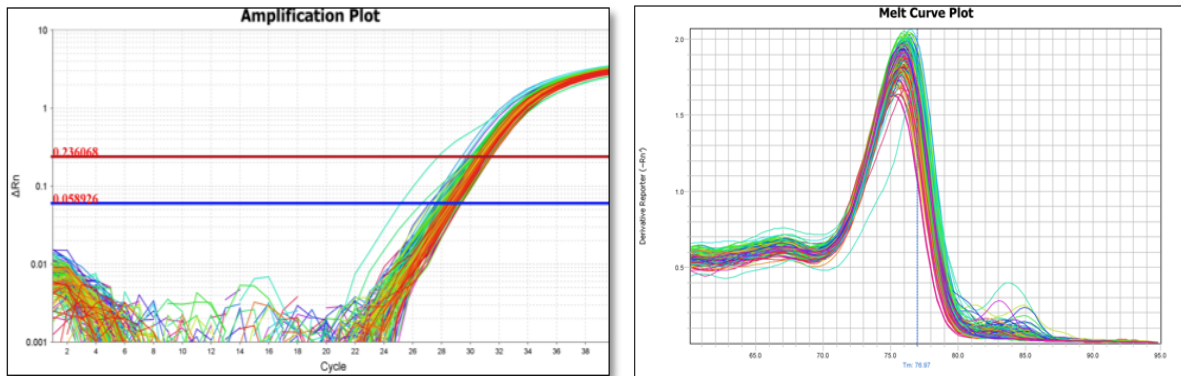


Figura 3 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primer* universal (n=150).



As amostras de DNA dos controles também foram testadas para a presença de microrganismos bacterianos através do *primer* universal, sendo demonstrada negatividade em 100% das amostras. Tais resultados podem ser observados através das curvas de dissociação da PCRtr na figura 4.

As amostras de DNA dos pacientes foram testadas para a presença de DNA genômico dos microrganismos bacterianos selecionados através dos *primers* específicos, em um PCRtr heptaplex, sendo demonstrada positividade para as bactérias pesquisadas, em 97% das amostras. A amplificação dos fragmentos alvos demonstrando a especificidade dos *primers* selecionados, pelas curvas de amplificação e de dissociação podem ser observados na figura 5.

A hemocultura foi negativa em 97% dos casos, sendo o *Streptococcus agalactiae* (2 casos), a principal bactéria entre as hemoculturas positivas, seguido de *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia sp.*, com um caso para cada.

Figura 4 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr. O gráfico representa as curvas de dissociação utilizando o *primer* universal no grupo controle (n=10).

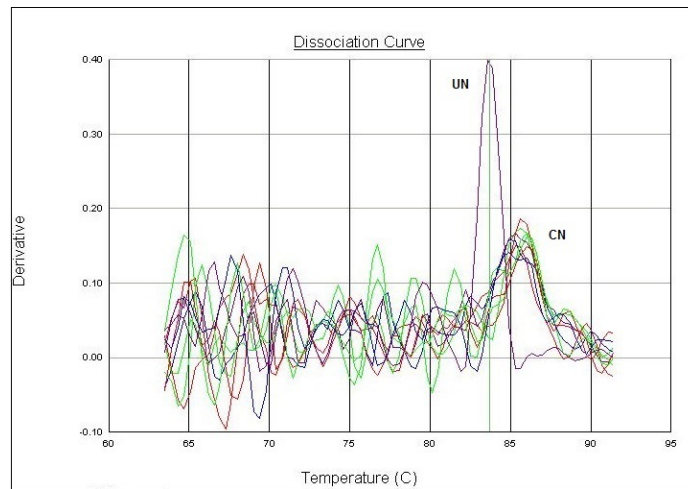
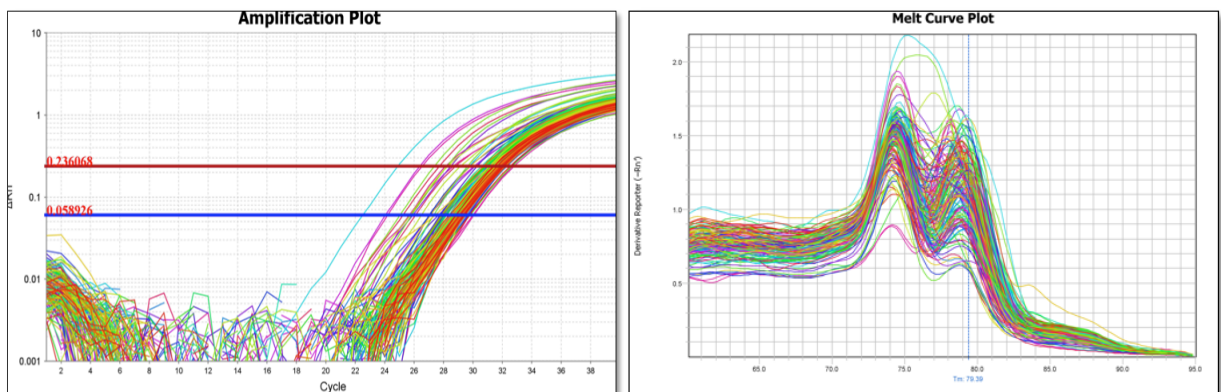


Figura 5 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr heptaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primers* selecionados (n=150).



Das 150 amostras testadas para a presença de DNA genômico dos microrganismos bacterianos selecionados por *primers* específicos através da PCRtr heptaplex, observou-se inicialmente positividade para *Streptococcus agalactiae* ou *Staphylococcus aureus* em 72 amostras (48%) e positividade para *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* em 125 amostras (83%). Não foi possível, através

deste do primeiro teste heptaplex, diferenciar tais bactérias devido a grande proximidade das temperaturas *melting* destas bactérias nas curvas de amplificação e dissociação. Tal diferenciação foi conseguida através da redução do tamanho do fragmento do *primer* antisenso para *Staphylococcus aureus* e do *primer* senso para *Pseudomonas aeruginosa*, proporcionando uma modificação na temperatura *melting* destas bactérias, o que pode ser visto na figura 6. Na figura 7 pode-se observar o PCRtr heptaplex modificado acrescido do *primer* universal (octaplex).

Figura 6 – Curvas de dissociação padrão obtidas pelo PCRtr após a modificação dos *primers*, demonstrando diferenciação entre *Staphylococcus aureus* (SA) e *Staphylococcus agalactiae* (AG) e entre *Escherichia coli* (EC) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

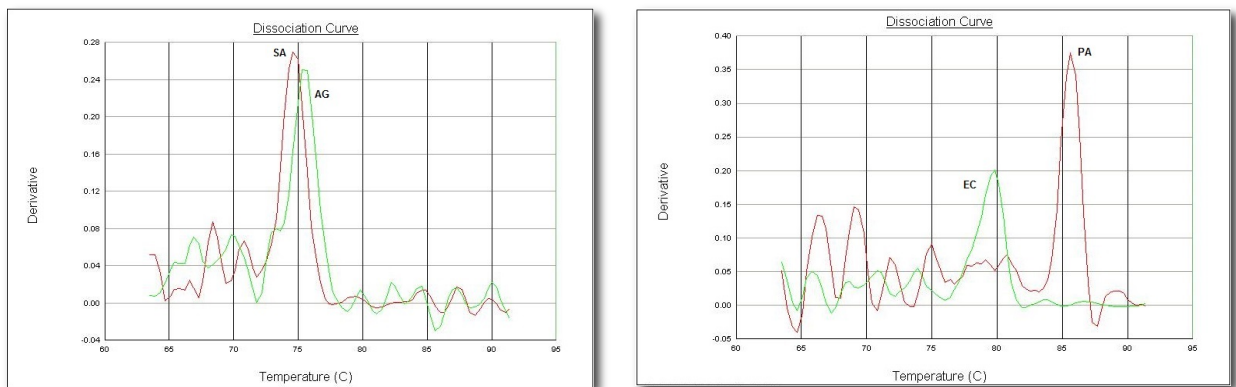
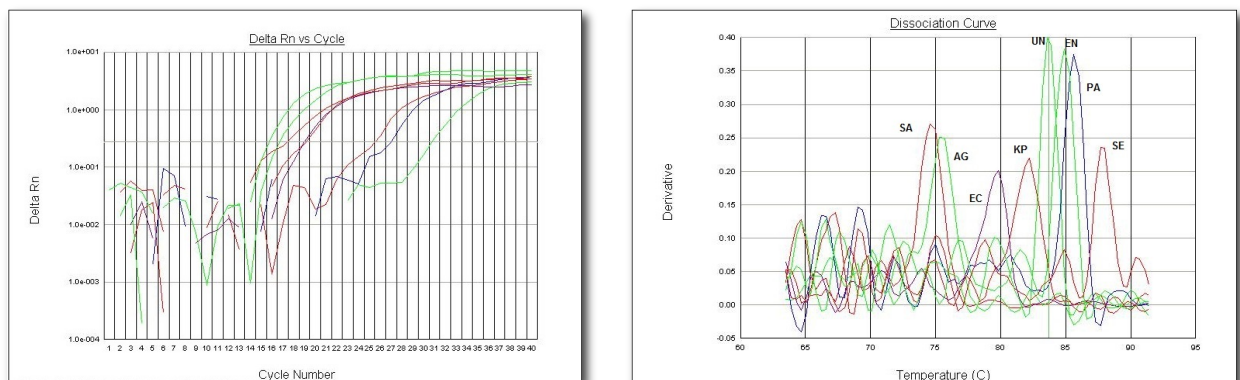


Figura 7 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr octaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade dos *primers*. (SA) = *S. aureus*. (AG) = *S. agalactiae*. (EC) = *E. coli*. (PA) = *P. aeruginosa*. (KP) = *K. pneumoniae*. (EN) = *Enterobacter sp.* (SE) = *Serratia sp.* (UN) = *primer* universal.



Assim, após a análise das novas curvas de dissociação e amplificação, foi possível inferir que 11 das amostras foram positivas para *Pseudomonas aeruginosa* (7,3%), 114 foram positivas para *Escherichia coli* (76%), 52 (34,7%) apresentaram positividade para *Staphylococcus aureus* e 20 amostras (13,3%) para *Streptococcus agalactiae*. Tais resultados da amplificação dos fragmentos alvos demonstrando a especificidade dos *primers* selecionados, pelas curvas de amplificação e dissociação na PCRtr, podem ser observados nas figuras 9 e 10.

Figura 8 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr octaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo para *S. agalactiae* ou *S. aureus* e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primers* selecionados (n=12).

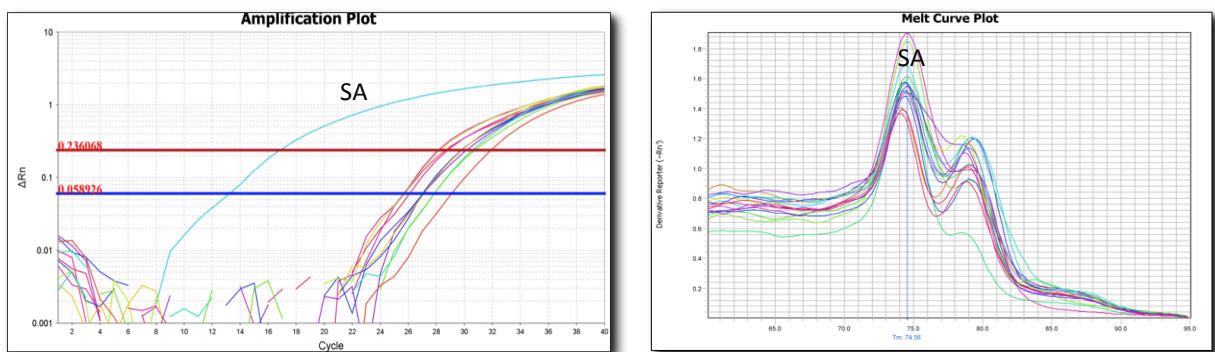
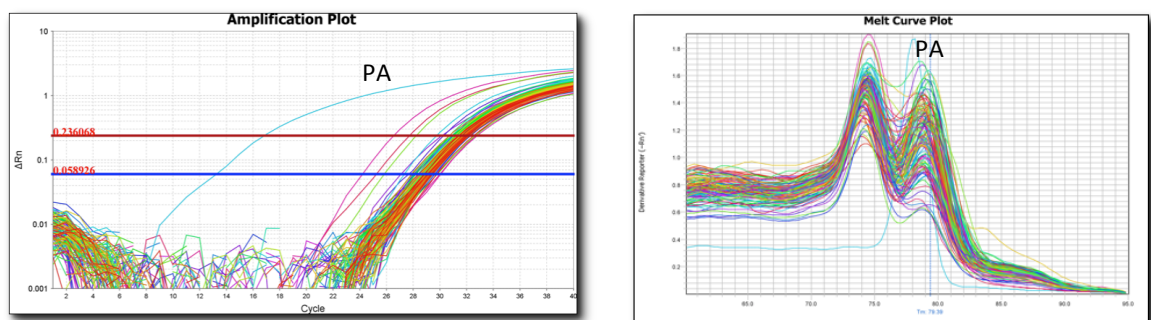
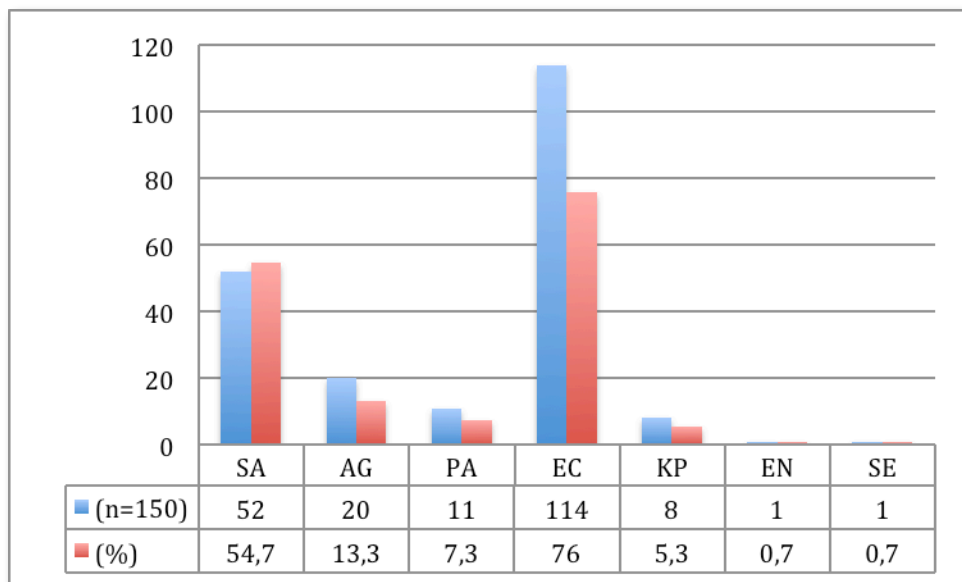


Figura 9 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr octaplex. O gráfico da esquerda representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo para *E. coli* e *P. aeruginosa*, e o da direita as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primers* selecionados (n=125).



Foi observada ainda a positividade para *Klebsiela pneumoniae* em 8 amostras e para *Enterobacter sp.* e *Serratia sp.* em 1 amostra cada. Em 5 amostras houve positividade para bactéria inespecífica, diferente das 7 incluídas no teste. Na figura 11 é possível observar o resultado final do PCRtr multiplex nas amostras selecionadas.

Figura 10 – Resultado final de detecção das 7 bactérias por *primers* específicos através de PCRtr: (SA) = *S. aureus*. (AG) = *S. agalactiae*. (EC) = *E. coli*. (PA) = *P. aeruginosa*. (KP) = *K. pneumoniae*. (EN) = *Enterobacter sp.* (SE) = *Serratia sp.*



Das 150 amostras analisadas, 72 (48%) apresentaram positividade para apenas uma bactéria. O restante das amostras apresentaram positividade para mais de uma bactéria, sendo que a associação mais comumente encontrada foi a de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em 28,6% dos casos.

A tabela 8 mostra a comparação do resultado das hemoculturas em relação ao PCRtr com *primer* universal e o heptaplex, demonstrando que, de uma maneira geral, a PCRtr heptaplex dos pacientes com sepse clínica foram microbiologicamente confirmadas no sangue em 3% das amostras. A taxa de concordância entre o PCRtr heptaplex e a hemocultura positiva pela mesma bactéria



foi de 75%. Apenas um paciente com hemocultura positiva para *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou PCRtr heptaplex positivo para a mesma bactéria.

Tabela 8 – Comparação dos resultados das hemoculturas e do PCRtr com *primer* universal e heptaplex, na população estudada, em Campo Grande – MS.

Teste	Hemocultura positiva	Hemocultura negativa	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Universal			
PCR positivo	4 (3)	146 (97)	150 (100)
PCR negativo	0 (0)	10 (100)	10 (100)
Heptaplex			
PCR positivo	3 (3)	142 (97)	145 (100)
PCR negativo	1 (7)	14 (93)	15 (100)

## 6 DISCUSSÃO

A mortalidade neonatal é cada vez mais reconhecida como um importante desafio de saúde pública global. Cerca de 4 milhões de mortes neonatais por ano ocorrem em países em desenvolvimento. Estima-se que mais de um terço destas mortes estejam relacionadas com infecções, que em geral, costumam não ser satisfatoriamente identificadas e tratadas em tais países (THAVER; ZAIDI, 2009). Dentre os esforços para a mudança deste quadro, destacam-se a necessidade de investimentos em pesquisa com foco no diagnóstico, etiologia e otimização do manejo da sepse neonatal (QAZI; STOLL, 2009; BAHL *et al.*, 2009).

A incidência da sepse no período neonatal é maior do que em qualquer outro período da vida e varia de hospital para hospital. A média de incidência de sepse neonatal comprovada por cultura é de 16 por 1000 nascidos vivos, segundo Satar e Özlü (2012), sendo que, segundo estes mesmos autores, a sepse neonatal precoce comprovada por cultura varia de 2,2 a 9,8 por 1000 nascidos vivos e a incidência de sepse clínica varia de 20 a 50 por 1000 nascidos vivos.

Nem o tratamento e tampouco os resultados em termos de neurodesenvolvimento dos neonatos sobreviventes à sepse tem mudado significativamente nos últimos 30 anos, apesar dos grandes esforços em reduzir as elevadas taxas de infecção neonatal, o que tem ocorrido no contexto de grandes avanços em outras áreas do cuidado neonatal como os ocorridos na nutrição, no manejo do *distress* respiratório e da hipertensão pulmonar e no uso da hipotermia terapêutica na encefalopatia hipóxico-isquêmica (WYNN *et al.*, 2014). Assim, justifica-se a busca e o aprimoramento de novas técnicas diagnósticas, dentre as quais as moleculares, que por demonstrarem-se mais rápidas, específicas e sensíveis no diagnóstico da sepse neonatal, tem o potencial de no futuro até substituir os atuais métodos microbiológicos (PAMMI *et al.*, 2011). Além disso, deve-se levar em consideração que o diagnóstico rápido aliado à antibioticoterapia precoce e ao apropriado manejo dos problemas metabólicos e respiratórios podem reduzir de forma significativa os problemas futuros relacionados à sepse neonatal precoce (MORAIS; CAMPOS; SILVESTRINI, 2005).

Tendo em vista a amplitude do problema e o grande impacto em termos de morbimortalidade que os episódios de sepse neonatal precoce resultam tanto para os pacientes quanto para os sistemas de saúde, neste estudo, foi realizada a determinação de

DNA genômico das amostras de sangue dos neonatos com suspeita clínica de sepse precoce através de PCRtr multiplex, bem como a avaliação dos sintomas e fatores de risco relacionados à condição clínica destes pacientes, a fim de oferecer subsídios para uma conduta mais ágil e eficaz tanto no favorecimento de um diagnóstico correto e precoce, quanto na elaboração de medidas de controle de infecção para esses pacientes.

Para a determinação de DNA das bactérias no sangue dos recém-nascidos com suspeita de sepse precoce, foi utilizada neste estudo a PCR multiplex em tempo real por se tratar de um método que, além de ser capaz de diagnosticar várias bactérias simultaneamente, é mais rápido, preciso e sensível em relação ao PCR convencional (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; WITTEWERT *et al.*, 2001). A utilização da PCR para avaliação de crianças com sepse admitidas em unidades de terapia intensiva pode diminuir as taxas de antibioticoterapia empírica e o tempo de permanência hospitalar (BROZANSKI *et al.*, 2006).

Foi observado neste trabalho um predomínio de recém-nascidos com baixo peso (peso de nascimento menor de 2500g), entre os pacientes com SNP. Segundo o estudo de Goulart *et al.* (2006), o baixo peso ao nascimento ocasionou um aumento da probabilidade de infecção neonatal precoce em 11,7 vezes. Baixa idade gestacional e baixo peso são frequentemente utilizados juntamente e são altamente interligados, porém a importância da IG no risco de SNP é maior (BENITZ; GOULD; DRUZIN, 1999)

Com relação a sintomatologia, observou-se que a quase totalidade dos recém-nascidos apresentou sinais clínicos como disfunção respiratória ou cianose. De acordo com Russel (2010) e Simonsen *et al.* (2014), os sintomas mais comuns como apresentação clínica da SNP são os relacionados ao sistema respiratório, incluindo apnéia, cianose, gemência, batimento de asa nasal e retrações intercostais.

Todos os pacientes com diagnóstico de sepse clínica incluídos no estudo utilizaram algum esquema antibiótico empírico, sendo o esquema combinando ampicilina e gentamicina, o mais frequentemente utilizado (95% dos casos). Tal esquema é o recomendado e também o mais descrito na literatura, de acordo com o descrito por Darmstadt, Batra e Zaidi (2009) e Stoll *et al.* (2011).

A associação entre colonização vaginal materna e SGB é amplamente reconhecida como fator de risco para sepse neonatal por este patógeno. Baseado nisso recomenda-se o *screening* para SGB em todas as gestantes entre 35 e 37 semanas de idade gestacional, através de cultura vaginal e retal. A administração intraparto de antibioticoterapia apropriada pode diminuir a colonização por SGB do recém-nascido para menos de 10% e reduzir a

doença invasiva neonatal em até 90% (CDC, 2010). Nos programas de assistência pré-natal locais essa prática ainda não é rotineira, visto que apenas 2% das gestantes realizaram tal *screening*, o que foi da mesma forma observado no estudo de Goulardt *et al.* (2006), reforçando a necessidade da implantação desta rotina no sistema público de saúde.

Neste estudo a mediana de consultas de pré-natal entre as gestantes foi de 6 consultas no grupo com sepse clínica, corroborando o também descrito por Goulardt *et al.* (2006), os quais descreveram que a probabilidade de apresentar sepse neonatal foi 1,78 vezes maior em gestantes que realizaram um número igual ou inferior a seis consultas no seu pré-natal. Outros importantes fatores relacionados à SNP são as infecções maternas associadas ao trato geniturinário, consideradas na literatura importantes fatores na elevação do risco de sepse neonatal (BENITZ; GOULD; DRUZIN, 1999; ESCHENBACH, 2002).

As infecções maternas do trato genito-urinário, revelaram-se, como na literatura, fatores importantes na elevação do risco de sepse neonatal (CAMACHO-GONZALEZ; SPEARMAN; STOLL, 2013; SATAR; ÖZLÜ, 2012). Pôde-se observar que a maioria dos pacientes com sepse clínica tinham mãe com história de infecção durante o período gestacional, sendo a infecção mais prevalente, a do trato urinário no terceiro trimestre e que a maioria das mães (cerca de 67%) fizeram uso de antibiótico em algum momento no período gestacional. Ainda, foi observado que a ruptura de membranas superior a 18 horas ocorreu em cerca de 25% das mães destes pacientes. As membranas fetais formam uma barreira para as bactérias do trato genital materno, sendo sua ruptura considerada um fator de risco significativo para SNP. Em um estudo de Herbst e Kallen (2007) foi demonstrado um aumento no risco de SNP em 1% com ruptura de membranas igual a superior a 18 horas, com elevação do risco para até 4% na evidência de corioamnionite, que neste estudo foi observada em apenas 6% dos casos. Em outro estudo, de caso-controle, que analisou fatores de risco para SNP específica para *Escherichia coli*, ruptura de membranas superior a 18 horas esteve associada a um risco 3 a 4 vezes maior de SNP (SCHRAG *et al.*, 2006).

Com relação ao tipo de parto, observou-se um predomínio de cesárea entre os recém-nascidos com sepse clínica, perfazendo cerca de 63% dos casos, o que esteve de acordo com o observado por Freitas *et al.* (2012) que encontraram a mesma porcentagem de cesárea nos pacientes com sepse, e por Escobar *et al.* (2013), os quais descreveram seu estudo de coorte uma taxa de cesárea duas vezes maior em neonatos com sepse neonatal precoce.

A análise dos casos de SNP clínica revelou um predomínio de recém-nascidos do sexo masculino, o que está de acordo com o descrito na literatura (BHAT; BABY, 2011; FAHMEY, 2013). Acredita-se que a causa pode estar relacionada a genes

imunorregulatórios localizados no cromossomo X e envolvido funcionalmente com o timo ou com a síntese de imunoglobulinas, representando, desta forma, um fator de proteção ao sexo feminino (REMINGTON *et al.*, 2011).

Encontrou-se neste estudo um importante predomínio de pacientes prematuros com SNP. Considera-se que a baixa idade gestacional seja um dos mais poderosos fatores de risco preditivos de SNP (MUKHOPADHYAY; PUOPOLO, 2012). Os prematuros estão sob risco significativo de SNP quando comparados com os recém-nascidos a termo. A magnitude da diferença está relacionada à idade gestacional. Neonatos de 34 a 36 semanas de IG tem incidência 2 a 3 vezes maior de SNP quando comparados aos nascidos entre 37 e 40 semanas (PUOPOLO *et al.*, 2011). A vulnerabilidade à infecção nos pacientes prematuros reflete um sistema imune imaturo com deficiência em uma série de mecanismos como redução de imunoglobulinas e complemento, falha no mecanismo de opsonização, redução da capacidade fagocitária e deficiência de anticorpos derivados da mãe adquiridos passivamente (GHAZAL; DICKINSON; SMITH, 2013).

A contagem sanguínea completa com diferencial é comumente realizada na avaliação da SNP na UTI Neonatal. Porém muitos fatores podem afetar estas contagens incluindo hipertensão materna, tipo de parto, idade e forma de coleta do sangue (WYNN *et al.*, 2014). Hornik *et al.* (2012) examinou retrospectivamente a utilidade dos índices hematológicos (contagem leucocitária, contagem de neutrófilos, relação I/T e contagem plaquetária) em mais de 200.000 recém-nascidos e concluiu que tais índices não apresentaram utilidade suficiente para identificar os pacientes com sepse neonatal precoce. No presente estudo não foram observadas diferenças no número de leucócitos, neutrófilos, plaquetas, CRP e relação I/T entre o grupo com sepse clínica e o controle. A alteração laboratorial mais frequentemente observada foi a positividade para CRP ( $\geq 1\text{mg/dl}$ ) que ocorreu em 64% dos pacientes com sepse clínica. É sabido que a sensibilidade de uma dosagem isolada de CRP é de apenas 60%, sendo que a mensuração sérica em 24 e 48 horas após o nascimento melhora consideravelmente sua sensibilidade, sendo esta proteína de fase aguda um marcador diagnóstico considerado melhor do que os índices hematológicos referidos anteriormente (NG, 2003). De acordo com Benitz (2010) somente 35% dos recém-nascidos com sepse precoce comprovada por cultura e 39% daqueles com SNP clínica apresentaram níveis elevados de CRP, correspondendo ao observado neste trabalho.

A cultura microbiológica do sangue é considerada ainda o padrão-ouro no diagnóstico da sepse neonatal, porém sua sensibilidade costuma ser baixa em neonatos, sem contar na sua demora de 48 a 72 horas para tornar-se positiva (PAMMI *et al.*, 2011).

Melhorias nos sistemas automatizados para detecção do crescimento bacteriano tem resultado em aumento das taxas de positividade. No presente estudo a taxa de positividade da hemocultura foi de 3%, semelhante ao encontrado por Al-Taiar *et al.* (2011), os quais observaram uma taxa de positividade de 4,6%. Outros estudos, porém descreveram taxas mais altas de positividade em suas hemoculturas, como os 23,59% encontrados por Patel *et al.* (2014) e os 42% observados por Hussein e Khaled (2007). A baixa taxa de positividade encontrada neste estudo pode ter sido influenciada por vários fatores tais como a técnica utilizada na análise das culturas em cada serviço, a limitação existente no volume sanguíneo obtido para a cultura devido ao peso e condições clínicas do paciente que na maior parte das vezes foi prematuro e a alta taxa observada de uso de antibiótico antenatal (CAMACHO-GONZALEZ; SPEARMAN; STOLL, 2013).

Desta maneira, o resultado negativo em uma hemocultura não implica necessariamente na inexistência da sepse bacteriana em um neonato, o que justifica a dificuldade do isolamento do microrganismo mesmo quando presente na corrente sanguínea. Tudo isso torna cada vez mais necessária à implementação de técnicas de biologia molecular, tais como a PCR, por se tratar de um método mais rápido e específico na detecção da presença do microrganismo no sangue, tornando-se uma excelente ferramenta no auxílio e tratamento desses pacientes.

Neste estudo foi encontrada positividade no PCRtr em todos os pacientes, quando se utilizou o *primer* universal, sendo que em 97% dos pacientes foi encontrado DNA genômico de uma ou mais das sete bactérias pesquisadas através do PCRtr heptaplex. Deve-se ressaltar, porém, que um resultado positivo para presença de DNA genômico no sangue não significa necessariamente que o paciente esteja apresentando quadro de sepse por aquela bactéria, podendo sugerir apenas uma possível colonização bacteriana (GALVES, 2013). No entanto, o risco da sepse verdadeira aumenta consideravelmente quanto tais resultados apresentam-se em um paciente com fatores de risco e sinais clínicos de infecção.

Os dois pacientes com hemoculturas positivas para *Streptococcus agalactiae* e *Serratia* sp. também apresentaram positividade para estas bactérias no PCRtr com *primer* universal e no heptaplex. Já o paciente com positividade na hemocultura para *Pseudomonas aeruginosa* apresentou positividade para esta bactéria somente no PCRtr com *primer* universal. Tais resultados confirmam uma maior taxa de positividade do PCRtr em comparação com os métodos baseados em cultura, tal como o descrito por Bloos *et al.* (2012). A concordância das hemoculturas positivas com a detecção da mesma bactéria no PCRtr heptaplex em pacientes com sepse clínica foi de 75%, resultado semelhante ao encontrado por Bloos *et al.* (2010), que descreveram uma concordância de 70%. Por outro

lado, a concordância dos resultados de PCRtr heptaplex positivos confirmados por hemocultura foi de somente 3%. Neste caso, estes últimos autores encontraram uma concordância maior, de 21%. Isto sugere, como já referido, que a presença de DNA bacteriano nem sempre tem significância fisiopatológica, não indicando necessariamente a presença de bactérias viáveis no sangue. Com base nas conhecidas limitações das hemoculturas, a questão da significância da presença do DNA genômico no sangue de pacientes com sepse clínica torna-se de grande relevância, necessitando a realização de novos estudos para sua melhor compreensão.

Os achados deste trabalho sugerem que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* sejam os principais agentes causadores da SNP, com um predomínio de bactérias gram-negativas entre o total. Tal predomínio, assim como o achado de que o *Staphylococcus aureus* é a bactéria gram-positiva mais comumente encontrada, acaba confirmando o descrito por Zaidi *et al.* (2009) em estudo de neonatos com SNP em países da América Latina, Caribe, Ásia e África. No Brasil, o estudo de Paes *et al.* (2007) e Silva *et al.* (2009), ambos realizados no Pará também demonstraram um predomínio de bactérias Gram-negativas entre os pacientes com SNP, o que foi também observado por Fahmey (2013) na Índia, porém neste último estudo houve um predomínio de *Klebsiella pneumoniae*. O estudo de Sharma *et al.* (2013) também demonstrou entre os principais bactérias encontradas na SNP, o *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*. É sugerido que após a introdução da antibioticoterapia profilática anteparto, as bactérias gram-negativas, especialmente *Escherichia coli*, tenham tornado-se mais comuns, principalmente entre a população de prematuros (FALCIGLIA *et al.*, 2012). Destaca-se que este é o primeiro trabalho a descrever o perfil etiológico de uma população de neonatos com SNP através de um método molecular (PCRtr), motivo pelo qual a análise comparativa se fez com estudos que utilizaram a hemocultura e não métodos moleculares.

Nenhum dos dois métodos analisados neste estudo, PCRtr e hemocultura, representam métodos perfeitos para o diagnóstico de infecção sanguínea em neonatos. O PCR tem suas limitações principalmente no painel restrito de microrganismos pesquisados, na especificidade de seus *primers* e na variabilidade genética do *amplicon* alvo, bem como no pequeno volume de amostra coletada. Além disso, a PCR teoricamente pode detectar todo DNA na amostra, incluindo o DNA livre advindo de bactérias não viáveis e fungos (LOUIE *et al.*, 2008).

O desenvolvimento deste novo teste baseado em PCRtr multiplex para a detecção rápida (resultados puderam ser obtidos em até 6 horas) e sensível de importantes patógenos causadores de SNP pode potencialmente se sobressair em comparação com os

métodos microbiológicos baseados em cultura, com o objetivo de facilitar a progressão para uma terapia antimicrobiana que seja específica, o que é especialmente relevante em recém-nascidos a termo e prematuros, em que o tratamento empírico é geralmente utilizado de forma abusiva nas unidades de terapia intensiva neonatal (LUCIGNANO *et al.*, 2011).



## 7 CONCLUSÃO

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), utilizados no PCRtr multiplex, demonstraram-se adequados e sensíveis para o diagnóstico da sepse neonatal precoce e para o diagnóstico da presença de DNA genômico das bactérias pesquisadas.

A adaptação deste método (PCRtr) apresentou índices muito superiores de positividade para detectar as sete bactérias pesquisadas, quando comparados as hemoculturas, demonstrando uma boa sensibilidade na determinação de DNA genômico de bactérias dos neonatos com diagnóstico clínico de sepse precoce.

Todos os neonatos com sepse neonatal precoce clínica apresentaram positividade no PCRtr com a utilização do *primer* universal.

Na análise com PCRtr heptaplex, encontrou-se 97% de positividade para as bactérias pesquisadas.

As bactérias com DNA genômico mais frequentemente encontrado através da análise por PCRtr heptaplex nos neonatos com sepse neonatal precoce clínica foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

Os achados clínicos apontaram o sexo masculino, a prematuridade e o baixo peso como os padrões mais frequentemente encontrados. Em relação a sintomatologia, a disfunção respiratória foi a apresentação clínica mais frequente. O achado laboratorial mais frequentemente encontrado foi a positividade para CRP. A respeito dos fatores de risco maternos sobressaiu-se a alta taxa de infecção do trato genito-urinário, o baixo número de consultas pré-natais e a falta de *screening* para SGB. O tipo de parto mais comum entre os pacientes com SNP foi a cesárea.

Os resultados deste primeiro estudo da SNP através de PCRtr multiplex demonstraram que o teste é sensível na detecção do DNA genômico dos patógenos pesquisados, tornando-se uma ferramenta diagnóstica importante no paciente em que a infecção é suspeita. A detecção microbiana precoce tem o potencial de facilitar e agilizar as decisões quanto ao início do tratamento e a seleção e adequação dos antimicrobianos, tendo como objetivo final a redução da morbimortalidade do paciente.

## REFERÊNCIAS

AL-TAIAR A.; HAMMOUD M.S.; THALIB L.; ISAACS D. Pattern and etiology of culture-proven early-onset neonatal sepsis: a five-year prospective study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. e631-e634, Sep. 2011.

BAHL R.; MARTINES J.; ALI N.; BHAN M.K.; CARLO W.; CHAN K.Y.; DARMSTADT G.L.; HAMER D.H.; LAWN J.E.; MCMILLAN D.D.; HAMER D.H.; PAUL V.; TSAI A.C.; VICTORA C.G.; WEBER M.W.; ZAIDI A.K.M.; RUDAN I. Research Priorities to Reduce Global Mortality From Newborn Infections by 2015. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 1, p. S43-S48, Jan. 2009.

BALLARD J.L.; KHOURY J.C.; WEDIG K.; WANG L.; ELLERS-WALSMAN B.L.; LIPP R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. **The Journal of Pediatrics**, v.119, n. 3, p. 417-423, Sep. 1991.

BALLOT, E.D.; NANA, T.; SRIRUTTAN, C.; COOPER P.A. Bacterial Bloodstream Infections in Neonates in a Developing Country. **ISRN Pediatrics**, v. 2012, p. 508-512, Aug. 2012.

BARROS E.R.V. **Determinação de DNA genômico de bactérias em neonatos com suspeita de sepse utilizando *primer* universal Avaliação das relações de prematuridade e doença periodontal através da detecção de DNA genômico de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em biofilme bucal materno e tecido placentário.** 2014. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.

BENITZ W.E.; HAN M.Y.; MADAN A.; RAMACHANDRA P. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. **Pediatrics**, v. 102, n. 8, p. E41, Oct. 1998.

BENITZ, W. E.; GOULD, J. B.; DRUZIN, M. L. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. **Pediatrics**, v. 103, n. 6, p. 1-14, Jun. 1999.

BENITZ W.E. Adjunct laboratory tests in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. **Clinics in Perinatology**, v. 37, n. 2, p. 421-438, June 2010.

BHAT Y.R.; BABY L.P. Early Onset of Neonatal Sepsis: Analysis of the Risk Factors and the Bacterial Isolates by Using BacT Alert System. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 5, n. 7, p. 1385-1388, Nov. 2011.

BLOOS F.; HINDER F.; BECKER K.; SACHSE S.; DESSAP A.M.; STRAUBE E.; CATTOIR V.; BRUN-BUISSON C.; REINHART K.; PETERS G.; BAUER M. A multicenter trial to compare blood culture with polymerase chain reaction in severe human sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 26, n. 2, p.241-247, Feb. 2010.

BLOOS F.; SACHSE S.; KORTGEN A.; PLETZ A.W.; LEHMANN M.; STRAUBE E.; RIEDEMANN N.C.; REINHART K.; BAUER M. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction Assay for Pathogen Detection in Septic Patients under Routine Condition: An Observational Study. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. 1-8, Sep. 2012.

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

BRYAN C.S; JOHN JR J.F; PAI M.S.; AUSTIN T.L. Gentamicin vs cefotaxime for therapy of neonatal sepsis: Relationship to drug resistance. **American Journal of Diseases of Children**, v. 139, n. 11, p. 1086-1089, Nov. 1985.

CABRAL, C.H.K. Determinação de haplótipos do gene beta S em pacientes com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6, p. 491-492, Sept. 2010.

CAMACHO-GONZALEZ A.; SPEARMAN P.W.; STOLL B.J. Neonatal Infectious Diseases: Evaluation of Neonatal Sepsis. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 2, p. 367-389, Apr. 2013.

CELIK I.H.; DEMIREL G.; ERDEVE O.; DILMEN U. Value of diferente markers in the prompt diagnosis of early-onset neonatal sepsis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. E639, Aug. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines from CDC, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 59, n. RR10, p. 1-32, Nov. 2010.

CECCON M.E.J.R. Novas Perspectivas na Sepse Neonatal. **Pediatria (São Paulo)**, v. 30, n. 4, p. 198-202, 2008.

CHIESA C.; PANERO A.; OSBORN J.F. Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Clinical and Laboratory Challenge. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 279-287, Feb. 2004.

CLOHERTY J.P.; EICHENWALD E.C.; HANSEN A.R.; STARK A.R. **Manual of Neonatal Care**. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

COTTEN M.C.; SMITH P.B. Duration of empirical antibiotic therapy for infants suspected of early-onset sepsis. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 25, n. 2, p. 167-171, Apr. 2013.

DARK P.M.; DEAN P.; WARHURST G. Bench-to-bedside review: The promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction-based pathogen detection. **Critical Care Medicine**, v. 13, n. 4, p. 217-23, July 2009.

DARMSTADT G.L.; BATRA M.; ZAIDI A.K.M. Parenteral Antibiotics for the Treatment of Serious Neonatal Bacterial Infections in Developing Country Settings. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 1, p. S37 – S42, Jan. 2009.

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, n. 1, p. 6-11, Jan. 2009.

EILAND III E.E.; BEYDA N.; HAN J.; LINDGREN W.; WARD R.; ENGLISH T.M.; HASSOUN A.; HATHCOCK K. The Utility of Rapid Microbiological and Molecular Techniques in Optimizing Antimicrobial Therapy. **Scholarly Research Exchange Pharmacology**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

ESCHENBACH, D. A. Prevention of neonatal group B streptococcal infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 4, p. 280-281, July 2002.

ESCOBAR G.J.; PUOPOLO K.M.; WI S.; TURK B.J.; KUZNIEWICZ M.W.; WALSH E.M.; NEWMAN T.B.; ZUPANCIC J.; LIEBERMAN E.; DRAPER D. Stratification of Risk of Early-Onset Sepsis in Newborns  $\geq$  Weeks' Gestacion. **Pediatrics**, v. 33, n. 30, p. 30-36, Dec. 2013.

FAHMEY S.S. Early-onset sepsis in a neonatal intensive care unit in Beni Suef, Egypt: bacterial isolates and antibiotic resistance pattern. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 56, n. 8, p. 332-337, Aug. 2013.

FALCIGLIA G.; HAGEMAN J.R.; SCHREIBER M.; ALEXANDER K. Antibiotic Therapy and Early Onset Sepsis. **NeoReviews**, v.13, n. 2, p. E86-93, Feb. 2012.

FENTON T.R. A new growth chart for preterm babies: Babson and Benda's chart updated with recent data and a new format. **BMC Pediatrics**, v. 3, p. 1-10, Dec. 2003.

FERREIRA L.E.; DALPOSSO K.; HACKBARTH B.B.; GONÇALVES A.R.; WESTPHAL E.A.; FRANÇA P.H.C.; PINHO M.S.L. Painel Molecular para detecção de microrganismos associados à sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 36-40, Jan./Mar. 2011.

FLIDEL-RIMON O.; GALSTYAN S.; JUSTER-REICHER A.; ROZIN I.; SHINWELL E. Limitations of the risk fator based approach in early neonatal sepsis evaluations. **Acta Paediatrica**, v. 101, n. 12, p. e540-e544, Dec. 2012.

FREITAS B.A.C.; SANT'ANA L.F.R.; LONGO G.Z.; SIQUEIRA-BATISTA R.; PRIORE S.E.; FRANCESCHINI S.C.C. Características epidemiológicas e óbitos de prematuros atendidos em hospital de referência para gestante de alto risco. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 386-392, Dec. 2012.

FURTADO I. **Detecção por Reação em Cadeia da Polimerase de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em Sangue de Recém-Nascidos**. 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

FURTADO I.; XAVIER P.C.N.; TAVARES L.V.M.; ALVES F.; MARTINS S.F.; MARTINS A.S.; PALHARES D.B. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in blood of newborns with suspected nosocomial infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 77-80, Jan./Feb. 2014.

FUJIMORI M.; HISATA K.; NAGATA S.; MATSUNAGA N.; SHOJI H.; SATO H.; HIAMASHIRO Y.; ASAHARA T.; NOMOTO K.; SHIMIZU T. Efficacy of bacterial ribosomal RNA-targeted reverse transcription-quantitative PCR for detecting neonatal sepsis: a case control study. **BMC Pediatrics**, v.10, n. 53, July 2010.

GALVES T.C.B. **Determinação de DNA genômico de bactérias em neonatos com suspeita de sepse utilizando primer universal**. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

GERDES J.S. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. **Pediatric Clinics of North America**, v. 51, p. 939-959, 2004.

GHAZAL P.; DICKINSON P.; SMITH C.L. Early life response to infection. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 26, n. 3, p. 213-218, June 2013.

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, n. 2, p. 148-153, Abril/Junho 2006.

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

HERBST A.; KALLEN K. Time between membrane rupture and delivery and septicemia in term neonates. **Obstetrics and Gynecology**, v. 110, n. 3, p. 612-618, Sep. 2007.

HOFER N.; ZACHARIAS E.; MÜLLER W.; RESCH B. An update on the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: current insights and new tasks. **Neonatology**, v. 102, n. 1, p. 25-36, Apr. 2012.

HORNIK C.P.; BENJAMIN D.K.; BECKER K.C.; BENJAMIN D.K. JR.; LI J.; CLARK R.H.; COHEN-WOLKOWIEZ M.; SMITH P.B. Use of the complete blood cell count in early-onset neonatal sepsis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 31, n. 8, p. 799-802, Aug. 2012.

HUSSEIN A.B.; KHALED M.A. C-reactive protein in Neonates With Suspected Septicemia. **Rawal Medical Journal**, v. 32, n. 1, p. 24-27, 2007.

JOHNSTON S.E.; ANTHONY M. Antibiotics for early onset neonatal infection. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 98, n. 2, p. F184-F185, Mar. 2013.

JORDAN J.A.; DURSO M.B. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detecting Bacterial DNA Directly from Blood of Neonates Being Evaluated for Sepsis. **Journal of Molecular Diagnosis**, v. 7, n. 5, p. 575-581, Nov. 2005.

JORDAN J.A.; DURSO M.B.; BUTCHKO A.R.; JONES J.J.; BROZANSKI B.S. Evaluating the Near-Term Infant for Early Onset Sepsis: Progress and Challenges to Consider with 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Testing. **Journal of Molecular Diagnosis**, v. 8, n. 3, p. 357-363, July 2006.

LABIB A.Z.; MAHMOUD A.B.; EISSA N.A.A.; GENDY F.M.E.; 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, n. 1, p. 77-85, 2013.

LEVENE M.I.; TUDEHOPE D.I.; SINHA S. **Essentials of Neonatal Medicine**. 4 th ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2010.

LOUIE L.; GOODFELLOW J.; MATHIEU P.; GLATT A.; LOUIE M.; SIMOR A.E. Rapid Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci from Blood Culture Bottles by Using a Multiplex PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2786-2790, Aug. 2002.

LOUIE R.F.; TANG Z.; ALBERTSON T.E.; COHEN S.; TRAN N.K.; KOST G.J. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 5, p. 1487-1492, May 2008.

LUCIGNANO B.; RANNO S.; LIESENFELD O.; PIZZORNO B.; PUTIGNANI L.; BERNARCHI P.; MENICHELLA D. Multiplex PCR Allows Rapid and Accurate Diagnosis in Newborns and Children with Suspected Sepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2252-2258, June 2011.

MAKHOUL I.R.; SMOLKIN T.; SUJOV P.; KASSIS I.; TAMIR A.; SHALGINOV R.; SPRECHER H. PCR-Based Diagnosis of Neonatal Staphylococcal Bacteremias. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4823-4825, Sep. 2005.

MARTIN J.R.; FANAROFF A.A.; WALSH M.C. **Fanaroff & Martin's Neonatal-Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant**. 9 th ed. Missouri: Elsevier, 2011.

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**. 2009. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

MISHRA U.K.; JACOBS S.E.; DOYLE L.W.; GARLAND S.M. Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 91, n. 3, p. F208-F212, May 2006.

MIURA E.; SILVEIRA R.C.; PROCIANOY R.S. Sepse neonatal: diagnóstico e tratamento. **Jornal de pediatria**, Rio de Janeiro, v. 75 , Suppl 1, p. 57-62, jul./ago. 1999.

MORAIS, MB; CAMPOS, SO; SILVESTRINI, WS. **Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar: Pediatria**. Manole, v. 1, p. 237-247, 2005.

MUHAMMAD Z.; AHMED A.; HAYAT U.; WAZIR M.S.; RAFIYATULLAH, WAQAS H. Neonatal Sepsis: Causative Bacteria and Their Resistance to Antibiotics. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 22, n. 4, p. 33-36, Oct./Dec. 2010.

MUKHOPADHYAY S.; PUOPOLO K.M. Risk Assessment in Neonatal Early Onset Sepsis. **Seminars in Perinatology**, v. 36, n. 6, p. 408-415, Dec. 2012.



NATARAJAN G.; JOHNSON Y.R.; ZHANG F.; CHEN K.M.; WORSHAM M.J. Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection of Group B Streptococcal Colonization in Neonates. **Pediatrics**, v. 118, n. 1, p. 14-22, July 2006.

NG P.C. Diagnostic markers of infection in neonates. **Archives of Disease in Childhood: Fetal & Neonatal**. London, v. 89, p. 229-235, May 2004.

NOVAIS C.M.; PIRES-ALVES M. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, Jul./Dez. 2004.

OTTOLINI M.C.; LUNDGREN K.; MIRKINSON L.J.; CASON S.; OTTOLINI M.G. Utility of complete blood count and blood culture screening to diagnose neonatal sepsis in the asymptomatic at risk newborn. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 22, n. 5, p. 430-434, May 2002.

PAES A.L.V.; MALVEIRA S.S.; SANTOS H.L.; SOUSA S.O. Sepse entre os recém-nascidos internados em uma unidade neonatal. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 4, p. 83, Dez. 2007.

PALKA-SANTINI M.; CLEVEN B.E.; EICHINGER L.; KRÖNKE M.; KRUT O. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1-14, Jan. 2009.

PAMMI M.; FLORES A.; LEEFLANG M.; VERSALOVIC J. Molecular Assays in the Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Systematic Review and Meta-analysis. **Pediatrics**, v. 128, n. 4, p. e973-e985, Oct. 2011.

PATEL D.; NIMBALKAR A.; SETHI A.; KUNGWANI A.; NIMBALKAR S. Blood Culture Isolates in Neonatal Sepsis and their Sensitivity in Anand District of India. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 81, n. 8, p. 785-790, Aug. 2014.

POLIN R.A.; ST GEME III J.W. Neonatal sepsis. **Advances in Pediatrics Infectious Disease**, v. 7, p. 25-61, 1992.

POLIN R.A.; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN. Management of Neonates with Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis. **Pediatrics**, v. 129, n. 5, p. 1006-1015, May 2012.

PUOPOLO K.M.; DRAPER D.; WI S.; NEWMAN T.B.; ZUPANCIC J.; LIEBERMAN E.; SMITH M.; ESCOBAR G.J. Estimating the probability of neonatal early-onset infection on the basis of maternal risk factors. **Pediatrics**, v. 128, n. 5, p. e1155-e1163, Nov. 2011.

PUOPOLO K.M.; ESCOBAR G.J. Early-onset sepsis: a predictive model based on maternal risk factors. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 25 n. 2, p. 161-166, Apr. 2013.

PUSTERLA N.; MAGDESIAN G.; MAPES S.; LEUTENEGGER C.M. Expression of molecular markers in blood of neonatal foals with sepsis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 6, p. 1045-1049, June 2006.

QAZI S.A.; STOLL B.J. Neonatal Sepsis. A Major Global Public Health Challenge. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 1, p. S1-S2, Jan. 2009.

REIER-NILSEN T.; FARSTAD T.; NAKSTAD B.; LAUVRAK V.; STEINBAKK M. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. **BMC Pediatrics**, v. 9, n. 5, p. 1-8, Jan. 2009.

REIS R.B.J. **Prevalência de DNA genômico para *Staphylococcus epidermidis* plasmô coagulase negativa em neonatos maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção.** 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

REMYINGTON J.S.; KLEIN J.O.; WILSON C.B.; NIZET V.; MALDONADO Y.A. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.** 7. Ed. Philadelphia: Elsevier, 2011.

RODWELL R.L.; LESLIE A.L.; TUDEHOPE D.I. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. **The Journal of Pediatrics**, v. 112, n. 5, p. 761-767, May 1988.

RUPPENTHAL R.D.; PEREIRA F.S.; CANTARELLI V.V.; SCHRANK I.S. Application of Broad-Range Bacterial PCR Amplification and Direct Sequencing on the Diagnosis of Neonatal Sepsis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 29-35, Jan./Mar. 2005.

RUSSEL A.R.B. Neonatal sepsis. **Pediatrics and Child Health Journal**, v. 21, n. 6, p. 265-269, June 2011.

SHARMA C.M.; AGRAWAL R.P.; SHARAN H.; KUMAR B.; SHARMA D.; BHATIA S.S. "Neonatal Sepsis": Bacteria & their Susceptibility Pattern towards Antibiotics in Neonatal Intensive Care Unit. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 11, p. 2511-2513, Nov. 2013.

SATAR M.; ÖZLÜ F. Neonatal sepsis: a continuing disease burden. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 54, n. 5, p. 449-457, Sep./Oct. 2012.

SCHRAG S.J.; HADLER J.L.; ARNOLD K.E.; MARTELL-CLEARY P.; REINGOLD A.; SCHUCHAT A. Risk factors for invasive, early onset Escherichia coli infections in the era of widespread intrapartum antibiotic use. **Pediatrics**, v. 118, v. 2, p. 570-576, Aug. 2006.

SHAH B.A.; PADBURY J.F. Neonatal sepsis: An old problem with new insights. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 170-178, Jan. 2014.

SHANE A.L.; STOLL B.J. Recent Developments and Current Issues in the Epidemiology, Diagnosis, and Management of Bacterial and Fungal Neonatal Sepsis, **American Journal of Perinatology**, v. 30, p. 131-142, July 2013.

SHANE A.L.; STOLL B.J. Neonatal sepsis: Progress towards improved outcomes. **Journal of Infection**, v. 68, p. S24-S32, Jan. 2014.

SILVA E.H.L.S.; VASCONCELOS M.F.; GOMES N.J.B.; FARIAS D.C.; MALVEIRA S.S.; CHERMONT A.G. Etiologia da sepse em uma unidade neonatal pública de referência. **Revista Paraense de Medicina**, v. 23, n. 3, jul./set. 2009.

SILVEIRA R.C.; PROCIANOY R.S. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  for early diagnosis of neonatal sepsis. **Acta Paediatrica**, v. 88, p. 647-650, June 1999.

SILVEIRA R.C.; PROCIANOY R.S. Uma revisão atual sobre sepse neonatal. **Boletim Científico de Pediatria da Sociedade de Pediatria do Rio Grande do Sul**, v. 1, n. 1, p. 29-35, 2012.

SIMONSEN K.A.; ANDERSON-BERRY A.L.; DELAIR S.F.; DAVIES H.D. Early-Onset Neonatal Sepsis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 21-47, Jan. 2014.

SRINIVASAN L.; HARRIS M.C. New technologies for the rapid diagnosis of neonatal sepsis. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 24, n. 2, p. 165-171, Apr. 2012.

STOLL B.J.; HANSEN N.L.; 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. Early Onset Neonatal Sepsis: The Burden of Group B Streptococcal and *E.coli* Disease Continues. **Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. 817-826, May 2011.

THAVER D.; ZAIDI A.K.M. Burden of Neonatal Infections in Developing Countries. A Review of Evidence From Community-Based Studies. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 1, p. S3-S9, Jan. 2009.

TITA A.T.; ANDREWS W.W. Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. **Clinics in Perinatology**, v. 37, n. 2, p. 339-354, June 2010.

VENKATESH M.; FLORES A.; LUNA R.A.; VERSALOVIC J. Molecular microbiological methods in the diagnosis of neonatal sepsis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 9, p. 1037-1048, Sep. 2010.

VERGNANO S.; SHARLAND M.; KAZEMBE P.; MWANSAMBO C.; HEATH P.H. Neonatal sepsis: an international perspective. **Archives of Disease in Childhood: Fetal & Neonatal**, v. 90, p. 220-224, May 2005.

WESTON E.J.; PONDO T.; LEWIS M.M.; MARTELL-CLEARY P.; MORIN C.; JEWELL B.; DAILY P.; APOSTOL M.; PETIT S.; FARLEY M.; LYNFIELD R.; REINGOLD A.; HANSEN N.I.; STOLL B.J.; SHANE A.L.; ZELL E.; SCHRAG S.J.. The Burden of Invasive Early-onset Neonatal Sepsis in the United States, 2005-2008. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, p. 937-941, Nov. 2011.

WISWELL T.E.; BAUMGART S.; GANNON C.M.; SPITZER A.R. No lumbar puncture in early neonatal sepsis: will meningitis be missed? **Pediatrics**, v. 95, n. 6, p. 803-806, June 1995.

WITTEWER C.T.; HERRMANN M.G.; GUNDRY C.N.; ELENITOBA-JOHNSON K.S. Real-Time Multiplex PCR Assays. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 430-442, Dec. 2001.

WU Y.; CHEN L.; WU X.; SHANG S.; LOU J.; DU L.; ZHAO Z. Gram Stain-Specific-Probe-Based Real-Time PCR for Diagnosis and Discrimination of Bacterial Neonatal Sepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2613-2619, Aug. 2008.

WYNN J.L.; WONG H.R.; SHANLEY T.P.; BIZZARRO M.J.; SAIMAN L.; POLIN R.A. Time for a Neonatal-Specific Consensus Definition for Sepsis. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 15, n. 6, p. 523-528, July 2014.

YADAV A.K.; WILSON C.G.; PRASAD P.L.; MENON P.K. Polymerase Chain Reaction in Rapid Diagnosis of Neonatal Sepsis. **Indian Pediatrics**, v. 42, n. 17, p. 681-685, July 2005.

ZAIDI A.K.M.; THAYER D.; ALI S.A.; KHAN T.A. Pathogens Associated With Sepsis in Newborns and Young Infants in Developing Countries. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.28, n.1, p. 510-518, Jan. 2009.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (ª) 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

## APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS

Etiqueta

### FICHA DE COLETA DE DADOS

#### IDENTIFICAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_ Hospital: \_\_\_\_\_ Registro nº: \_\_\_\_\_  
 Procedência: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_  
 Sexo: ( ) M ( ) F Cor: ( ) B ( ) P ( ) M ( ) A  
 Óbito: ( ) Sim: \_\_\_\_\_ dias ( ) Não

#### DADOS MATERNO

Idade: \_\_\_\_\_ Paridade: \_\_\_\_\_ Pré-natal: ( ) Não ( ) Sim \_\_\_\_\_ consultas  
 Patologias na Gestação: ( ) Não ( ) Sim Qual(is): \_\_\_\_\_  
 ITU 3ºtrím: ( ) Sim ( ) Não  
 Uso antibiótico anteparto: ( ) Não ( ) Sim Qual (is): \_\_\_\_\_  
 ATB profilaxia GBS: ( ) Sim ( ) Não / ATB outras indicações (<72hs parto): ( ) Sim \_\_\_\_\_ ( ) Não  
 Corioamnioite: ( ) Sim ( ) Não Febre intraparto ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ): ( ) Sim ( ) Não  
 Screening SGB: ( ) Não ( ) Sim ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Ign  
 Bolsa Rota: ( ) Ato ( ) \_\_\_\_\_hs LA: ( ) Claro ( ) Meconial ( ) Fétido  
 TPP: ( ) Sim ( ) Não Rupreme: ( ) Sim ( ) Não Taquicardia fetal ( $\geq 160\text{bpm}$ ): ( ) Sim ( ) Não  
 Gestação Gemelar: ( ) Não ( ) Sim Ordem do Gêmeo: \_\_\_\_\_  
 Corticosteroide anteparto: ( ) Não ( ) Sim N° doses: \_\_\_\_\_

#### DADOS DO PARTO

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (Hora: \_\_\_:\_\_\_) Data de Internação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Local: ( ) Hospitalar ( ) Domiciliar ( ) Outro \_\_\_\_\_  
 Tipo de Parto: ( ) Vaginal ( ) Cesárea Fórceps: ( ) Não ( ) Sim  
 Necessidade de Reanimação: ( ) Não ( ) Sim Qual: \_\_\_\_\_  
 Apgar 1º min.: \_\_\_\_\_ 5º min.: \_\_\_\_\_  
 Peso nasc: \_\_\_\_\_g  
 IG: \_\_\_\_\_sem ( ) AIG ( ) PIG ( ) GIG

#### LABORATÓRIO

HMG: \_\_\_\_\_ PCR: \_\_\_\_\_ I/T: \_\_\_\_\_  
 HMC/Anti: \_\_\_\_\_  
 LCR ( ) Não ( ) Sim: \_\_\_\_\_  
 Cultura/Anti LCR: \_\_\_\_\_

#### SINTOMAS

1. Apnéia
2. Dificuldade para respirar
3. Cianose
4. Taquicardia ou bradicardia
5. Déficit de perfusão ou choque
6. Hipo ou hiperglicemia
7. Irritabilidade
8. Letargia
9. Hipotonia
10. Convulsões
11. Intolerância à dieta (distensão abdominal, vômito ou resíduo gástrico)
12. Hepatomegalia
13. Icterícia sem causa definida
14. Temperatura instável
15. Sangramento inexplicado, petéquias ou púrpura
16. Aparência de quem "não parece bem"



Etiqueta

**PROCEDIMENTOS**

- 17. Cateterismo Artéria Umbilical
- 18. Cateterismo Veia Umbilical
- 19. Cateter Venoso Central de Inserção Periférica
- 20. Flebotomia
- 21. Sondagem vesical
- 22. Hood
- 23. CPAP Nasal
- 24. Respirador
- 25. Transfusão
- 26. NPT
- 27. Cirurgia (Qual? \_\_\_\_\_ Outro proc.: \_\_\_\_\_ )

**DROGAS**

- 28. Antibióticos:(Quais: \_\_\_\_\_)
- 29. Aminofilina/Teofilina
- 30. Cafeína
- 31. Dopamina
- 32. Dobutamina
- 33. Adrenalina
- 34. Corticóide
- 35. Surfactante ( ) Não ( ) Sim Horas de vida na 1ª dose: \_\_\_\_ ( ) Profilático N° Doses \_\_\_\_

**APÊNDICE B – QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTOFOTOMETRIA DAS  
AMOSTRAS**

<b>AMOSTRA</b>	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>260/280</b>	<b>CONCENTRAÇÃO (microg/microL)</b>
SA	1,63	0,9	2,1	0,071
EC	5,28	2,7	2,1	0,247
AG	0,252	0,184	1,7	0,005
EN	4,93	2,55	2,0	0,236
SE	5,75	3,28	1,9	0,257
KP	2,08	1,09	2,1	0,094
PA	2,49	1,38	2,0	0,110
2	3,61	3,85	0,3	0,005
3	1,26	0,53	2,1	0,069
4	0,61	0,37	1,7	0,028
5	0,44	0,275	1,9	0,018
6	0,63	0,264	2,0	0,037
7	0,73	0,48	1,8	0,028
8	0,9	0,69	1,4	0,041
9	2,18	1,1	2,8	0,113
10	0,82	0,324	2,0	0,048
11	0,125	0,082	1,3	0,009
12	NA	NA	1,4	0,005
13	0,38	0,298	1,5	0,011
14	0,033	NA	1,4	0,009
16	0,109	0,012	1,9	0,01
17	0,036	0,11	0,7	0,008
18	NA	NA	0,8	0,001
19	0,107	0,1	1,2	0,002

20	0,52	0,41	1,3	0,021
21	0,203	0,263	0,8	0,016
22	0,034	NA	1,6	0,009
23	0,084	NA	1,9	0,011
25	0,43	0,39	1,1	0,02
26	0,45	0,39	1,2	0,019
27	0,127	0,04	1,6	0,012
28	0,57	0,36	1,6	0,029
29	0,68	0,64	1,0	0,029
30	0,237	0,149	1,7	0,011
32	0,27	0,214	1,4	0,009
33	0,8	0,33	2,0	0,046
35	0,272	0,197	1,5	0,011
36	0,127	0,1	2,1	0,011
37	0,43	0,107	1,5	0,019
38	0,161	NA	1,8	0,008
39	0,045	NA	1,5	0,002
40	0,3	NA	1,8	0,015
41	0,266	NA	1,7	0,013
42	0,111	NA	2,3	0,006
43	0,296	NA	1,1	0,015
44	0,152	NA	1,4	0,008
45	0,695	NA	1,2	0,035
46	0,149	NA	1,2	0,007
47	0,294	NA	1,2	0,015
48	0,227	NA	3,2	0,011
49	1,008	NA	1,9	0,050
50	0,423	NA	1,0	0,021
51	1,207	NA	2,0	0,060
52	0,289	NA	1,0	0,014
53	0,377	NA	1,2	0,019




54	0,416	NA	1,3	0,021
55	0,163	NA	1,0	0,008
56	0,809	NA	1,4	0,040
57	0,338	NA	1,8	0,017
58	0,232	NA	1,3	0,012
59	0,886	NA	1,3	0,044
60	0,163	NA	1,1	0,008
61	0,189	NA	1,6	0,009
62	0,427	NA	1,3	0,021
63	0,353	NA	1,7	0,018
64	0,665	NA	2,0	0,033
65	0,147	NA	0,9	0,007
66	0,115	NA	1,4	0,006
67	1,44	NA	0,8	0,072
68	0,317	NA	1,1	0,016
69	0,546	NA	1,8	0,027
70	0,577	NA	1,9	0,029
71	0,152	NA	2,7	0,008
72	0,081	NA	1,3	0,004
73	0,22	NA	0,8	0,011
74	0,367	NA	1,5	0,018
75	0,645	NA	0,7	0,032
76	0,103	NA	1,8	0,005
77	0,036	NA	1,1	0,002
78	0,069	NA	1,7	0,003
79	0,402	NA	3,9	0,020
80	0,088	NA	1,8	0,004
81	1,708	NA	1,2	0,085
82	0,895	NA	0,9	0,045
85	0,617	NA	1,9	0,031
86	1,175	NA	1,1	0,059

87	1,596	NA	1,1	0,080
89	1,24	NA	1,2	0,062
91	0,878	NA	1,2	0,044
93	0,524	NA	1,3	0,026
94	0,529	NA	1,8	0,026
95	4,269	NA	1,3	0,213
96	1,148	NA	1,3	0,057
97	0,836	NA	1,4	0,042
98	0,702	NA	1,5	0,035
99	0,839	NA	1,1	0,042
100	1,095	NA	1,6	0,055
101	0,623	NA	1,3	0,031
102	0,854	NA	1,5	0,043
103	0,779	NA	1,1	0,039
105	0,815	NA	1,4	0,041
106	0,509	NA	1,6	0,025
107	0,637	NA	1,3	0,032
109	0,914	NA	1,6	0,046
110	1,73	NA	1,1	0,087
112	0,889	NA	1,0	0,044
113	1,701	NA	4,2	0,085
114	0,533	NA	1,2	0,027
115	0,431	NA	1,2	0,022
116	1,221	NA	1,5	0,061
117	1,039	NA	1,2	0,052
118	0,925	NA	1,2	0,046
120	0,975	NA	1,2	0,049
121	0,272	NA	1,7	0,014
122	1,173	NA	1,3	0,059
123	0,407	NA	1,4	0,020
124	0,846	NA	0,9	0,042

125	0,99	NA	1,1	0,050
126	0,723	NA	1,3	0,036
127	0,706	NA	1,7	0,035
128	1,45	NA	1,3	0,073
129	0,673	NA	1,4	0,034
130	0,856	NA	1,7	0,043
131	0,991	NA	1,6	0,050
132	0,442	NA	4,6	0,022
133	1,044	NA	1,9	0,052
134	1,019	NA	1,9	0,051
135	0,574	NA	1,0	0,029
136	0,852	NA	1,4	0,043
138	1,255	NA	1,3	0,063
139	0,501	NA	1,4	0,025
140	0,408	NA	1,8	0,020
141	0,31	NA	0,9	0,016
142	0,299	NA	1,8	0,015
143	0,645	NA	1,5	0,032
144	0,727	NA	1,6	0,036
145	0,543	NA	1,9	0,027
146	0,346	NA	2,1	0,017
147	0,453	NA	1,4	0,023
148	0,667	NA	1,8	0,033
149	0,538	NA	1,0	0,027
150	0,179	NA	1,1	0,009
151	0,358	NA	1,8	0,018
152	0,467	NA	1,6	0,023
153	0,089	NA	1,2	0,004
155	0,068	NA	4,3	0,003
158	0,162	NA	1,2	0,008
159	0,565	NA	1,9	0,028

160	0,715	NA	0,9	0,036
161	0,276	NA	1,6	0,014
162	0,319	NA	1,6	0,016
163	0,368	NA	2,0	0,018
164	0,247	NA	2,3	0,012
165	0,521	NA	1,8	0,026
166	0,217	NA	2,5	0,011
168	0,847	NA	1,9	0,042
170	0,246	NA	2,2	0,012
200	0,66	0,38	1,7	0,033
201	0,6	0,38	1,6	0,031
203	0,77	0,39	1,9	0,041
204	0,59	0,32	1,8	0,032
205	0,64	0,35	1,8	0,033
207	1,45	1,03	1,5	0,062
208	0,88	0,6	1,7	0,036
209	2,2	1,32	1,8	0,099
210	1,35	0,98	1,5	0,056
211	1,22	0,76	1,8	0,051

## ANEXO A – DECLARAÇÃO DE USO DE MATERIAL BIOLÓGICO E DADOS COLETADOS

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS/CEP</p>	
<p><b>DECLARAÇÃO DE USO DE MATERIAL BIOLÓGICO E DADOS COLETADOS</b></p> <p>Declaramos, para os devidos fins, que o material biológico (SANGUE TOTAL), os dados e as informações coletadas serão usados exclusivamente para os fins previstos no protocolo intitulado: "PERFIL DIAGNÓSTICO DOS PRINCIPAIS AGENTES BACTERIANOS NA INFECÇÃO NEONATAL PRECOCE ATRAVÉS DA TÉCNICA PCR MULTIPLEX". Informar a destinação final: O material biológico será submetido a uma solução de hipoclorito de sódio puro por 24 horas e depois descartado em recipientes apropriados e que atendam ao Programa Nacional de Controle de Qualidade do DICQ (Departamento de Inspeção e Credenciamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas). Todo o procedimento estará de acordo com a autorização dos Chefes das UTI Neonatais das instituições envolvidas.</p> <p style="text-align: center;">Campo Grande, 26 de Abril de 2013.</p> <p style="text-align: center;"> _____ Investigador Principal</p>		



