



TYCHA BIANCA SABAINI PAVAN

**DETECÇÃO DO GENE *16 S rRNA* E IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS
BACTERIANOS, CAUSADORES DE SEPSE NEONATAL PRECOCE, PELA
TÉCNICA DA *RFLP-PCR* (“*RESTRICTION FRAGMENT LENGTH
POLYMORFISM - POLYMERASE CHAIN REACTION*”)**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

TYCHA BIANCA SABAINI PAVAN

“DETECÇÃO DO GENE *16 S rRNA* E IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS BACTERIANOS, CAUSADORES DE SEPSE NEONATAL PRECOCE, PELA TÉCNICA DA *RFLP-PCR* (“*RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORFISM – POLYMERASE CHAIN REACTION*”)”

Orientador: Prof. Dr. Sergio Tadeu Martins Marba

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Ciências, área de concentração Saúde da Criança e Adolescente.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA TYCHA BIANCA SABAINI PAVAN
E ORIENTADA PELO PROF. DR. SERGIO TADEU MARTINS MARBA

Assinatura do orientador

Campinas

2013

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P288d Pavan, Tycha Bianca Sabaini, 1983-
Detecção do gene *16Sr-RNA* e identificação de patógenos bacterianos, causadores de sepse neonatal precoce, pela técnica da *RFLP-PCR* ("Restriction Fragment Length Polymorfism – Polymerase Chain Reaction") / Tycha Bianca Sabaini Pavan. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Sergio Tadeu Martins Marba.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Recém-nascido. 2. *16Sr-RNA*. 3. Polimorfismo de fragmento de restrição. 4. Sepse neonatal precoce. I. Marba, Sergio Tadeu Martins, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Detection of gene 16SR-RNA and identification of bacterail pathogens which cause neonatal sepsis through technique of RFLP-PCR - restriction fragmente lenght polymorfism - polymerase chain reaction

Palavras-chave em inglês:

Newborns

16Sr-RNA

Polymorphism, Restriction fragment length

Early neonatal sepsis

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Sergio Tadeu Martins Marba [Orientador]

Maria Regina Bentlin

Jamil Pedro de Siqueira Caldas

Data da defesa: 30-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

TYCHA BIANCA SABAINI PAVAN

Orientador PROF. DR. SERGIO TADEU MARTINS MARBA

MEMBROS:

1. PROF. DR. SERGIO TADEU MARTINS MARBA

S. Marba

2. PROFA. DRA. MARIA REGINA BENTLIN

M. Regina Bentlin

3. PROF. DR. JAMIL PEDRO SIQUEIRA CALDAS

Jamil P. S. Caldas

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: trinta de agosto de dois mil e treze

*Dedico este estudo a todos recém-nascidos,
que cederam suas amostras sanguíneas, sem
terem competência de saberem o motivo e
sem receberem benefício.*

Agradecimentos

Inicialmente agradeço aos meus pais, “*Tista*” *Pavan* e *Terezinha Pavan*, por me darem a oportunidade de existir – não haveria melhores pais para serem os meus – cujos me ensinaram valiosos valores morais e espirituais, além de sempre estarem ao meu lado, durante vários momentos de dificuldades e de felicidades que tive, durante essa minha caminhada.

Agradeço ao *Vicente Faggion de Alencar*, meu namorado e companheiro, por ajudar com conceitos médicos, conceitos filosóficos e espirituais e, principalmente, por entender a fase que passei para terminar esse estudo; além disso, agradeço-o por apresentar os meus adoráveis “sogrinhos” a Dra. *Maria de Cléofas Faggion de Alencar* e Dr. *Raymundo Luis de Alencar*, sempre ouvindo os relatos constantes de estudo e incentivando-me continuar na vida acadêmica.

Agradeço à Dra. *Claudia Raquel Cantarelli Costa*, que durante a graduação de Ciências Biológicas, trouxe-me à UNICAMP para ser estagiária de seu doutorado – acreditando na minha capacidade de fazer o certo, mesmo não tendo habilidade com Biologia Molecular – e apresentou um preliminar projeto, que culminaria nesse estudo. Através dessa grande amiga, conheci a doutoranda *Paula Durante Andrade*, bióloga responsável pelo laboratório, onde foi desenvolvido esse estudo, ficando ao meu lado, dando todo o suporte laboratorial. Não poderia deixar de ressaltar a ajuda imensurável da Dra. *Sandra Cecília Botelho Costa*, docente responsável do “*Laboratório de Diagnostico de Doenças Infecciosas pela Técnica de Biologia Molecular/Câmara de Pesquisa/UNICAMP*”, recebendo-me inicialmente com uma estagiária e permitir o desenvolvimento desse projeto, além de inúmeras vezes que escutou minhas reclamações de alguns problemas que decorreram durante o desenrolar desse estudo: sempre acolhendo com carinho e mostrando o melhor caminho.

Agradeço e peço desculpas, pelas farras e bravezas que aprontei com todos que frequentavam o laboratório, durante esses anos de convívio, agradeço aos amigos Dra. *Fernanda Santos Nascimento*, doutorandos *Angelica Martins Batista*, *Camila de*

Aguiar, Mariane Barroso Pereira, Renata Maria Peres Borges, Emanuel Borges Vitor Anjos e Aglécio Luiz de Souza, e as estagiárias responsáveis pela rotina *Juliana de Jesus Guimarães Ferreira, Jessica Baliero Gouveia e Joseile Cristina Franco*.

No poderia deixar citar a ajuda que ex-técnica, do “Laboratório de Patogênese Bacteriana Biologia Molecular”, *Patrícia Costa Panunto* que me ensinou como proceder e melhorar as condições das reações com enzimas de restrição. Através dela conheci a doutoranda *Jamile Couto*, uma amiga que me ajudou muito nessa fase final, além de ouvir minhas angústias e alegrias.

Para o desenvolvimento da parte laboratorial, tive a necessidade de construir os novos oligonucleotídeos e, para isso, contei com a ajuda incalculável da Dra. *Dulcinéia Martins de Albuquerque*. Através dessa “anja”, conheci a mestranda *Daniela Pinheiro Leonardo*, que me ensinou a técnica de clonagem, parte anterior da construção dos oligonucleotídeos, além de proporcionar vários momentos de alegria.

Necessitei aprender como era processada a técnica de Hemocultura, realizada no “Laboratório de Microbiologia”, do Hospital de Clínicas/UNICAMP, onde conhecida a biomédica *Marizete Salvadego*, funcionária exemplar, ensinando-me a técnica e, as outras atividades desenvolvidas no laboratório, com muito cuidado; fui tratada com uma filha.

Parte desse trabalho necessitaria coletar informações clínicas dos recém-nascidos, através das observações de prontuários e só foi possível com a ajuda dos funcionários da administração do CAISM, *Rogéria Elias Malaquias*, ao supervisor do SAME *Adilson Soares de Telo* e aos técnicos administrativos *Luzia de Freitas, Angelita de Carvalho e Armando Paião*.

Agradeço à Dra. *Roseli Calil*, que literalmente sentou várias horas seguidas comigo, escrevendo partes do projeto o qual seria enviado ao Comitê de Ética/CAISM e pelo término desse estudo. Através dela conheci a médica neonatologista, *Stefania Lucizani Pacifico*, que várias vezes, explicou-me os sintomas clínicos, que os recém-nascidos apresentariam, se a doença os acometesse. Agradeço ao Dr. *Sergio Tadeu Martins Marba*, por aceitar me orientar e esclarecer a melhor conduta a ser tomada nesse estudo.

Agradeço a toda equipe médica e de enfermagem do Centro Obstétrico/CAISM e da Unidade da Neonatologia/CAISM, os quais coletaram as amostras de sangue para realizar esse projeto.

Por fim, com todo carinho e respeito, agradeço ao incalculável desempenho que teve a técnica de enfermagem, Dona ***Édna Sueli Silva do Nascimento***, em relação ao estudo: sempre de olhos abertos, para que nenhuma amostra fosse perdida para o desenvolvimento desse projeto. E ao Dr. ***Jamil Pedro de Siqueira Caldas*** que, sempre atencioso e paciente, com uma pessoa que não é médica, ensinou-me conceitos de neonatologia, além de gastar horas ajudando com as análises de prontuários e da parte de estatística.

Deixai que venham a mim as criancinhas e não as impeçais, porquanto o reino dos céus é para os que se lhes assemelham. - Digo-vos, em verdade, que aquele que não receber o reino de Deus como uma criança, nele não entrará"
(Marcos, cap. X, vv. 13 a 16.).

"Um espírito honesto e dedicado brilha como um diamante e isso toca o coração das pessoas. Isso porque uma chama ardente brilha em seu interior. Se somos sinceros, as pessoas compreenderão nossas intenções, e nossas qualidades positivas serão irradiadas. Não há sentido algum deixar-se levar pelas aparências externas"
(Daisaku Ikeda)

"Toda teoria será provisória enquanto a Vida for Dinâmica"
(Carlos Buby)

RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS.....	35
3. SUJEITOS E MÉTODOS.....	37
3.1. Desenho do Estudo.....	38
3.2. Tamanho amostral.....	38
3.3. Casuística.....	38
3.4. Metodologia.....	28
3.5. Triagem Infecçiosa	39
3.6. Classificação quanto à evolução clínica em relação à sepse	39
3.7. Variáveis utilizadas pelo estudo	40
3.8. Métodos laboratoriais	42
3.9. Processamento dos Dados	49
3.10. Análise dos Dados	49
3.11. Aspectos Éticos	49
4. RESULTADOS	50
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8. ANEXO	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

16 S rRNA – Gene ribossomal universal bacteriano

mM – Mili-molar

μM – micro-molar

AluI – Enzima de restrição

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância e Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

CAISM/UNICAMP – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas.

CIVD – Coagulação intravascular disseminado.

CDC – Centre of Disease Control

CO₂ – Dióxido de carbono

dATP – Deoxyadenosine triphosphate

dCTP – Desoxicitidina Trifosfatada

dGTP – Deoxyguanosine triphosphate

dTTP – Deoxythymidine triphosphate

DdeI – Enzima de restrição

DNA – Deoxyribonucleic acid

DNTP – Desoxirribonucleotídeo

E – Especificidade

EDTA – Ácido etilino-diaminotetracético

HaeIII – Enzima de restrição

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MnII – Enzima de restrição

NCBI – National Center of Biotechnology Information

RFLP-PCR – Restriction Fragment Length Polymorfism – Polymerase Chain Reaction

RPM – Ruptura prematura de membrana

RN – Recém-nascido

PCR – Polymerase Chain Reaction

RNA – Ribonucleic acid

S – Sensibilidade

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sepse neonatal precoce

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

Taq – Enzima TaqPolimerase

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLRs – Toll-like receptors

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VPN – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

LISTA DE TABELAS e FIGURAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos para detecção do DNA da Beta-actina humana	44
Tabela 2	Oligonucleotídeos para detecção do gene universal bacteriano <i>16 S r RNA</i>	45
Tabela 3	Padrões de bandas obtidas através da reação de sequenciamento	48
Tabela 4	Evolução clínica dos sintomas maternos em relação à classificação dos RN quanto à presença ou ausência de sintomas ao nascer	51
Tabela 5	Distribuição das variáveis neonatais segundo os grupos	52
Tabela 6	Sinais e sintomas clínicos à admissão como suspeita de SNP	53
Tabela 7	Positividade da “ <i>RFLP-PCR</i> ” segundo os grupos de RN	53
Tabela 8	Bactérias identificadas em relação à classificação dos RN	54
Tabela 9	Positividade de “ <i>RFLP-PCR</i> ” segundo a ocorrência de sepse	55
Figura 1	Gráfico da quantificação de amostra de DNA através do aparelho NanoDrop®.	45
Figura 2	Gel de agarose 2%. Amplificação do gene da beta-actina, no gel: 1) Marcador 100pb; 2) Controle positivo, 3 a 16) Amostras positivas; 17 a 19) Amostras negativas; 20) Controle negativo da reação.	44
Figura 3	Gel de agarose 2%. Amplificação do gene bacteriano universal <i>16 S rRNA</i> , no gel: 1) Marcador 50 pb; 2) Controle positivo, <i>Escherichia coli</i> ; 3) Controle positivo, <i>Listeria monocytogenes</i> ; 4) Controle positivo, <i>Streptococcus agalactiae</i> ; 5,8 a 19) Amostras positivas; 6 e 7) Amostras negativas; 20) Controle negativo da reação.	47

Figura 4 Esquema da PCR e RFLP para detecção e identificação de bactérias em fluidos corporais

47

RESUMO

O objetivo do trabalho foi descrever e avaliar a capacidade da “*RFLP-PCR*” para detectar patógenos bacterianos em recém-nascidos (RN) e determinar seu uso diagnóstico na sepse neonatal precoce (SNP). Foram avaliados RNs assintomáticos, filhos de gestantes com fatores de risco para infecção ovular e RNs com apresentação de sintomas clínicos sugestivos para SNP, nas primeiras 48 horas de vida, atendidos na unidade neonatal do CAISM/UNICAMP/SP. Realizou-se extração genética das amostras de 200µL de sangue total através do kit QIAamp DNA Mini kit column (Qiagen), seguida da detecção do gene universal bacteriano *16 S rRNA* e identificação microbiana pelas sucessivas digestões com enzimas de restrições – *HaeIII*, *AluI*, *DdeI*, *MnII*. Foram avaliados 65 RN assintomáticos e 178 RN com apresentação de sinais clínicos sugestivo de SNP. Os patógenos detectados foram *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E.coli*, *S.pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. epidermidis* e *S. aureus*. Resultados duvidosos ou bactérias não identificadas ocorreram em 56 amostras. A positividade da “*RFLP-PCR*” foi de 55,3% no grupo assintomático e 51,6% no grupo sintomático, sem diferença estatística ($p=0,583$). Houve comprovação de sete RN com sepse por cultura e 24 com sepse clínica e foram encontrados valores de sensibilidade de 87,8%, especificidade de 46,6%, valores preditivo positivo de 23,3% e preditivo negativo de 95,4%. Em conclusão, o uso da técnica mostrou uma taxa de acurácia baixa para o diagnóstico para a SNP satisfatória.

ABSTRACT

Study objective was to describe and evaluate the ability of *RFLP-PCR* for detection of bacterial pathogens in newborn and to determine its diagnostic utility in early neonatal sepsis. There were evaluated asymptomatic newborns, children of mothers with risk factors for infection ovulate and newborns with presentation of clinical symptoms suggestive of early neonatal sepsis, occurring before 48 hours of life, evaluated at neonatal unit at CAISM-UNICAMP. Whole blood samples were taken from newborns – 200 µL each. A genetic extraction were performed using QIAamp DNA Mini kit column (Qiagen) and also the detection of bacterial universal *16 S rRNA* gene, subsequent microbial identification using restriction digestion enzymes - *HaeIII*, *AluI*, *DdeI*, *MnII*. There were 65 asymptomatic infants and 178 symptomatic newborns. The identified bacteria were *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E.coli*, *S.pyognes*, *S. agalactiae*, *S. epidermidis* and *S. aureus*. Uncertain or unidentified pathogens occurred in 56 samples. *RFLP-PCR* positivity was 55,3% in the asymptomatic group and 51,6% in the symptomatic group, with no statistical difference ($p=0,583$). There were culture comproved sepsis in 7 infants and in 24 newborns were made a diagnostic of clinical sepsis. Diagnostic indexes were: sensibility 87.8%, specificity 46.6%, positive predictive value 23.3% e negative predictive value 95.4%. In conclusion, *RFLP-PCR* had an unsatisfactory accuracy index early neonatal sepsis.

1. INTRODUÇÃO

Sepse é uma condição clínica definida como uma reação sistêmica à infecção, independentemente do agente infeccioso, seja ele bacteriano, viral, fúngico ou parasitário. Na sepsé bacteriana ocorre resposta secundária à liberação dos produtos bacterianos que interagem com receptores *toll-like* (TLRs), referidos como padrões moleculares associados a patógenos, desencadeando respostas inflamatórias sistêmicas. No entanto, a sepsé em humanos está associada à demonstração de um agente infeccioso em apenas 50% dos casos. Esta taxa é baixa, provavelmente porque, no momento da admissão na unidade de terapia intensiva (UTI), os pacientes, muitas vezes, já receberam antibióticos de largo espectro, o que dificulta a capacidade de identificar um organismo causador¹.

De acordo com características epidemiológicas e imunológicas do paciente, a sepsé pode ter evolução muito rápida, com sintomatologia pouco específica, resultando em alta morbidade e mortalidade, especialmente no período neonatal².

A sepsé acometida no período neonatal, do ponto de vista epidemiológico é classificada: origem transplacentária, infecção precoce de provável origem materna e infecção tardia, relacionada a assistência neonatal. A sepsé neonatal precoce (SNP) é aquela que acomete o recém-nascido (RN) nos primeiros dois dias de vida, estando relacionada à microbiota genital materna. Os RN infectados nascem com algumas características que podem chamar atenção para o quadro, mas estas, em geral, são inespecíficas, como a prematuridade, baixo peso, asfixia perinatal, desconforto respiratório, apnéia, distermia, resíduo gástrico, sinais de choque séptico³.

A incidência da SNP varia de 1 a 8 casos por 1000 nascidos vivos. Apesar dos avanços na terapia antimicrobiana, das medidas de suporte das UTI neonatal e dos meios para o diagnóstico mais precoces, os quais são baseados em fatores de risco perinatal, a taxa de mortalidade é alta, em média 25%, pois a SNP pode apresentar com comprometimento multissistêmico e curso clínico, na maioria das vezes, pode ser fulminante. Os agentes responsáveis pela SNP estão associados ao trato urogenital materno, sendo os mais comuns *Streptococcus agalactiae*, *Escherinchia coli* e *Listeria monocytogenes*^{4,5}.

Sintomas clínicos inespecíficos podem ser o primeiro sinal da doença ⁶. Em vista disso, comumente se leva em consideração a análise dos fatores de riscos maternos e neonatais para se suspeitar de sepse e iniciar a investigação laboratorial do RN ⁷. O curso clínico da sepse pode variar de sintomas sutis, porém, podem progredir gradualmente para uma rápida deterioração e colapso cardiocirculatório ⁸.

Uma das explicações para as taxas elevadas de infecção nos RN, além da exposição a fatores de risco, é que o RN é considerado como imunodeficiente relativo. Os processos de desenvolvimento do sistema imune estão em desenvolvimento (imaturidade funcional) e são descritos níveis baixos de componentes do sistema complemento e de imunoglobulinas, além de alterações na função leucocitária. A produção de leucócitos inicia-se por volta de 14 -16 semanas gestacional, e no segundo trimestre, o tamanho da reserva de neutrófilos é extremamente pequena, aumentando gradativamente. No entanto, quando a reserva leucocitária é requerida por estímulo infeccioso, esta se esgota rapidamente, havendo uma deficiência de produção de fator estimulante de formação de colônia granulocítica. Defeitos funcionais nos leucócitos polimorfonucleares como alterações na aderência, agregação, fagocitose e mecanismo de morte intracelular são relatados em prematuros e em crianças a termo ^{9,10}.

RN ao nascerem, apresentam sistema imunológico imaturo, tornando difícil o combate à infecção, mesmo havendo transferência de fatores humorais produzidos pelo sistema imunológico materno. Isso é especialmente verdadeiro nos RN prematuros, já que a maior parte dessa transferência de fatores humorais ocorre nos últimos meses da gestação ¹¹.

O diagnóstico clínico de infecção bacteriana pode ser difícil em neonatos.. Com a finalidade de auxiliar no diagnóstico dessa condição, vários exames laboratoriais são solicitados. Preconiza-se que algumas características sejam levadas em conta para que um exame laboratorial seja considerado como um marcador de infecção ideal ¹²⁻¹⁸. Entre elas estão: 1. O teste seja capaz de diferenciar patógenos virais dos bacterianos; 2. Apresente altos índices de sensibilidade e de valor preditivo negativo 3. O teste necessita apresentar taxas de especificidade e valor preditivo negativo, maiores que 85%; 4. Utiliza o mínimo de volume a ser coletado de amostra biológica,

especificamente, quando for sanguínea. É imprescindível que estes itens de parâmetros biológicos apareçam rapidamente no curso da doença, e assim, permitam um diagnóstico mais precoce da infecção.

Deste modo, alguns exames como alfa1-antitripsina, fibronectina, haptoglobina, lactoferrina, neopterin, velocidade de hemossedimentação e orosomucóide, foram substituídos por outros exames melhores e mais sofisticados ou abandonados por apresentarem uma série de inconvenientes, tais como acurácia diagnóstica limitada, exigirem manuseio especial e não poderem ser encontrados nos laboratórios clínicos rotineiros ¹⁷⁻¹⁹.

Como a sepse induz potente reação inflamatória, alguns dos mediadores presentes, no fenômeno, sejam humorais ou celulares, são utilizados como marcadores diagnósticos. Podem ser citados, entre outros, o leucograma, a Proteína C Reativa quantitativa seriada, a interleucina-8, a interleucina-1 β , a interleucina-6, o fator de necrose tumoral- α e a procalcitonina.

O leucograma foi o primeiro exame e ainda é o mais largamente utilizado para o diagnóstico de SNP. Nos Estados Unidos, cerca de 400000 a 600000 RN são avaliados anualmente devido à suspeita de infecção, através de coleta de hemograma e hemocultura ^{18, 20}. No entanto, sua avaliação correta detém em dois pontos principais: a definição dos valores de normalidade e problemas em relação à leitura das lâminas.

A definição dos valores de normalidade do leucograma para o período neonatal ainda não é perfeitamente definida. Os valores estabelecidos por Manroe et al, (1979) ²¹ são os mais utilizados mundialmente, embora críticas possam ser feitas, pois a população hoje atendida nas UTI é bastante diversa à daquela época. Estudos como Lloyd e Oto (1982) e Mouzinho et al. (1994), estabeleceram padrões diferentes de contagem neutrofílica, notando-se uma tendência normal dos RN de muito baixo peso ao nascerem, “normais” e “saudáveis” sob outros aspectos, a se mostrarem “neutropênicos”, isto é, com valores de neutrófilos totais menores que os apresentados pelo trabalho citado acima ^{22, 23}.

Uma população “saudável” e “normal” de RN, especialmente entre os prematuros, já é, do ponto de vista clínico, uma situação difícil, uma vez que a própria

prematuridade já traz em si alguma complicação que levou à interrupção da gestação. Deste modo, inúmeros distúrbios da gravidez, do trabalho de parto e complicações neonatais alteram a dinâmica leucocitária em maior ou menor extensão, especialmente nos primeiros dias de vida. São citados como modificadores da dinâmica e contagem leucocitária: hipertensão materna, trabalho de parto prolongado, ruptura prolongada de membranas, febre materna, asfixia perinatal, pneumotórax, crises de apnéia, hemorragia intracraniana e estado pós-operatório ^{18, 21-25}.

O índice de acurácia do teste hematológico varia amplamente na literatura, uma vez que a cinética leucocitária no período neonatal ainda não está perfeitamente esclarecida e variações normais dos índices leucocitários ocorrem amplamente, de acordo com a idade do RN, com o local de coleta da amostra biológica e da inclusão de sepse provável (não confirmada por cultura), entre outros fatores indistinguíveis ¹⁸.

A Proteína C Reativa é uma proteína da fase aguda produzida no fígado e cuja síntese é estimulada por vários fatores, principalmente a interleucina-1, a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa. Ela tem função importante na defesa contra patógenos bacterianos e fúngicos e na remoção de células necróticas e apoptóticas ^{26, 27}. Sua meia-vida em RN é de 21 horas, à qual é muito próxima ao valor encontrado em adultos – no entanto sua meia-vida é de 19 horas (EHL et., 1999). Como não ocorre passagem transplacentária da proteína, a elevação dos níveis séricos no RN representa síntese endógena ²⁸⁻³⁰.

Os valores séricos iniciais da proteína são normalmente baixos na suspeita do quadro séptico, o que faz com que essa proteína não seja considerada um marcador precoce. No entanto, no transcorrer da evolução clínica da sepse, entre 12 - 24 horas os níveis da proteína C reativa aumentam (acima de 1,0 mg/dL), mas decaem com a melhora do quadro clínico do RN, através da administração de antibiótico, e normalização dos valores ocorrem geralmente a partir do terceiro, quando a evolução da clínica é satisfatória. A manutenção de níveis séricos elevados seria indicativa de complicação ou falha terapêutica, no caso desse estudo, aos RN. Assim, a coleta seriada é utilizada tanto para firmar o diagnóstico da SNP, como para monitorar o

tratamento e indicar a suspensão de antimicrobianos quando a avaliação seriada mostra-se seguidamente normal ^{18, 29, 31-40}.

Os níveis séricos são alterados durante as reações inflamatórias e da evolução da sepse e, em relação ao resultado do leucograma, os resultados apresentados pela proteína C reativa mostrou-se como um exame mais útil, principalmente depois do desenvolvimento de técnicas quantitativas precisas para sua mensuração. Porém, também sofre influências importantes de condições próprias da idade do gestacional do RN, como parto normal complicado, ruptura prolongada de membranas, asfixia perinatal grave, sofrimento fetal agudo, pneumonite por aspiração meconial, hemorragia peri e intraventricular.

Em vista disso, há dificuldade em se determinar um valor de normalidade mais preciso para o exame, especialmente nos três primeiros dias de vida ^{25, 29, 30}. Os níveis séricos ascendem logo após o nascimento, atingem um pico máximo entre 24-36 horas de vida e normalizam em 48 horas. Isso, presumivelmente, exprime algum mecanismo fisiológico de adaptação, uma vez que as alterações são mais pronunciadas no parto normal do que nos cesarianos eletivos ^{28, 30, 33, 34, 41 - 43}.

Na literatura, os valores dos índices diagnósticos variam amplamente, oscilando a sensibilidade entre 39 e 97,5%, a especificidade entre 47 e 100%, o valor preditivo positivo entre 6,7 e 100% e o valor preditivo negativo entre 80 e 99%.

A interleucina-6 tem sido referida como um marcador precoce de SNP, uma vez que, os níveis séricos da citocina encontram-se mais alterados no início dos sintomas de infecção ou sepse propriamente, tendo grande vantagem como marcador de diagnóstico. Porém, ao contrário do comportamento da proteína C reativa, os níveis plasmáticos caem rapidamente para a normalidade em 24 - 48 horas devido à sua curta meia-vida e podendo não ser mais detectáveis, gerando resultados falso-negativos ^{44,45}. Em vista disso, a acurácia da citocina é considerada alta no momento da suspeita clínica para a SNP e mais elevada que a apresentada pelo leucograma. Ng et al. ³⁶, apontam uma sensibilidade de 89% e especificidade de 96% e Grasa Ulrich et al. ⁴⁶ demonstraram valores de 91,6% e 77,2%, respectivamente. Porém, o alto custo na dosagem de interleucina-6, que poderia servir como mais um marcador de diagnóstico

na SNP, impossibilita a sua determinação, pois não estão disponíveis em laboratórios clínicos de rotina nas unidades neonatais, assim, impedindo seu uso na confirmação de SNP.

A hemocultura é o padrão-ouro para o diagnóstico tradicional de sepse bacteriana. No entanto, resultados falso-negativos são comuns. A bacteremia, muitas vezes, é de baixa densidade e de caráter intermitente, e o volume obtido para as amostras não é o recomendado para a análise do procedimento, ou seja, menores que 1 ml, volume este considerado ideal. Além disso, as gestantes no momento do parto ou as crianças após nascerem, podem ter recebido antibiótico antes da coleta para o exame de hemocultura, reduzindo, ainda mais o rendimento do teste diagnóstico⁴⁷. Por outro lado, resultados falso-positivos podem ocorrer por contaminação do local de punção, o que pode ser evitado por uma técnica adequada de coleta, de modo asséptico, seguindo as recomendações que a ANVISA recomenda como uso de luvas estéreis, máscara, clorexidina alcoólica de 0,5%. Pode-se distinguir um resultado verdadeiramente positivo, daquele obtido por contaminação, obtendo-se amostras de dois locais diferentes em intervalo curto de coleta, pois obter amostras em intervalos mais prolongados, por volta de 12 - 24 horas, não são adequados ao diagnóstico da sepse, pois pode representar atraso diagnóstico e falha terapêutica⁴⁸.

A coleta de grande volume de sangue para a cultura de RN não só é tecnicamente difícil, mas também, pode levar à necessidade de transfusão de sangue, que apresenta riscos inerentes. Duas variáveis devem ser conhecidas para determinar o volume de sangue necessário para a hemocultura, quando o RN é pequeno: a sensibilidade do sistema de detecção se é automatizado ou não, e a baixa probabilidade de detecção, em um mesmo frasco de cultura, quando pode haver mais de um patógeno circulante na corrente sanguínea⁴⁹.

Apesar de ser considerado o padrão-ouro no diagnóstico, a hemocultura tem algumas desvantagens no que se refere à rapidez e sensibilidade desejada. A identificação completa do patógeno bacteriano ou fúngico demora entre 48 a 72 horas e, a sensibilidade antimicrobiana, muitas vezes é abaixo do ideal para servir como padrão-ouro de diagnóstico. Além disso, a cultura pode induzir aos resultados falso-

negativos, quando bactérias cujo crescimento é lento ou que necessita de métodos especiais de seus cultivos. A associação entre diagnóstico laboratorial, tratamento e evolução rápida das infecções bacterianas tem grande impacto sobre a clínica de pacientes neonatais, mas na ausência da terapia antimicrobiana adequada, a infecção sistêmica pode comprometer ainda mais o quadro clínico⁵⁰.

Devido à baixa sensibilidade da hemocultura na definição da SNP, o diagnóstico, na maioria, é de presunção. A sepse clínica é definida quando os resultados de hemocultura são negativos em RN o qual apresenta evolução clínica desfavorável, através de observações dos sinais clínicos evidentes de sepse. Para esse caso, são considerados os valores apresentados pelos exames laboratoriais inespecíficos citados anteriormente, tais como hemograma para contagem de neutrófilos, proteína C reativa, dosagem de interleucinas e procalcitonina⁵¹.

Recentemente, a identificação de patógenos baseada em técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem sido vista como promissora em fornecer um diagnóstico precoce e preciso de doenças causadas por agentes patogênicos bacterianos, com melhora na taxa de detecção de agentes na sepse e meningite bacteriana, inclusive para aqueles agentes que tem dificuldade para crescer em culturas^{52, 53}.

A amplificação genômica é o nome dado às técnicas de biologia molecular que envolve múltiplos alvos de amplificação de ácido nucléico, definida por ligação a um oligonucleotídeo ou iniciador específico, permitindo assim, a detecção e a identificação do material genético do patógeno presente na amostra biológica, em aproximadamente, 8 horas⁵⁴. Esse método laboratorial alternativo pode ter o potencial no diagnóstico da sepse quando combina a alta sensibilidade e especificidade, com o tempo de resultado na detecção e identificação, dos agentes etiológicos, em poucas horas de procedimento técnico.

Os métodos moleculares podem ter impacto significativo na identificação e gerenciamento na sepse neonatal, pois utiliza sequencias específicas para identificação genética de cada patógeno, a ser investigado. Avanços na microbiologia molecular poderão levar ao desenvolvimento mais confiável da técnica, com melhora na sua

acurácia diagnóstica, economizando assim, gastos aos sistemas de saúde, com a solicitação de exames inespecíficos para o diagnóstico da sepse precoce ⁵⁵. A PCR melhorou significativamente a identificação de casos de meningites bacterianas, mesmo com caso clínico diverso ao resultado negativo apresentado pela hemocultura e, auxiliando na continuação ou interrupção de medicamentos aos pacientes, pois através dela podem-se confirmar os casos de suspeita de sepse em algumas horas, auxiliando desta forma para a redução de exposição desnecessária do RN a antibioticoterapia ⁵⁶.

A sensibilidade de qualquer ensaio molecular é dependente da produção de DNA bacteriano, a partir do processo de extração e da presença de inibidores. A qualidade do ensaio é também afetada pela contaminação, durante a coleta das amostras biológicas (por exemplos – contaminação bacteriana, fúngica ou de DNA humano) e também durante o processo laboratorial, através de contaminação cruzada ou, ainda, pela quantidade baixa do agente patogênico em caso de bacteremia de baixa intensidade ⁵⁷.

A diversidade de organismos causadores da sepse neonatal é grande, com ocorrência de patógenos de diferentes classes (como por exemplo, fungos, bactérias e vírus), limitando a utilidade dos ensaios de PCR, pois não há um oligonucleotídeo que seja específico para os três grupos de patógenos citados ao mesmo tempo da realização da PCR. O que normalmente é utilizado são oligonucleotídeos específicos desenhados a cada grupo de patógeno, quando há suspeita de infecções por organismos raros (por exemplo, Rickettsioses, brucelose e *Coxiella burnetti*). Os testes moleculares com oligonucleotídeos específicos podem ser úteis em ambientes onde há suspeitas de infecções perinatais por patógenos bacterianos específicos, por exemplo, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, porém os testes de diagnóstico de rotina, não estão disponíveis as unidades de atendimento neonatal ⁵⁷. A utilização da PCR com os oligonucleotídeos específicos, para a detecção do gene universal bacteriano *16 S rRNA*, que codifica a sequência do RNA, presente em todas as bactérias, possui uma região altamente conservada e também regiões variáveis que diferem entre as espécies bacterianas devido a mutações pontuais no longo processo evolutivo. Portanto,

bactérias diferentes podem ser distinguidas pela análise do gene *16 S rRNA* usando oligonucleotídeos específicos ⁵⁸.

Uma vez que a taxa de positividade da hemocultura é baixa, e o diagnóstico de SNP é baseado em critérios clínicos e exames laboratoriais inespecíficos, no sentido de identificar agentes etiológicos causadores de sepse, o presente estudo avaliou a utilização do teste molecular da PCR na SNP.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Descrever e avaliar a capacidade da técnica molecular de “*RFLP-PCR*” para detectar patógenos bacterianos em RN (filhos de gestantes com fatores de risco para infecção ovular) e em RN com apresentação de sinais clínicos, sugestivos para a SNP.

Objetivos específicos

1. Descrever e avaliar a capacidade da técnica molecular de “*RFLP-PCR*” para detectar patógenos bacterianos em RN;
2. Determinar os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e preditivo negativo na detecção de patógenos bacterianos pela técnica molecular de “*RFLP-PCR*” na SNP.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

3.1. Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo descritivo prospectivo e de validação de diagnóstico.

3.2. Tamanho amostral

O tamanho da amostra foi baseado na taxa de positividade da hemocultura em RN com apresentação de sinais clínicos sugestivos para SNP. Dados levantados de anos anteriores, através de relatórios fornecidos pela CCIH – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM/UNICAMP/SP, relatou uma taxa de 20 a 30% de positividade da hemocultura, em relação a todos os pedidos solicitados pela Unidade Neonatal (CCIH – 1997 a 2000).

Assim, para a taxa de sensibilidade e especificidade de 95%, com intervalo de confiança de 95% (+/- 5%) e com hemocultura positiva de 30%, o tamanho amostral total necessário para o desenvolvimento deste estudo foi de 367 RN a serem coletados – 84 RN sintomáticos e 283 RN assintomáticos.

3.3. Casuística

Os sujeitos deste estudo foram RN com suspeita clínica e/ou de risco para SNP, internados no Setor de Neonatologia do CAISM/UNICAMP/SP, no período de fevereiro de 2011 a outubro de 2012.

3.4. Metodologia

3.4.1. Seleção dos sujeitos

3.4.1.1. RN sintomáticos / com apresentação de sinais clínicos sugestivos à SNP:

Foram colhidas amostras de sangue total para realização da “*RFLP-PCR*”, no momento da triagem infecciosa dos RN com sintomatologia sugestiva de SNP, de qualquer peso e idade gestacional, admitidos na unidade de internação neonatal do CAISM/UNICAMP/SP, até 48 horas de vida.

3.4.1.2. RN assintomáticos, filhos de gestantes com risco de infecção ovular:

Foram colhidas amostras de sangue de RN assintomáticos, de qualquer peso ou idade gestacional, filhos de gestantes cujas apresentavam risco de infecção ovular, no momento do trabalho de parto, admitidos na unidade neonatal, mas especificamente, na sala de parto do Centro de Obstetrícia do CAISM/UNICAMP/SP. A amostra de sangue total para diagnóstico da “*RFLP-PCR*” foi colhida no momento da triagem infecciosa, até 48 horas de vida.

3.4.1.3. Exclusão dos sujeitos:

Foram excluídos do estudo os RN cujos responsáveis não autorizaram a coleta de amostras. Excluíram-se, também, os RN que apresentavam infecção congênita e com malformação. Outro dado a ser excluído foi em relação à análise molecular da PCR para a detecção do gene Beta-actina, ou seja, se apresentasse resultado negativo, o material não serviria para a detecção do gene *16 S rRNA* e para a identificação dos agentes bacterianos causadores de SNP, através das sucessivas digestões com as enzimas de restrição propostas.

3.5. Triagem infecciosa:

A triagem infecciosa consiste na coleta de material biológico para cultura, de sangue total e líquido cefalorraquidiano. Para os RN com apresentação de sinais clínicos sepse neonatal, submetidos à ventilação mecânica, ainda será coletado aspirado traqueal, para realização de cultura.

3.6. Classificação quanto à evolução clínica em relação à sepse:

Após revisão dos prontuários médico das gestantes, com risco de infecção ovular e dos RN foram possível classificar os sujeitos em três grupos, de acordo com a evolução que tiveram:

- 1. Sepse comprovada por cultura:** quadro séptico com comprovação microbiológica em líquido cefalorraquidiano (normalmente estéril) e pelo material sanguíneo.
- 2. Sepse clínica:** quadro clínico compatível com sepse, com resultados de hemograma e proteína C-reativa alterados, mas cujas culturas foram negativas.
- 3. Sepse ausente:** RN com clínica desfavorável à evolução de infecção ou SNP, com a associação dos exames laboratoriais negativos, permitindo o afastamento do quadro clínico infeccioso e a suspensão da antibioticoterapia, em até 72 horas de observação.

3.7. Variáveis utilizadas pelo estudo:

3.7.1. Características demográficas dos RN:

- 1. Peso ao nascer:** É o primeiro peso de um nascido vivo ou feto nascido morto obtido dentro de 24 horas do nascimento.
- 2. Idade gestacional:** medida em semanas inteiras, e obtida a partir da data da última menstruação materna, ecografia e métodos estimativos de Capurro⁵⁹ e New Ballard⁶⁰.
- 3. Sexo:** corresponde ao sexo do RN, determinado por ocasião do nascimento, masculino ou feminino.
- 4. Apgar de primeiro minuto:** corresponde ao valor do boletim de Apgar, dado com um minuto de vida⁶¹.
- 5. Apgar de quinto minuto:** corresponde ao valor do boletim de Apgar, dado com cinco minutos de vida⁶¹.

3.7.2. Variáveis relacionadas à apresentação de sinais clínicos e sintomas sugestivos para SNP nos RN:

- 1. Desconforto respiratório:** caracterizado por gemência, taquipnéia (aumento da frequência respiratória), retração do esterno e/ou subcostal e cianose.
- 2. Cianose:** caracterizada pela coloração arroxeada da pele.

3. Apnéia interrupção dos movimentos respiratórios por pelo menos vinte segundos, ou duração menor associada à queda de saturação de oxigênio, bradicardia e/ou à cianose.

4. Hipotermia: temperatura axilar menor que 36° C

5. Hipertermia: temperatura axilar maior que 37,8° C

6. Letargia: caracterizada pela diminuição da atividade espontânea ou sob estímulo, do RN.

7. Bradicardia: frequência cardíaca menos ou igual a 60 batimentos por minutos.

8. Taquicardia frequência cardíaca maior ou igual a 180 batimentos por minutos.

9. Choque: Definido como a ocorrência de sepse com disfunção cardiovascular – hipotensão de acordo com a idade; necessidade de expansão volumétrica e droga vasoativa para manter pressão arterial normal, oligonúria, acidose metabólica, enchimento capilar prolongado.

3.7.3. Variáveis relacionadas aos fatores de risco de infecção ovular maternos:

1. Infecção do trato Urinário: infecção confirmada por urocultura sem tratamento ou tratamento inferior a 48 horas do parto.

2. Colonização pelo *Streptococcus agalactiae*: caracterizado pela positividade da cultura por swab ano retal e vaginal, ou bacteremia identificada pela cultura de urina.

3. Hipertermia materna: temperatura axilar aferida próximo ao parto maior que 38° C

4. Rotura prematura prolongada de membrana amniótica: caracterizado por rotura de membrana ovulares por tempo maior ou igual a 18 horas.

5. Trabalho de parto prematuro: trabalho de parto que ocorreu antes das 37 semanas de idade gestacional.

6. Fisometria: presença de líquido amniótico purulento com odor fétido.

7. Corioamnionite: Infecção das membranas e do fluido amniótico é causada por uma variedade de microrganismos, levando à ruptura destas membranas, trabalho de parto prematuro, ou ambos (Cox e colaboradores, 1996; Watts e colaboradores, 1992).

3.8. Métodos laboratoriais:

3.8.1. Hemocultura:

A hemocultura foi obtida por meio da coleta asséptica de duas amostras de sangue periférico (1ml em cada amostra). O sangue foi inoculado em frasco específico, cujo sistema de leitura é automatizado (BacT/ALERT®PF - BioMérieux, Inc, Durham, NC, USA). O Bact/Alert® é um sistema totalmente automatizado, não invasivo para teste de hemocultura. Ele utiliza um avançado sistema de detecção colorimétrico para a detecção da produção do dióxido de carbono bacteriano. As amostras dos pacientes foram inoculadas nos frascos de cultura BacT/Alert®, sendo continuamente agitados numa temperatura de 35 - 37° C e cada frasco é monitorado 144 vezes ao dia, em intervalos de 10 minutos, para a detecção de microrganismos. Até o momento que o equipamento emite alertas visuais e sonoros avisando sobre a possibilidade de crescimento bacteriano, nenhum manuseio dos frascos é necessário.

3.8.2. Técnica molecular:

3.8.2.1. Extração do material genético:

Foram coletados de cada RN 200 µL de sangue total obtidos por veia periférica e acondicionado em tubo com EDTA (ácido etileno-diaminotetracético). Este material foi armazenado em geladeira da Unidade de Neonatologia com temperatura de aproximadamente 10°C até serem transportados em caixa de isopor para análise molecular, no Laboratório de Diagnóstico de Doenças pela Técnica de Biologia Molecular, pertencente à Câmara de Pesquisa/UNICAMP/SP.

A extração de material genético (DNA), foi realizada através kit QIAamp DNA Mini kit column (Quiagen - Duesseldorf, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, com uma modificação no acréscimo de 20 minutos no momento de lise das hemácias. O DNA obtido das amostras foi identificado e armazenado em tubos de microcentrifuga a -20°C até a realização da PCR. Para mensurar os parâmetros de pureza e quantidade da concentração dos DNAs extraídos, estes foram submetidos no

aparelho espectrofotômetro, NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (ND-1000, Technologies, EUA). (Figura 1).

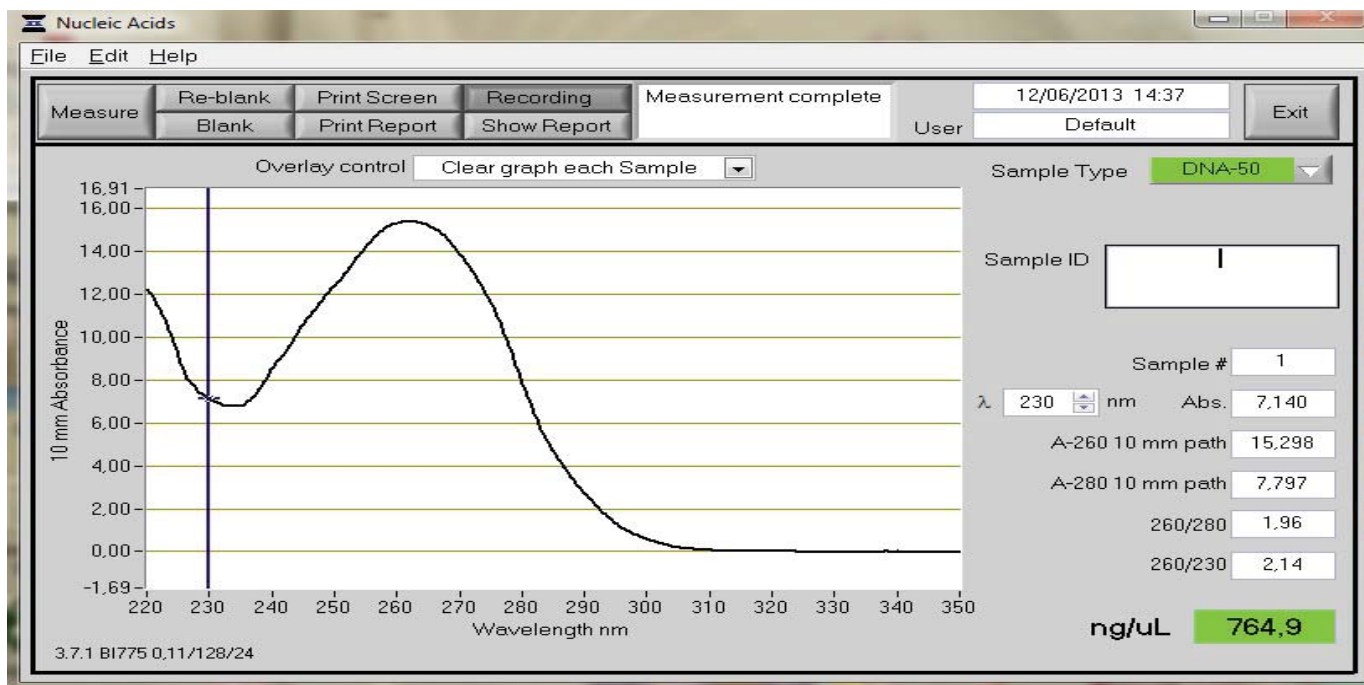


Figura 1 - Gráfico da quantificação de amostra de DNA através do aparelho NanoDrop®.

3.8.3. Amplificação gênica através da PCR, para detecção do gene da beta-actina humana:

Para análise da integridade do material genético e avaliação da presença de inibidores nas amostras extraídas, foi realizada a PCR para a detecção do gene humano da beta-actina, (caso o resultado fosse negativo, a amostra seria descartada para a análise molecular, e se positivasse, seguiríamos para a realização da PCR para a detecção do gene universal bacteriano *16 S rRNA* e as sucessivas digestões enzimáticas através das enzimas de restrições).

As reações foram realizadas nas seguintes condições: 5,0µl de tampão 10X, 1,5µl de MgCl₂ [50mM], 1,0µl de DNTP [10mM] (desoxirribonucleotídeo - dATP, dTTP,

dCTP e dGTP), 0,4µl de cada oligonucleotídeo [10µM] (β actina1 e β actina2) (Tabela 1), e 0,3µl da enzima *Taq Polymerase*, 1,5µl de material genético e água para um volume final de 50µl. A realização da PCR foi realizada no termociclador MJ Reserch, Inc, cujos 40 ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial da 96°C durante 2 minutos, 94°C de 45 segundos, 60°C de 45 segundos, 72°C por 2 minutos, e no final, 5 minutos a 72°C para a extensão final.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos para detecção do DNA da Beta-actina humana

Nome	Sequência	Sentido
β actina 1	5'AAGAGATGGCCCGGCTGCT3'	“sense”
β actina 2	5'TCGCTCCAACCGACTGCTGT3'	“antisense”

Os produtos foram aplicados em de géis de agarose 2%, contendo brometo de etídio e, foto-documentados no aparelho Kodak® sob exposição de luz ultravioleta, para confirmação da reação de amplificação (Figura 2).

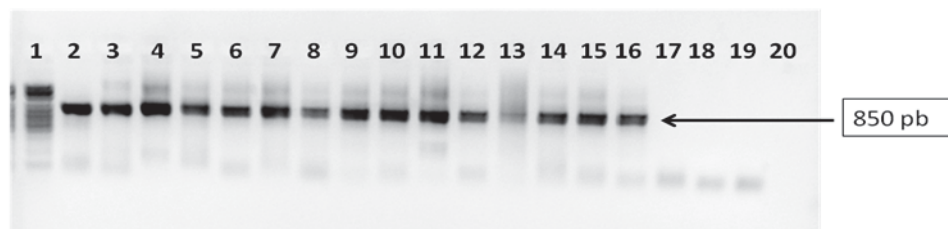


Figura 2 – Gel de agarose 2%. Amplificação do gene da beta-actina, no gel: 1) Marcador 100pb; 2) Controle positivo, 3 a 16) Amostras positivas; 17 a 19) Amostras negativas; 20) Controle negativo da reação.

3.8.4. Obtenção dos oligonucleotídeos da *Semi-nested* PCR para o gene *16 S rRNA*

Através do programa disponível virtualmente pelo NCBI (*National Center of Biotechnology Information*), mais específico na parte “*Nucleotideo Blast*” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foi realizado o alinhamento das bactérias *Escherichia coli* X80724.1 com *Streptococcus agalactiae* X59032, e a mesma *E.coli* com *Listeria monocytogenes* X56153, para o desenho dos três oligonucleotídeos específicos do gene bacteriano *16 S rRNA*.

AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACGGAGGAAG
 AGCTTGCTCTTCCAAAGTTAGTGCCGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGAT
 AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTT
 CGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGA
 TGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG**ACTCCTACGGGAGGC**
AGCAGTAGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGTTTTTC
 GGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTGCTNGTCCCTTGACGGTATCTAA
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT**GCCAGCAGCCGCGGTAATACG**TAGGTGGCNAGCGTNGTCCGGATGG
 ATTGGGCGTNAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTNATGTGAAAGCCCCCGGCTGAACCGGGNNGG
 TCATTGGAAACTGGAAGACTNGAGTGCNGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTNACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGT
 GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTT
 TCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT
 CAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTT
 ACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGT
 GCATGGTTGTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTT
 AGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
 CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTTCGCGAAGC
 CGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGCATGCCACGG**TGAATACGTTCCCGGGC**TNGTACACACCGCNC
 GTCACACCACGAGAGT

Tabela 2 – Oligonucleotídeos para detecção do gene universal bacteriano *16 S rRNA*

Nome	Sequência	Sentido
P01	5'GTGAATACGTTCCCGGGCCT3'	“antisense”
P02	5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG 3'	“sense”
P03	5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT 3'	“sense”

3.8.5. Padronização da concentração da reação de Semi-nested PCR do gene *16 S rRNA*:

As bactérias *E.coli* ATCC (American Type Culture Collection), 25972, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus agalactiae* foram semeadas em placas contendo MacConkey e Agar sangue, e incubadas em estufas de CO₂, por 24 horas. Após esse período colônias isoladas foram coletadas e transferidas para microtubos de 1,5mL contendo solução salina (descreve o q tem na solução salina) e incubadas por 10 minutos a 100°C, em banho-seco, para extração do DNA bacteriano. Estes serviram como controles positivos da PCR, para a detecção do gene bacteriano universal *16 S rRNA*, até que se obteve as concentrações mais adequadas de cada reagente que compõe a reação molecular..

Desta forma as concentrações foram: 3,0µl de tampão de 10X, 3,0 µl de MgCl₂ [1,5mM], 3,0µl de DNTP [10 mM], 0,4µl de cada oligonucleotídeos [10 µM], 0,15µl de *Taq Polimerase* e água para completar volume final de 30µl. As reações são realizadas utilizando os oligonucleotídeos P03 e P02 na primeira reação, e P02 e P01 na segunda reação. A ciclagem apresenta 35 ciclos os quais foram precedidos por um período de desnaturação inicial da 96°C durante 2 minutos e, 96°C de 30 segundos, 66°C de 30 segundos, 72°C por 1 minuto, no final, 5 minutos a 72°C para a extensão final e submetida às seguintes condições de ciclagem:

Para confirmação da reação de amplificação do gene bacteriano universal *16 S rRNA*, os produtos foram aplicados em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio e foto-documentados no aparelho Kodak® sob exposição de luz ultravioleta.

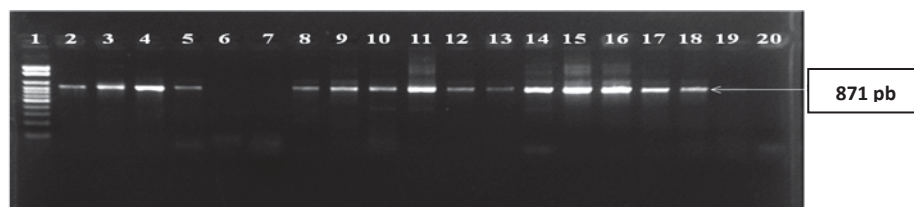


Figura 3 – Gel de agarose 2%. Amplificação do gene bacteriano universal *16 S rRNA*, no gel: 1) Marcador 50 pb; 2) Controle positivo, *Escherichia coli*; 3) Controle positivo, *Listeria monocytogenes*; 4) Controle positivo, *Streptococcus agalactiae*; 5,8 a 19) Amostras positivas; 6 e 7) Amostras negativas; 20) Controle negativo da reação.

3.8.6. Sucessivas reações de digestões com enzimas de restrição:

Após a confirmação da positividade do gene bacteriano universal *16 S rRNA* das amostras extraídas dos RN assintomáticos ou sintomáticos para a suspeita de sepsis precoce neonatal, foram realizadas sucessivas reações de digestões enzimáticas, com as específicas enzimas de restrições *HaeIII*, *AluI*, *DdeI*, *MnII*, seguindo as especificações do fabricante, sem nenhuma modificação.

Essa parte da metodologia baseia-se no artigo Lu et al. ⁶², cujo autor descreve inicialmente, a digestão dos produtos de PCR positivos para o gene bacteriano universal *16 S rRNA* com *HaeIII*. Essa enzima pré-estabelece um direcionamento da identificação dos patógenos, indicando a sequência a ser utilizada, com as outras enzimas, para a confirmação dos patógenos encontrados nas amostras (Figura 4).

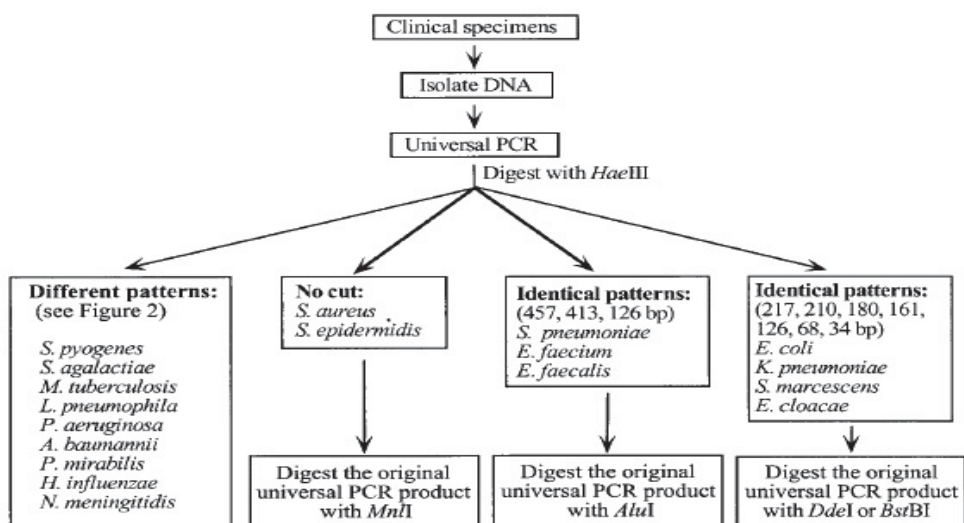


Figura 4 – Esquema da PCR e RFLP para detecção e identificação de bactérias em fluidos corporais ⁶².

3.8.7. Padronização dos padrões de bandas esperados para bactérias as analisadas:

Todas as bactérias foram repicadas em meios de cultura específicos e incubadas nas estufas apropriadas para seus crescimentos. Após esse processo, foram diluídas em solução salina e aquecidas em banho-seco, por 10 minutos a 100°C, para a extração do material genético – já citado anteriormente. Procedeu-se com a reação da PCR para a detecção do gene bacteriano universal *16 S rRNA*, onde todas as amostras foram positivas, pois foram visualizadas em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo.

O restante do produto da PCR foi purificado através do kit “*Wizard*®” Promega, seguindo as recomendações do fabricante, eliminando interferentes (como excesso de reagentes, restos celulares do processo de extração por choque térmico). O próximo passo foi a realização da reação de Sequenciamento no DYEnamic™ Terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACE™) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc Cleveland, Ohio, USA). As informações obtidas foram direcionadas para o programa Gene Runner versão 3,05, escolhendo a função de “análise de enzima de restrição” para determinar os possíveis tamanhos de pares de bandas, que cada bactéria apresentou nesse processo. A Tabela 3 demonstra a análise obtida.

Tabela 3 – Padrões de bandas obtidas através da reação de sequenciamento

Patógenos	<i>HaeIII</i>	<i>AluI</i>	<i>DdeI</i>	<i>MnI</i>
<i>S. agalactiae</i>	377; 319; 93; 79	344; 208; 113		
<i>L. monocytogens</i>	455; 303; 83; 27; 3	345; 206; 159; 113; 47		
<i>E. coli</i>	217; 209; 180; 161; 68; 34; 3		638; 239	
<i>K. pneumoniae</i>	216; 210; 179; 161; 68; 34; 3		630; 380; 250; 241	
<i>S. aureus</i>				466; 129; 103; 93; 47; 36
<i>S. epidermides</i>				309; 157; 129; 102; 93; 47; 36
<i>S. pyogenes</i>	459; 319; 93	344; 207; 207; 113		
<i>S. pneumoniae</i>	459; 412; 3	343; 207; 161; 113; 46		
<i>E. cloacae</i>	218; 210; 180; 161; 68; 34		348; 283; 243	
<i>P. aeruginosas</i>	378; 219; 171; 59; 34; 9; 3	211; 208; 207; 133; 114		

3.9. Processamento dos Dados:

Os dados contidos na ficha pré-codificada foram revisados manualmente para se detectar erros de seleção ou preenchimento. Posteriormente, eles foram digitados e codificados em um arquivo, em microcomputador, utilizando-se o padrão disponível no programa estatístico *SPSS 7.5 for Windows*. Após digitação dos casos, fez-se verificação manual dos dados confrontando-os com aqueles presentes na ficha original, a fim de se evitar erros.

3.10. Análise dos Dados:

Para avaliação das variáveis categorias foi realizado o teste de qui-quadrado e para variáveis contínuas foi realizado teste de Mann Whitney. foram calculados os índices diagnósticos: sensibilidade, especificidade e valores preditivo positivo e negativo.

O nível de significância aceito foi $p < 0,05$ (intervalo de confiança de 95%).

3.11. Aspectos Éticos:

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa do CAISM / UNICAMP e pelo Comitê de Ética da FCM/UNICAMP com os números 060/2010 e 1231/2010 respectivamente, tendo sido solicitado aos responsáveis à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4. RESULTADOS

Foram avaliados 245 RN no estudo, sendo que a maioria apresentava algum sinal provável de SNP (178 - 73,2%). No tocante à presença de fatores de risco maternos perinatais para uma evolução de sepse, observou-se que apenas a presença de trabalho de parto prematuro foi estatisticamente significativa entre os grupos de RN, conforme a tabela 4.

Tabela 4 – Evolução clínica dos sintomas maternos em relação à classificação dos RN quanto à presença ou ausência de sintomas ao nascer:

	Assintomáticos (65)	Sintomáticos (178)	p*
Trabalho de parto prematuro	14 (21,5)	110 (61,8)	<0,001
Rotura prematura de membranas	33 (50,7)	88 (49,4)	0,982
Fisometria	16 (24,6)	44 (24,7)	0,986
Hipertermia	13 (20,0)	27 (15,1)	0,461
Infecção do trato urinário [#]	15 (28,3)	44 (33,8)	0,461
<i>Streptococcus agalactiae</i> positivo ^{& 1}	22 (66,6)	45 (48,3)	0,206

Variáveis categóricas apresentadas em frequência N(%);

* teste de qui-quadrado;

[#] Informação desconhecida em 12 no grupo assintomático e 35 no grupo sintomático;

[&] Informação desconhecida em 30 no grupo assintomático e 86 no grupo sintomático;

¹ com quimioprofilaxia;

Em relação à necessidade de internação, todos os 178 RN com apresentação de sinais clínicos e sintomas compatíveis com sepse foram avaliados e internados na unidade de internação neonatal, seja em terapia intensiva ou em cuidados intermediários, de acordo com a gravidade da situação. Dos 65 RN assintomáticos, 54 (83,0%) deles permaneceram com suas mães na unidade de alojamento conjunto, após avaliação inicial normal e coleta de duas amostras de hemocultura.

Em relação às variáveis neonatais observou-se que o grupo sintomático mostrou-se com menor peso ao nascimento, menor idade gestacional, com predominância do sexo feminino e com menores valores de *Apgar no 1º e 5º minuto* de vida, conforme a tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição das variáveis neonatais segundo os grupos:

	Assintomáticos	Sintomáticos	p*
	(65)	(178)	
Peso ao nascer (g)	3210	2535	0,001
Idade gestacional (semanas)	39	36	0,001
Sexo masculino (%)	53 (73,6)	72 (40,2)	0,001
Apgar do 1º minuto (≥7)	62 (95,3)	126 (70,7)	0,001
Apgar do 5º minuto (≥7)	65 (100)	163 (91,5)	0,003
Parto vaginal	42 (64,6)	92 (51,7)	0,116

As variáveis peso ao nascer e idade gestacional estão apresentadas em medianas e as variáveis de Apgar de 1º e 5º minuto ≥7 e prematuridade estão apresentadas em frequência N(%);

* Teste de Mann-Whitney para as variáveis contínuas e teste de qui-quadrado ou Fisser para as variáveis categóricas;

No grupo sintomático a maioria dos sinais e sintomas apresentados à admissão foi sinais respiratórios, seguido alterações da frequência cardíaca, distermia e alteração do estado geral. Sinais de choque à admissão foram infrequentes, conforme pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6 – Sinais e sintomas clínicos à admissão como suspeita de SNP:

	Sintomáticos (178)
Desconforto Respiratório	105 (58,9)
Cianose	97 (54,5)
Apnéia	57 (32,0)
Hipotermia	57 (32,0)
Hipertermia	42 (23,6)
Letargia	29 (16,2)
Bradycardia	23 (12,9)
Taquicardia	16 (5,6)
Choque	4 (2,2)
Óbito	2 (1,2)

Variáveis apresentadas em frequência N(%);

De acordo com a classificação dos RN foi observado que a positividade da “*RFLP-PCR*” não se mostrou estatisticamente diferente nos dois grupos (tabela 7)

Tabela 7 – Positividade da “*RFLP-PCR*” segundo os grupos de RN:

	Assintomáticos (65)	Sintomáticos (178)	p*
PCR positiva	36 (55,3)	92 (51,6)	0,583
PCR negativa	29 (44,6)	86 (48,3)	

N(%);

*teste de qui-quadrado;

Após a detecção da presença do gene bacteriano universal, *16 S rRNA*, realizou-se as sucessivas reações de digestões com enzimas de restrições e identificou-se os seguinte patógenos, conforme a tabela 8.

Tabela 8 – Bactérias identificadas em relação à classificação dos RN:

	Assintomáticos (65)	Sintomáticos (178)	Total
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	17	45	62
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	13	19	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	9	17	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	4	10
<i>Escherichia coli</i>	2	7	9
<i>Streptococcus pyogenes</i>	5	4	9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	4	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	1
Não identificado	27	19	46

Em relação ao resultado da hemocultura, o exame positivou em sete casos, em todos os RN com sinais e sintomas sugestivos de SNP. As bactérias isoladas foram a *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae*, porém a técnica de “RFLP-PCR” foi positiva em cinco casos desses mesmos RN, sendo as mesmas bactérias identificadas.

Já em relação à doença causada por meningite, dois casos foram identificados pela cultura de líquido cefalorraquidiano e pela “RFLP-PCR”, cuja *Escherichia coli* foi a bactéria encontrada.

Em relação ao diagnóstico de SNP, nenhum dos 65 RN assintomáticos, cujas mães apresentavam fatores de riscos para infecção ovular, não apresentou positividade em relação ao exame de hemocultura e, as evoluções clínicas desses assintomáticos, não foram observadas apresentações de sinais clínicos sugestivos à SNP, dentre 48 horas de observação/internação na unidade de Alojamento Conjunto, pertencente à Unidade da Neonatologia.

Dos RN cujos apresentaram sinais ou sintomas clínicos sugestivos de SNP, apenas 26 (14,6%) possuíam algum fator de risco perinatal para o desenvolvimento de SNP. O diagnóstico final de SNP neste grupo foi em 31 casos, sendo os sete RN que tiveram identificação de patógenos bacterianos pela hemocultura ou pela cultura de líquido cefalorraquidiano. Dos 24 RN que apresentaram evolução clínica compatível para SNP, estando alterados os exames de leucograma e de proteína C reativa, constituiu o quadro compatível para sepse clínica.

Para o cálculo do índice de acurácia do diagnóstico para o teste molecular foram considerados os RN sintomáticos à admissão e com diagnóstico de sepse clínica, acrescido daqueles RN que apresentaram SNP, comprovada por cultura de líquido cefalorraquidiano ou de sangue, conforme a tabela 9.

Tabela 9 – Positividade de “*RFLP-PCR*” segundo a ocorrência de sepse:

	Sepse presente	Sepse ausente
PCR positiva	29	95
PCR negativa	4	83

Sepse presente = RN sintomáticos com hemocultura positiva+ cultura liquido cefalorraquidiano positivo + sepse clínica;

Sepse ausente = RN sintomáticos em que foi descartada hipótese de infecção;

Deste modo, a taxa de sensibilidade do teste foi de 87,8%, a especificidade de 46,6%, o valor preditivo positivo de 23,3% e o valor preditivo negativo de 95,4%, resultando em uma acurácia de 53,0%.

5. DISCUSSÃO

O estudo identificou que fatores de risco perinatal levaram à realização de triagem infecciosa em um número significativo de RN devido a suspeita ou risco de desenvolvimento de SNP, tais como febre materna periparto, fisometria, trabalho de parto prematuro, rotura prematura de membranas amnióticas e colonização pelo *Streptococcus agalactiae*. Dados de literatura apontam esses mesmos fatores e, dependendo da sintomatologia e da rotina de cuidados de cada unidade neonatal, em particular, pode implicar no início de tratamento antimicrobiano ⁵⁶, pois a evolução clínica da doença pode ser imprevisível e rápida, potencialmente fatal se não adequadamente tratada ^{3,63}.

Chama a atenção que quase 15% dos RN com alguma apresentação de sinal clínico sugestivo de SNP à admissão não possuíam nenhum dos fatores de riscos no histórico do pré-natal ou no momento do perinatal. Nesse aspecto, observou-se que quase a metade da população das gestantes estudadas (47,7%) não teve avaliação para pesquisa de colonização do *Streptococcus agalactiae*, apesar do empenho das Sociedades de Pediatria e Ginecologia no incentivo da triagem universal destas, e não somente aquelas com algum fator de risco no momento do parto. No entanto, deve ser ressaltado que um número razoável de gestantes foi admitido no serviço em franco trabalho de parto, impossibilitando a coleta ou mesmo a administração de antimicrobiano, quando indicado. Segundo dados coletados CCHI/CAISM/UNICAM/SP – qual intervalo de tempo, observou-se que a taxa de colonização materna pelo *Streptococcus agalactiae* foi de 27,6%, e a neonatal, foi de 3,1%, com prevalência de doença neonatal de 10,8/1000 nascidos vivos. A taxa de mortalidade foi de 50% ⁶⁴.

Em relação às características sintomatológicas dos RN houve diferença significativamente estatística entre os dois grupos, quanto aos valores de peso de nascimento e idade gestacional, sendo o grupo dos sintomáticos com menores valores de peso de nascimento e de idade gestacional. A maioria dos RN assintomáticos (83%) foi encaminhada para o regime de alojamento conjunto, após avaliação clínica médica ao nascer, além da coleta de duas amostras, de locais distintos, para o exame de hemocultura, possibilitando uma relação gestante e RN mais adequada, uma vez que a hemocultura sendo negativa e ausência de sintomas clínicos sugestivos, não houve

aumento de risco de desenvolvimento de SNP, durante a permanência de 48 – 72 horas de atendimento hospitalar. Esta conduta foi adotada no CAISM/UNICAMP/SP em 1996 e recentemente, a Academia Americana preconizou abordagem semelhante mais conservadora para RN a termo ⁶³.

O sinal ou sintoma clínico mais frequente, observado por este estudo, foi a disfunção respiratória, com combinações variáveis de desconforto respiratório (tiragem intercostal, batimento de aleta nasal, retração subcostal, gemência), crises de cianose ou apneia. Tais dados são descritos na literatura como sendo os sinais de apresentação mais frequentes e servem como indicador de coleta de hemograma, proteína C-reativa, líquido cefalorraquidiano e solicitação de radiografia de tórax. Consideramos essa abordagem mais que adequada devido ao risco da doença, porém, deve ser observado que a manutenção dos antimicrobianos empíricos, sem nenhuma comprovação laboratorial posterior de sepse, também está relacionado a danos à saúde, especialmente em RN pré-termo.

Weintraub et al. ⁸ demonstraram que, em um período de seis anos em um centro neonatal terciário norte-americano, dos 715 RN internados por desconforto respiratório e com diagnóstico final de taquipnéia transitória do RN, 251 (33,7%) receberam esquema antimicrobiano por suspeita de sepse e oito deles receberam esquema completo, apesar de não haver fatores de risco identificáveis para sepse. Shah *et al.* ⁶⁵ demonstraram que o uso de antimicrobiano por tempo prolongado por SNP presumida, em RN em idade gestacional menor que 28 semanas foi associado com aumento em 2 vezes o risco de sepse tardia (OR: 2.1, 95% CI: 1.2-3.7, p = 0.013). Abdel Ghanny e Ali ⁶⁶ demonstraram também que, em RN de muito baixo peso, o uso de antimicrobianos empírico por mais de cinco dias por SNP foi associado ao aumento de mortalidade (OR 1,45 IC95% 1.24-1.69), e desfecho composto de morte ou enterocolite necrosante (OR 2.13 IC95% 1.55-2.93).

Scharg et al. ⁶⁷, em estudo sobre SNP, tanto comprovada por cultura como sepse clínica, encontraram dados semelhantes quanto à sintomatologia, com predominância dos quadros respiratórios (96% dos casos), letargia (15,5%), sinais neurológicos (13,1%), distermia (11,4%) e dificuldades alimentares (7,2%). Também

nesse estudo, a taxa de hipotensão, como sinal de choque, foi baixa (9,3%), apesar de ser um evento grave associada à sepse.

A taxa de positividade da hemocultura encontrada por esse estudo foi baixa, menor que 3%, e as taxas no CAISM/UNICAMP/SP são reladas entre 10-30% nos últimos 13 anos. Isso vem de encontro com a literatura atual, que tradicionalmente associa baixas taxas de positividade à cultura de sangue na SNP, pelos motivos já citados anteriormente, como bacteremia de baixa intensidade, uso prévio de antimicrobianos pelas gestantes, volume de sangue insuficiente para a coleta das amostras e as técnicas de cultivo, não automatizadas e pouco sensíveis⁶⁸. Em relação ao teste molecular na detecção e identificação da SNP, o estudo utilizou um pequeno volume de sangue (200 µL de sangue total), sendo uma característica importante para um teste diagnóstico, especialmente em RN de baixo ou muito baixo peso. O uso da técnica de amplificação genômica, por oligonucleotídeos específicos, para a detecção do gene universal bacteriano, *16Sr-RNA* foi escolhida por ser a região altamente conservada nas diferentes espécies bacterianas, e mesmo apresentando mutações pontuais no longo processo evolutivo, a região continua a ser conservada, e apenas patógenos bacterianos são amplificados, descartando quaisquer outros microrganismos. Chen et al.⁶⁹. Diferentemente da hemocultura, a “*RFLP-PCR*” não depende da viabilidade de bactérias para resultar em teste positivo⁷⁰.

Os resultados negativos da “*RFLP-PCR*” em RN com suspeita de sepse ou mesmo naquelas com hemocultura positiva, poderiam ser explicados pelo uso prévio de antibióticos pela mãe. No estudo realizado por Dutta et al.⁷⁰ foi demonstrado que somente 12% das amostras submetida à PCR, permaneciam positivas após 12 horas do início da antibioticoterapia, mas negativando após 24 horas. Os autores comentam que não somente provoca a morte bacteriana, mas também facilita a eliminação do seu DNA da corrente sanguínea.

Alguns estudos avaliaram o uso da PCR no diagnóstico da SNP. Laforgia et al.⁷¹ determinaram uma taxa de sensibilidade do método de 100% e especificidade de 93,1%. Avaliando 33 RN com suspeita de SNP (apenas quatro casos com hemocultura positiva). Reyer-Nilsen et al.⁷² avaliaram 48 casos suspeitos de SNP e encontraram

taxas de sensibilidade de 66,7%, especificidade de 87,5%, valor preditivo positivo de 95,4% e valor preditivo negativo de 75%. Em estudo com tamanho amostral de 1233 RN a termo ou próximo ao termo avaliado por sepse, Jordan et al.⁷³ demonstraram altas taxas de especificidade (97,5%) e de valor preditivo negativo (99,2%) para o método, mas com sensibilidade de 41,1%, e taxa de recuperação do patógeno na hemocultura foi 1,4%.

O presente estudo obteve uma alta taxa de sensibilidade, mas baixa especificidade, conforme já demonstrado, o que difere dos trabalhos acima citados que avaliaram o uso da PCR como método diagnóstico na SNP.

O uso do diagnóstico composto para o diagnóstico de sepse, ou seja, hemocultura e exame clínico é justificado pela baixa sensibilidade da hemocultura, o que, em uma análise mais detalhada seria necessário um número elevado de amostras, gerando resultados duvidosos em decorrência da cultura negativa pelo uso prévio de antibióticos ou coleta inadequada⁷⁵.

Apesar de a técnica de PCR possuir alta sensibilidade, ainda não é possível excluir resultados falso-positivos⁷⁰. O teste pode detectar quantidades mínimas de unidades formadoras de colônias em sangue de RN, ou seja, 40 e 50 unidades formadoras de colônia/ml, para *E. coli* e *S. agalactiae*, respectivamente, conforme demonstrado por Jordan e Durso. Os casos em que a identificação resultou em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em RN assintomáticos podem ser justificados por uma possível contaminação da amostra durante a coleta devida a antissepsia inadequada da pele.

Quanto aos patógenos identificados podem ser feitos os comentários a seguir. Houve predominância de bactérias gram-negativas, especialmente *Klebsiella pneumoniae* (27,19%) e *Escherichia coli* (3,94%), justificados por serem microrganismos da flora urogenital materna. Houve um número importante de casos identificados de *Listeria monocytogenes* (11,40%), nenhum concordante com a hemocultura, e no serviço de neonatologia do CAISM/UNICAMP/SP (entre os anos de – 2011a – 2012, época do estudo), esse patógeno foi encontrado de modo extremamente raro. A identificação de *Pseudomonas aeruginosa* (4,38%) também chama atenção,

pois não pertence a microbiota materna, exceto em gestantes com mudança do *status* de colonização devido à internações hospitalares prévias. Alguns microrganismos gram-positivos, como *Streptococcus pyogenes* (3,94%) e *Streptococcus pneumoniae* (14,03%) também foram frequentes, embora também não comumente associados, com a SNP. E por fim, houve um número pequeno de identificação de *Streptococcus agalactiae* (3,07%), microrganismo considerado por décadas como o mais frequente responsável pela SNP.

A detecção de patógenos bacterianos no sangue dos RN ainda permanece desconhecido, entretanto, o presente estudo teve por objetivo a identificação qualitativa pela técnica de “*RFLP-PCR*”, não sendo possível avaliar quantitativamente as partículas bacterianas presentes na corrente sanguínea de todos os RN, e assim, não teve o compromisso de saber o valor de ponto de corte para o tratamento antimicrobiano nos RN.

Em relação a esses achados podem ser feitos alguns comentários: uma possível contaminação durante a coleta, na sala de parto, sem a devida assepsia adequada, discordando do que preconizada a ANIVSA, em relação à coleta das amostras sanguíneas dos RN assintomático, pois, todos estes permaneceram internados por no mínimo 48 horas não apresentando sinais clínicos para a evolução de SNP, incluindo aqueles sem uso de antimicrobiano o que difere da literatura – que descreve na maioria cujos RN doentes que apresentam sinais clínicos evidentes de sepse nas primeiras 12 - 24 horas de vida. Deste modo, a mínima presença de partículas bacterianas é detectada pela técnica de PCR, devido a sua alta sensibilidade.

A não identificação dos patógenos bacterianos em 46 dos RN do estudo pode ser explicada da seguinte maneira: foram sequenciadas cepas de 10 bactérias conhecidas, onde são identificados padrões exatos de bandas específicas, através da clonagem e do sequenciamento genômico de cada espécie analisada. Deste modo, se os padrões de bandas geradas não corresponderem aos padrões descritos na **Tabela 3**, é possível concluir que correspondem a patógenos bacterianos, devido à detecção do gene bacteriano universal, *16Sr-RNA*, entretanto, não faz parte dos 10 padrões seqüenciados neste trabalho.

Em relação aos resultados “duvidosos” pode ser feito o seguinte comentário: presença de bandas diferentes, ou seja, amplificação do material genético, mas com padrão de altura diferente do esperado, quando comparado à **Tabela 3**, podendo ser explicado por uma mutação no material genético desses patógenos e, por isso, essa diferença foi visualizada. Tal indefinição poderia ser resolvida através da reação de sequenciamento genômico, porém, tal método não se constituiu como objetivo deste estudo.

6. CONCLUSÃO

1. A RFLP-PCR detectou agentes patogênicos bacterianos em amostras biológicas de RNs com sinais clínicos sugestivos de SNP e de RNs assintomáticos com risco de infecção ovular.
2. A taxa de sensibilidade do teste foi de 87,8%, a especificidade de 46,6%, o valor preditivo positivo de 23,3% e o valor preditivo negativo de 95,4%, resultando em uma acurácia de 53,0%.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ward PA. The sepsis seesaw: seeking a heart salve. *Nat Med*. 2009 may;15(5): 497-8.
2. Sarquis ALS, Miyaki M, Cat MNL. Aplicação do escore CRIB para avaliar o risco de mortalidade neonatal. *J. Pediatr (Rio J)*. 2002 May-Jun;78(3):225-9.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Neonatologia: critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde. Brasília, DF; 2013. [Acesso em 01/07/2013]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Atenção à saúde do Recém-nascido: guia para os profissionais de saúde. Brasília, DF; 2013, p.79-93.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar, Brasília: Ministério da Saúde; Editora ANVISA. 2005. 116p.
6. Brozanski BS, Jones JG, Krohn MJ, Jordan JA. 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. *J Perinatol*. 2006 Jun;26(11): 688-92.
7. Ghazal P, Dickinson P, Smith CL. Early life response to infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Jun;26(3):213-8.
8. Weintraub A, Cadet C, Perez R, DeLorenzo E, Holzman I, Stroustrup A. Antibiotic use in newborns with transient tachypnea of the newborn. *Neonatology*. 2013;103(3): 235-40.
9. Hill HR. Biochemical, structural, and functional abnormalities of polymorphonuclear leukocytes in the neonate. *Pediatr Res*. 1987 Oct;22(4):375-82.
10. Maheshwari A, Christensen RD. Developmental granulocytopoiesis. In: Polin RA, Fox WN, Abmon SH. *Fetal and neonatal physiology*. 3rd ed. Philadelphia:Saunders. 2004.p.1388-95.

11. Shang S, Chen Z, Yu X. Detection of bacterial DNA by PCR and reverse hybridization in the 16S rRNA gene with particular reference to neonatal septicemia. *Acta Paediatr.* 2001 Feb; 90(2): 179-83.
12. Messer J, Eyer D, Donato L, Gallati H, Matis J, Simeoni U. Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr.* 1996; 129(4): 574-80.
13. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EE. *Clinical epidemiology, the essentials.* 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 43-74.
14. Silveira RC, Procianny RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 1999; 88(6): 647-50.
15. Mehr S, Doyle LW. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J.* 19(9): 879-87, 2000.
16. Døllner H, Vatten L, Austgulen R. Early diagnosis markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *J Clin Epidemiol.* 54: 1251-7, 2001.
17. Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004; 89: F229-35.
18. Gerdes JS. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. *Pediatr Clin North Am.* 2004 Aug; 51(4): 939-59.
19. Baltimore RS. Neonatal sepsis: epidemiology and management. *Paediatr Drugs.* 2003; 5(11): 723-40.
20. Escobar GJ. Effect of the systemic inflammatory response on biochemical markers of neonatal bacterial infection: a fresh look at old confounders. *Clin Chem.* 2003 Jan; 49(1): 21-2.
21. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Brown R. The neonatal blood count in health and disease I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr.* 1979; 95(1): 89-98.
22. Lloyd BW, Oto A. Normal values for mature and immature neutrophils in very preterm babies. *Arch Dis Child.* 1982 Mar; 57(3): 233-5.

23. Mouzinho A, Rosenfeld CR, Sánchez PJ, Risser R. Revised reference ranges for circulating neutrophils in very-low-birth-weight neonates. *Pediatrics*. 1994 Jul;94(1):76-82.
24. Rodwell RL, Taylor KM, Tudehope DI, Gray PH. Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns. *Pediatr Infect Dis J*. 1983;12(5): 372-6.
25. Silva O, Ohlsson A, Kenyon C. Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. *Pediatr Infect Dis J*. 1995;14: 362-66.
26. Pizzini C, Mussap M, Plebani M, Fanos V. C-reactive protein and serum amyloid A protein in neonatal infections. *Scand J Infect Dis*. 2000; 32(3): 229-35.
27. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol*. 2001; 38(2-3): 189-97.
28. Aibender E, Cabatu EE, Guzman DM. Serum C-reactive protein and problems of newborn infants. *J Pediatr*. 1982;101(3): 438-40.
29. Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16(8): 735-46.
30. Chiesa C, Signore F, Assuma M, Buffone M, Tramontozzi P, Osborn *et al*. Serial measurements of C-reactive protein and interleukin-6 in the immediate postnatal period: reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. *Clin Chem*. 2001;47(6): 1016-22.
31. Mathers NJ, Pohlandt F. Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection. *Eur J Pediatr*. 1987;146(2): 147-51.
32. Pourcyrus M, Bada HS, Korones SB, Baselski V, Wong SP. Significance of serial C-reactive protein responses in neonatal infection and other disorders. *Pediatrics*. 1994; 93(4): 693-4
33. Berger C, Uehlinger J, Ghelfi D, Blau N, Fanconi S. Comparison of C-reactive protein and white blood cell count with differential in neonates at risk for septicaemia. *Eur J Pediatr*. 1995 Feb;154(2):138-44.

34. Kawamura M, Nishida H. The usefulness of serial C-reactive protein measurement in managing neonatal infection. *Acta Paediatr.* 1995 Jan;84(1):10-3.
35. Ehl S, Gering B, Bartmann P, Högel J, Pohlandt F. C-reactive protein is a useful marker for guiding duration of antibiotic therapy in suspected neonatal bacterial infection. *Pediatrics.* 1997 Feb;99(2):216-21.
36. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997 Nov;77(3):F221-7.
37. Ehl S, Gehring B, Pohlandt F. A detailed analysis of changes in serum C-reactive protein levels in neonates treated for bacterial infection. *Eur J Pediatr.* 1999 Mar;158(3):238-42.
38. Rønnestad A, Abrahamsen TG, Gaustad P, Finne PH. C-reactive protein (CRP) response patterns in neonatal septicaemia. *APMIS.* 1999 Jun;107(6):593-600.
39. Philip AG, Mills PC. Use of C-reactive protein in minimizing antibiotic exposure: experience with infants initially admitted to a well-baby nursery. *Pediatrics.* 2000 Jul;106(1):E4.
40. Albertoni ACS. Impacto da dosagem seriada da proteína C-reativa na suspensão da antibioticoterapia no período neonatal. São Paulo, 2004. (Dissertação – Mestrado – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina).
41. Schouten-Van Meeteren NY, Rietveld A, Moolenaar AJ, Van Bel F. Influence of perinatal conditions on C-reactive protein production. *J Pediatr.* 1992 Apr;120(4 Pt 1):621-4.
42. Marchini G, Berggren V, Djilali-Merzoug R, Hansson LO. The birth process initiates an acute phase reaction in the fetus-newborn infant. *Acta Paediatr.* 2000 Sep;89(9):1082-6.
43. Ishibashi M, Takemura Y, Ishida H, Watanabe K, Kawai T. C-reactive protein kinetics in newborns: application of a high-sensitivity analytic method in its determination. *Clin Chem.* 2002 Jul;48(7):1103-6.
44. Buck C, Pohlandt F. Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for

- diagnosis of neonatal infection. *Pediatr Infect Dis J*. 1995 Dec;14(12):1119-20.
45. Panero A, Pacifico L, Rossi N, Mancuso G, Stegagno M, Chiesa C. Interleukin 6 in neonates with early and late onset infection. *Pediatr Infect Dis J*. 1997 Apr;16(4):370-5.
46. Grasa Ulrich JM, Rite Gracia S, Grasa Biec JM, Marco Tello A, Rite Montanes S. Valores de referencia de interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en recién nacidos sanos. *An Esp Pediatr*. 2001;54(5): 526-7.
47. Miura E, Silveira RC, Procianoy RS. Sepsis neonatal: diagnóstico e tratamento. *J Pediatr (Rio J)*. 1999 Jul;75 Suppl 1:S57-62.
48. Wu YD, Chen LH, Wu XJ, Sang SQ, Lou JT, Du LZ et al. Gram strain-specific-probe-based real-time pcr for diagnosis and discrimination of bacterial neonatal sepsis. *J Clin Microbiol*. 2008 Aug;46(8):2613-9.
49. Srinivasan L, Harris MC. New technologies for the rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr*. 2012 Apr;24(2):165-71.
50. Guerti K, Devos H, Ieven MM, Mahieu LM. Time to positivity of neonatal blood cultures: fast and furious? *J Med Microbiol*. 2011 Apr;60(Pt 4):446-53.
51. Vieira AA. Sepsis no período neonatal. In: Moreira MEL, Lopes JMA, Carvalho M (orgs). *O Recém-nascido de alto risco – Teoria e pratica do cuidar*. Editora Fiocruz, 2004.p265-89.
52. Venkatesh M, Flores A, Luna RA, Versalovic J. Molecular microbiological methods in the diagnosis of neonatal sepsis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Sep;8(9):1037-48.
53. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16SrRNA gene PCR and BACTEC9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2000 Jul;38(7):2574-8.
54. Ohlin A, Bäckman A, Ewald U, Schollin J, Björkqvist M. Diagnosis of neonatal sepsis by broad-range 16S real-time polymerase chain reaction. *Neonatology*. 2012;101(4):241-6.
55. Strauss KA, Puffenberger EG. Genetics, medicine, and the Plain people. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:513-36.

56. Benitz WE, Gould JB, Druzin ML. Antimicrobial prevention of early-onset group B streptococcal sepsis: estimates of risk reduction based on a critical literature review. *Pediatrics*. 1999 Jun;103(6):e78.
57. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jan; 23(1):235-51.
58. Margall Coscojuela N, Majó Moreno M, Latorre Otín C, Fontanals Amyerich D, Domínguez García A, Prats Pastor G. Use of universal PCR on cerebrospinal fluid to diagnose bacterial meningitis in culture-negative patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Jan;21(1):67-9.
59. Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr*. 1978 Jul;93(1):120-2.
60. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr*. 1991 Sep;119(3):417-23.
61. Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg*. 1953 Jul-Aug;32(4):260-7
62. Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 2000 Jun;38(6):2076-80.
63. Polin RA. Committee on Fetus and Newborn. Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis. *Pediatrics*. 2012 May;129(5):1006-15.
64. Nomura ML, Passini Júnior R, Oliveira UM, Calil R. Group B streptococcus maternal and neonatal colonization in preterm rupture of membranes and preterm labor. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009 Aug;31(8):397-403.

65. Shah P, Nathan E, Doherty D, Patole S. Prolonged exposure to antibiotics and its associations in extremely preterm neonates - the Western Australian experience. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013 Apr [Epub ahead of print].
66. Abdel Ghany EA, Ali AA. Empirical antibiotic treatment and the risk of necrotizing enterocolitis and death in very low birth weight neonates. *Ann Saudi Med.* 2012 Sep-Oct;32(5):521-6.
67. Scharg SJ, Cutland CL, Zell, ER, Kuwanda L, Buchmann E, Velaphi SC et al. Risk factors for neonatal sepsis and perinatal death among infants enrolled in the prevention sepsis trial, Soweto, South Africa. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Aug; 31(8):821-6.
68. Benitz WE. Adjunct laboratory tests in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 2010 Jun;37(2):421-38.
69. Chen LH, Duan QJ, Cai MT, Wu YD, Shang SQ. .Rapid diagnosis of sepsis and bacterial meningitis in children with real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction amplification in the bacterial 16S rRNA gene. *Clin Pediatr (Phila).* 2009 Jul;48(6):641-7.
70. 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. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2009 Jan;163(1):6-11.
71. Laforgia N, Coppola B, Carbone R, Grassi A, Mautone A, Iolascon A. Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Paediatr.* 1997 Oct;86(10):1097-9.
72. 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 Pediatr.* 2009 Jan 19;9:5.
73. Jordan JA, Durso MB, Butchko AR, Jones JG, Brozanski BS. Evaluating the near-term infant for early onset sepsis: progress and challenges to consider with 16S rDNA polymerase chain reaction testing. *J Mol Diagn.* 2006 Jul;8(3):357-63.

74. Jordan JA, Durso MB. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn.* 2005 Nov;7(5):575-81.
75. Jordan JA. Molecular diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 2010;37: 411–9.

8. ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

USO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), PARA DETECÇÃO DE *ECHERICHIA COLI*, *LISTERIA MONOCYTOGENES* E *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM RN COM SUSPEITA DE SEPSE PRECOCE.

Fui informada pelo médico responsável da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal, onde meu filho está internado, que ele está com algumas bactérias em seu sangue, como por exemplo, *Echerichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, causando graves riscos à saúde. De acordo com a rotina, já estabelecida neste serviço de atendimento neonatal, para o resultado deste sintoma serão colhidos sangue e líquido da espinha para o exame de cultura.

Foi proposta a mim, a realização de coleta de mais um tipo de exame, que permitirá a melhoria deste resultado, chamado Reação em Cadeia da Polimerase, para o qual necessitamos volume a mais de sangue e líquido da espinha, onde serão extraídas porções de bactérias e, em seguida, realizadas reações de ampliações, com objetivo de encontrar ou não destas bactérias no sangue do meu filho.

Eu, ainda estou de acordo, que os resultados deste novo exame, não estarão disponíveis a tempo de auxiliar no tratamento do meu filho, pois trata de uma pesquisa e que não esta certificada para ajudar na rotina de atendimento da UTI Neonatal. Sei que todos os resultados não serão divulgados para todos, apenas o médico responsável saberá.

{ } Permito que o material genético (porções das bactérias) sejam armazenadas para futuros estudos;

{ } Não permito que o material genético (porções das bactérias) sejam armazenadas para futuros estudos;

Nome da Paciente: _____ HC: _____

Assinatura: _____

Campinas, _____ de _____ de _____.

Dr. Sergio T. M. Marba, Docente Responsável pela Unidade Neonatal, (19) 3521 9324 e Tycha Bianca Sabaini Pavan, Bióloga e pesquisadora, (19) 3521 7096



CEP, 18/01/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1231/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0961.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “USO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), PARA DETECÇÃO DE ECHERICHIA COLI, LISTERIA MONOCYTOGENES E STREPTOCOCCUS AGALACTIAE EM RECÊM-NASCIDOS COM SUSPEITA DE SEPSE PRECOCE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Tycha Bianca Sabaini Pavan

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/12/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/01/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Comparar a detecção de patógenos bacterianos causadores de sepse neonatal precoce através da Técnica Molecular da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em recém-nascidos com suspeita clínica de sepse, atendidos na Unidade Neonatal do CAISM/UNICAMP, com os métodos tradicionais utilizados.

III - SUMÁRIO

Na unidade neonatal do Hospital Professor Doutor Aristodemo Pinotti da Universidade de Campinas/SP, a investigação laboratorial de sepse precoce é realizada em recém-nascidos sintomáticos através da coleta de hemograma, dosagem da Proteína C Reativa quantitativa seriada, culturas de sangue e líquido cefalorraquidiano. Estes exames são realizados nos Laboratórios de Patologia Clínica e Microbiologia do Hospital das Clínicas da Unicamp. Para a realização do projeto, serão coletadas amostras biológicas de 376 recém-nascidos (sangue-0,2ml/RN, líquido cefalorraquidiano e/ou lavado traqueal), no momento da triagem para infecção feita de rotina em recém-nascidos com suspeita de infecção ovular (assintomático) e recém-nascidos com sintomas de infecção (sintomático). Será realizado um estudo de teste de validação diagnóstica.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

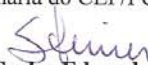
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de dezembro de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Dados Observados dos Prontuários dos Recém Nascidos

01. Dados Maternos

Nome: _____

HC: _____

Data da última menstruação: ___/___/___ Número de Gestações: ____

Pesquisa de Colonização para *Streptococcus agalactiae*: Não Sim

Idade Gestacional: ____ Resultado: Negativo Positivo

VDRL: Não Sim TPHA Negativo Positivo

Data do parto: ___/___/___ Via de parto: _____

Trabalho de parto prematuro: Não Sim

Bolsa rota: Não Sim Tempo de bolsa rota até o parto: _____

Hipertermia no período Periparto (24h antes até 48h pós-parto): Não Sim Tmáx: ____°C

Uso de antibiótico no momento do parto: Não Sim

Qual: Penicilina Cristalina Cefazolina Clindamicina

Tipo de líquido amniótico: Purulento Mecomial Claro

Infecção do Trato Urinário até 12 h pós-parto: Não Sim Agente isolado: _____

Tratamento: _____

Dados Observados dos Prontuários dos Recém Nascidos

02. Dados do RN

RN de: _____

Nome: _____

HC: _____

Data de Nascimento: ___/___/___

Peso: _____

Comprimento: _____

Idade Gestacional: Capurro Ecografia N. Ballard Amenorréia

Índice de Apgar: 1º minuto: ___ 5º minuto: ___ 10º minuto: ___

Presença de Sintomas com início ou até 48 h de vida: Não Sim

Distermia: Hipotermia ___ °C Hipertermia ___ °C

Apnéia Letargia Desconforto Respiratório Cianose Oligonúria

Má perfusão periférica Bradicardia Taquicardia Choque

Sopro cardíaco Outros

Hemograma:

Número de neutrófilos totais nas primeiras 48h: _____

Número de neutrófilos imaturos / totais nas primeiras 48h: _____

Proteína C Reativa: 1ª amostra Não Sim Quantas horas: _____

2ª amostra Não Sim Quantas horas: _____

Cultura de Sangue: Não Sim Agente Isolado(s): _____

Cultura do Líquido Cefalorraquidiano: Não Sim Agente Isolado(s): _____

Iniciou antibiótico: Não Sim

Antibiótico: Penicilina Amicacina Ampicilina Cefalexina

Peni/Procaína Peni/Benzatina Oxacilina

Tempo do uso de medicamento: _____

Alta hospitalar: ___/___/___ Evolução à Óbito: ___/___/___ Transferência: ___/___/___