Inês Stranieri

**Desenvolvimento de um marcador molecular
para o diagnóstico e monitoramento da
sepse neonatal bacteriana**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Doutor em
Ciências

Programa de: Pediatria

Orientadora: Dra. Patricia Palmeira

São Paulo

2014

Inês Stranieri

**Desenvolvimento de um marcador molecular
para o diagnóstico e monitoramento da
sepse neonatal bacteriana**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Doutor em
Ciências

Programa de: Pediatria

Orientadora: Dra. Patricia Palmeira

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Stranieri, Inês

Desenvolvimento de um marcador molecular para o diagnóstico e
monitoramento da sepse neonatal bacteriana / Inês Stranieri. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientadora: Patricia Palmeira.

Descritores: 1.Sepse 2.Recém-nascido 3.Infecções bacterianas 4.Reação em
cadeia da polimerase em tempo real 5.RNA ribossômico 16S

USP/FM/DBD-186/14

Aos meus filhos

Dedico esta tese aos meus filhos Thaís e Enrico que sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar a realização dos meus ideais, mesmo que fosse necessário ficarmos distantes em muitos momentos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, pelo carinho e amor absoluto.

Agradecimentos especiais

À minha orientadora Dra. Patricia Palmeira por mais essa oportunidade oferecida, pela confiança depositada e, principalmente, agradeço pela disponibilidade e pela atenção especial.

A Profa. Dra. Thelma Suelly Okay e toda a sua equipe do Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, pela sua dedicação, empenho, apoio incondicional, disponibilização de toda a sua equipe e todos os materiais necessários para o desenvolvimento deste projeto, pelas conversas, pelos conselhos e por poder contar sempre com o seu apoio. Todos esses anos trabalhando juntas contribuíram decisivamente para o meu crescimento como profissional e como pessoa.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por me guiar todos os dias, por me dar forças para superar todas as dificuldades e me manter forte para seguir em frente.

Este espaço é dedicado a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Não sendo possível citar a todos, há, no entanto, alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero:

Aos colegas do Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical, pelo apoio no desenvolvimento das técnicas laboratoriais. Em especial à Profa. Dra. Kelly Kanunfre, pelo companheirismo e pela ajuda, pela sua dedicação, empenho e carinho dispensado ao nosso trabalho.

As acadêmicas de Medicina Natalia de Carvalho Castro e Livia de Sousa Lima Pulcherio pela dedicação, cooperação e seriedade, sem as quais não teria sido possível o ponto de partida para o início deste projeto.

Aos colegas de trabalho do Serviço de Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário Julio Muller – UFMT, em especial à Dra. Silvana Salomão Cury, pela sua compreensão e apoio em relação à realização deste trabalho.

Agradeço também a toda equipe da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital e Maternidade Santa Helena de Cuiabá, em especial à equipe de enfermagem pela valiosa colaboração prestada.

Ao Prof. Dr. Paulo Renato Mello Bezerra Coordenador do DINTER USP/UFMT, pelo apoio, oportunidade e confiabilidade depositada em nosso trabalho.

A minha colega de doutorado a pediatra Maria Isabel V. Nadaf que participou da coleta das amostras pelo seu companheirismo e amizade.

Aos membros da Banca examinadora do Exame de Qualificação: Dra Vera Lucia Jornada Krebs, Dra. Gilda M.B. Del Negro e Dra. Edna Maria de Albuquerque Diniz que aceitaram gentilmente meu convite e contribuíram de forma construtiva com sugestões para o melhor desenvolvimento do trabalho.

À FAPEMAT (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso) pelo apoio financeiro (Edital Universal nº009/2001, processo nº 752380/2011) sem o qual não teria sido possível a realização deste projeto.

E, finalmente, agradeço a minha família pelo apoio, em especial minha irmã Ivanilde e minha sobrinha Cássia pelo acolhimento e pela recepção carinhosa todos esses anos.

Muito obrigada!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Justificativa do estudo	16
2.	OBJETIVOS	19
2.1.	Objetivos específicos	19
3.	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1.	Aspectos éticos	21
3.2.	Casuística	21
3.2.1.	Centros participantes	21
3.2.2.	Grupo de estudo	22
3.3.	Critérios clínicos para o diagnóstico de sepse neonatal	22
3.4.	Critérios laboratoriais para o diagnóstico de sepse neonatal	23
3.5.	Critérios de exclusão	25
3.6.	Coleta de sangue do grupo de estudo	25
3.7.	Coleta de sangue dos grupos controle	26

3.8.	Extração de DNA a partir de sangue periférico	27
3.9.	Amplificação com iniciadores do gene da β -actina humana	29
3.10.	Seleção de iniciadores do gene 16S rDNA bacteriano	30
3.11.	Padronização da PCR em tempo real (qPCR)	30
3.12.	Análise Estatística	31
4.	RESULTADOS	34
4.1.	Características das mães do grupo de estudos	34
4.2.	Análise dos RN do grupo de estudo e do grupo controle	35
4.3.	Parâmetros clínicos e laboratoriais dos RN do grupo de estudo	38
4.4.	Casos de sepse confirmada e sepse clínica	38
4.5.	Resultados das hemoculturas	39
4.6.	Padronização da qPCR com iniciadores do gene 16S rDNA	43
4.7.	Especificidade da qPCR	45
4.8.	Estabelecimento da curva padrão da qPCR	46
4.9.	Critérios de positividade para a interpretação dos resultados de qPCR das amostras de sangue de RN	49
4.10.	Resultados da qPCR em relação às hemoculturas	50
4.11.	Análise das amostras testadas pela qPCR	51
4.12.	Resultados da qPCR nos grupos controle	58
4.13.	Comparação entre os grupos estudados	59

4.14.	Análise dos óbitos e dos casos graves	61
4.15.	Análise dos dois casos com carga bacteriana muito elevada	62
5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÕES	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ANEXOS

Anexo I. Características das mães dos RN do grupo de estudos

Anexo II. Resultados individuais da qPCR do grupo de sepse confirmada, sepse clínica e controles nos diferentes tempos de coleta

Anexo III. Aprovação do CEP Julio Muller

Anexo IV. Aprovação Cappesq

Anexo V. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo VI. Ficha de Anamnese

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

bp	Pares de base
cDNA	DNA complementar ou do inglês <i>copy DNA</i>
CMV	Citomegalovírus
CRP	Proteína C reativa
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Deoxiribonucleotídeo trifosfato
EBV	Epstein- Barr vírus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
et al	E outros
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Grama
HC	Hospital das Clínicas
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HUJM	Hospital Universitário Júlio Müller
IMT	Instituto de Medicina Tropical
irp/min	Incursões respiratórias por minuto
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>limit of detection</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mM	Mili molar
ng	Nanograma
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (PCR em Tempo Real)
rDNA	DNA ribossomal
RN	Recém-nascido
RNA	Ácido Ribonucleico
RNT	Recém-nascido de termo
RNPT	Recém-nascido pré-termo
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia (do inglês CFU – <i>Colony Forming Unit</i>)
μL	Micro litro
μM	Micro molar
USP	Universidade de São Paulo
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso
VHS	Velocidade de hemossedimentação
16S	Componente do ribossomo de procariotos que possui 16 Svedberg de coeficiente de sedimentação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores e condições de amplificação do gene de β -actina humana.....	29
Tabela 2 - Distribuição dos 73 RN do grupo de estudo em relação às alterações laboratoriais (52 RNPT e 21 RNT).....	36
Tabela 3 - Características dos recém-nascidos do grupo de estudo e do grupo controle.....	37
Tabela 4 - Distribuição dos 32 RN com sepse confirmada de acordo com o tempo da hemocultura positiva, agente etiológico isolado, classificação de GRAM, diagnósticos clínicos e alterações laboratoriais..	40
Tabela 5 - Distribuição dos agentes etiológicos identificados de acordo com a coleta na qual as hemoculturas foram positivas. Houve 38 isolamentos nos três tempos estudados.....	42
Tabela 6 - Distribuição dos nove RN que evoluíram a óbito de acordo com os dados clínicos e laboratoriais, microrganismo isolado e tempo de amniorrexe prematura materna.....	43
Tabela 7 - Protocolo padronizado da qPCR.....	44
Tabela 8 - Resultado da hemocultura e qPCR nos 73 casos suspeitos de sepse neonatal incluídos no estudo, considerando os três tempos de coleta.....	50
Tabela 9 - Positividade da hemocultura e da qPCR nos diferentes tempos de coleta dos 32 casos confirmados de sepse neonatal.....	53
Tabela 10 - Carga bacteriana determinada por qPCR nos três tempos de coleta de 30 casos com sepse confirmada.....	54
Tabela 11 - Carga bacteriana determinada por qPCR nos três tempos de coleta de 35 casos com sepse clínica (do total de 41 casos de sepse clínica do estudo).....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de amplificação por qPCR da amostra de recém nascido com infecção por <i>Candida albicans</i> . O resultado negativo é confirmado pela ausência de amplificação durante os 40 ciclos da reação.....	45
Figura 2 - Diagrama mostrando a inclinação da curva (slope) de - 3,20, correspondendo a uma eficiência de 105,2%.....	47
Figura 3 - Curva padrão com o teste de diluições de bactérias variando de 10^6 a 10^1 UFC/mL.....	48
Figura 4 - Diagrama representativo da variação de 1 grau ($84,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) tolerada para a temperatura de <i>melting</i> das amostras positivas. Observa-se que todas as cinco amostras positivas representadas foram testadas em duplicata e apresentaram temperatura de <i>melting</i> dentro do intervalo estabelecido.....	49
Figura 5 - Diagramas representando o teste (em duplicata) das três amostras de sangue do RNT (2T) com sepse confirmada (hemocultura positiva) e para o qual a qPCR foi positiva na 1ª e 2ª amostras (linhas vermelhas e amarelas). A 3ª amostra foi negativa (ausência de amplificação – linhas verdes). No diagrama da esquerda é possível observar a subida das linhas vermelhas e amarelas a partir do ciclo 35 (1ª e 2ª amostras), o que também pode ser observado na curva de <i>melting</i> (diagrama do lado direito) que apresenta dois picos na faixa de temperatura esperada para as amostras positivas (em vermelho e amarelo) A ausência de pico (amplificação) na 3ª amostra está representada no diagrama do lado esquerdo pela manutenção da linha horizontal verde até o ciclo 40, e no diagrama do lado direito, pela linha verde que não apresentou pico no intervalo de temperatura de $84,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	52
Figura 6 - O diagrama da esquerda mostra que apenas a duplicata em azul (1ª amostra) do caso RNT (7T) apresentou amplificação no ciclo 33-34, fato confirmado na curva de <i>melting</i> (lado direito) na qual é possível observar os dois picos em azul dentro da faixa de temperatura aceita para amostras positivas, enquanto que as duplicatas em roxo e rosa não apresentam subida da curva no diagrama da esquerda, e também não apresentam picos no diagrama da direita (2ª e 3ª amostra- roxo e rosa) no intervalo de temperatura de $84,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	55
Figura 7 - Diagramas representando o teste (em duplicata) das três amostras de sangue do RNT (6T) com sepse clínica (hemoculturas negativas) e para o qual as três qPCR ratificaram o resultado das hemoculturas. No diagrama da esquerda é possível observar a inexistência de elevação das curvas até o ciclo 40, e no diagrama da direita não existem picos na curva de <i>melting</i> na faixa de temperatura esperada para as amostras positivas ($84,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).....	56
Figura 8 - Diagrama das medianas de cargas bacterianas obtidas pela qPCR nos grupos de estudo (sepse confirmada e clínica) no momento da suspeita de sepse (tempo zero), e nos três grupos controle (tempo único).....	60

RESUMO

Stranieri I. Desenvolvimento de um marcador molecular para o diagnóstico e monitoramento da sepse neonatal bacteriana [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A sepse bacteriana constitui a causa mais frequente de óbitos neonatais, e seu diagnóstico é complexo devido à inexistência de um teste laboratorial definitivo. O presente estudo desenvolveu uma técnica de amplificação quantitativa (qPCR) do gene 16S rDNA de bactérias tanto para o diagnóstico de sepse neonatal, quanto para avaliar se a qPCR é capaz de monitorar o tratamento. Para ser recrutado o RN deveria apresentar ao menos dois sinais/sintomas sugestivos de sepse, e dois parâmetros laboratoriais alterados. Amostras de sangue foram colhidas no tempo zero (suspeita de sepse), 48 horas e sete dias após o início da antibioticoterapia. Foram analisados 73 RN (21 RNT e 52 RNPT) com suspeita de sepse neonatal. A hemocultura foi positiva em 32 RN (43,8% - sepse confirmada) e negativa em 41 (56,2% - sepse clínica), enquanto a qPCR foi positiva em 65 RN (89%) e negativa em oito casos (11%). Dentre os 32 RN com sepse confirmada (11 RNT e 21 RNPT), neutrofilia foi encontrada em 22 (68,75%), CRP elevada em 21 (65,62%), plaquetopenia em 15 (46,87%) e leucopenia em 14 (43,75%). Foram analisadas 200 amostras dos 73 casos suspeitos, considerando os três tempos de coleta, resultando em 36 hemoculturas positivas (18,0%) e 135 qPCR positivas (67,5%). Nas 36 hemoculturas positivas houve 38 isolamentos. Bactérias Gram-positivas foram encontradas em 32 amostras (84,21%) e Gram-negativas em seis (15,78%). *Staphylococcus coagulase negativa* predominou dentre as Gram-positivas (75,0%). No grupo de 32 RN com sepse confirmada a qPCR foi positiva em 30 (30/32 - 93,7%). Em 14 casos (47%) a qPCR antecipou o diagnóstico de sepse quando comparada à hemocultura e foi positiva no tempo zero em 22 casos (68,75%), enquanto a hemocultura foi positiva em 11. Dos 41 casos de sepse clínica, a qPCR foi positiva em 35 (85,4%); em 26 casos (74,3%) já no tempo zero. O teste de McNemar encontrou discordância entre os resultados das hemoculturas e qPCR ($p < 0,0001$, IC de 95%), indicando superioridade da qPCR. Houve nove óbitos na casuística, todos com hemocultura e qPCR positiva. Em seis dos nove óbitos somente a terceira hemocultura foi positiva, enquanto a qPCR foi positiva em cinco casos já no tempo zero e não negativou em seis casos. A qPCR empregou a técnica de *touchdown*, com temperaturas de *annealing* decaindo de 66 a 62°C, limiar de detecção entre 1-10 UFC/mL. As cargas bacterianas foram em geral baixas (< 50 UFC/mL) mesmo nos casos com sepse confirmada e óbitos, porém quando as medianas das cargas bacterianas no tempo zero dos grupos com sepse confirmada (37,10 UFC/mL) e sepse clínica (24,49 UFC/mL) foram comparadas, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0402$). O estudo concluiu que a qPCR é capaz de detectar mais casos de sepse neonatal que a hemocultura, antecipando o diagnóstico na maior parte deles. Em relação à monitorização do tratamento, a qPCR apresentou associação com o sucesso ou falha terapêutica, negativou em casos que tiveram evolução favorável, não negativou na maior parte dos óbitos, porém há necessidade de confirmação destes dados.

Descritores: Sepse; Recém-nascido; Infecções bacterianas; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; RNA ribossômico 16S.

ABSTRACT

Stranieri I. Development of a molecular marker for diagnosis and monitoring of neonatal bacterial sepsis [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Bacterial sepsis constitutes one of the most frequent causes of neonatal deaths and its diagnosis is difficult due to the lack of a definitive laboratorial approach. The present study developed a bacterial 16S rDNA-based quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) both to the diagnosis of neonatal sepsis and to evaluate if qPCR is capable of monitoring antimicrobial treatment. For enrollment, the newborn (NB) should present, at least, two signs/symptoms suggestive of sepsis, and two abnormal laboratory parameters. Blood samples were collected on day zero (suspected sepsis), 48 hours and 7 days after the initiation of antibiotic therapy. Seventy-three newborns with suspected sepsis were recruited (21 term NB and 52 preterm NB), blood culture was positive in 32 (43.8% - confirmed sepsis) and negative in 41 (56.2% - clinical sepsis), while qPCR was positive in 65 (89.0%) and negative in 8 cases (11.0%). Considering the group of 32 NB with confirmed sepsis (11 TNB and 21PTNB), qPCR was positive in 30 (30/32 - 93.7%). Neutrophilia was found in 22 NB (68.75%), elevated CRP in 21 (65.62%), thrombocytopenia in 15 (46.87%) and leukopenia in 14 (43.75%). Of the 73 cases, taking into account the three collected samples (day zero, 48h and 7 days), 200 samples were analyzed, with 36 positive blood culture (18.0%) and 135 positive qPCR (67.5%). Of the 36 positive blood cultures, there were 38 bacterial isolations. Gram-positive bacteria were found in 32 samples (84.21%) and Gram-negative in 6 (15.78%). Coagulase-negative *Staphylococcus* was predominant in the Gram-positive group (75.0%). In 14 cases, qPCR anticipated the diagnosis when compared with blood culture, and was positive in 22 cases on day zero (68.75%), whereas blood culture was positive in 11. Among the 41 cases of clinical sepsis, qPCR was positive in 35 (85.4%); of these 26 (74.3%) on day zero. McNemar test found discordance between the results of blood cultures and qPCR ($p < 0.0001$, CI of 95%), indicating superiority of qPCR. There were nine deaths in the casuistic, all with positive blood culture and qPCR. In six of the nine deaths only the third blood culture was positive, while qPCR was positive in five cases already on day zero, and was still positive in the third sample in 6 cases. The qPCR employed the touchdown technique, with annealing temperatures decreasing from 66 to 62°C, detection threshold between 1-10 CFU/ml. Bacterial loads were generally low (<50 CFU/ml), even in those cases with confirmed sepsis and deaths, however when bacterial load medians on day zero were compared between confirmed (37.1 CFU/ml) and clinical (24.49 CFU/ml) sepsis groups, a statistically significant difference was found ($p = 0.0402$). The study concluded that qPCR can detect more cases of neonatal sepsis than blood culture, anticipating the diagnosis in most of them. Regarding the monitoring of treatment, qPCR was associated with success or treatment failure, became negative in cases that progressed favorably, remained positive in the majority of the deaths, however these data need to be confirmed.

Descriptors: Sepsis; Infant, newborn; Bacterial infections; Real Time Polymerase Chain Reaction; RNA, ribosomal, 16S.

1. INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas continuam sendo importante causa de morbimortalidade neonatal, traduzindo a complexa conjunção de fatores biológicos, sociais, econômicos e assistenciais relacionados ao acesso de gestantes e recém-nascidos (RN) aos serviços públicos de saúde (DUARTE, 1992; DUARTE e MENDONÇA, 2005; ANDRADE et al., 2006; DRUMOND et al., 2007). Na última década, houve redução significativa da mortalidade infantil em todas as regiões do país como resultado de campanhas de vacinação, incentivo ao aleitamento materno e incremento da assistência pré-natal e ao parto. Estima-se que 50% dos óbitos no primeiro ano de vida ocorram na primeira semana de vida (período neonatal precoce), o que tem chamado atenção para as causas e as formas de prevenção (ARAUJO et al., 2000; KREBS et al., 2003).

O Brasil é signatário dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM), compromisso proposto pela Organização Mundial da Saúde no ano de 2000 para reduzir em dois terços a mortalidade de crianças menores de cinco anos até o ano de 2015 (IPEA, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). No entanto, o cumprimento desta meta só será possível se houver redução do componente neonatal da mortalidade infantil.

As infecções encabeçam a lista das causas de mortalidade neonatal, sendo responsáveis por 35% deste contingente, seguidas da prematuridade (28%), asfixia (23%) e outras afecções (14%). Ao longo das últimas décadas houve aumento significativo da cobertura pré-natal e de assistência ao parto, com consequente redução da prematuridade e asfixia, porém as taxas de

infecção permaneceram inalteradas (IPEA, 2010). Dentre os tipos de infecção, a sepse bacteriana é a causa mais frequente de óbitos, seguida por pneumonia, enterocolite necrosante e meningites que, em geral, também são causadas por bactérias (BERNER et al., 2002; SLADE et al., 2003; LAWN et al., 2005; COUTO et al., 2007).

Tendo em vista que a confirmação do diagnóstico de sepse é baseada em exames microbiológicos, principalmente em hemoculturas que exigem período de 24 a 72 horas para a liberação de resultados positivos (CHENG et al., 2008), na maior parte dos casos suspeitos de sepse a terapia antimicrobiana é iniciada rapidamente e de forma empírica, pois cada hora de atraso resulta em aumento de 7,6% na mortalidade (KUMAR et al., 2006). Por outro lado, é preciso considerar que esquemas terapêuticos inadequados estão associados ao surgimento de bactérias resistentes, ao aumento dos custos hospitalares devido ao tratamento medicamentoso e do tempo de internação, além da elevação das taxas de mortalidade em pacientes criticamente enfermos (KOLLEF et al., 1999).

A prevalência de sepse neonatal varia consideravelmente de acordo com os critérios usados para definição do diagnóstico (clínicos e/ou laboratoriais), a forma de apresentação (precoce ou tardia), o local do estudo (berçários anexos a maternidades, berçário de RN externos, unidades de terapia intensiva neonatal), a idade gestacional e o peso ao nascer (GOULART et al., 2006).

A mortalidade geral da sepse neonatal é bastante elevada, podendo chegar a 50%. Na sepse neonatal precoce, a mortalidade varia de 3 a 50%, e

na sepse tardia de 2 a 53% (CECCON et al., 1999; COSTA et al., 2001; HUDOME e FISHER, 2001; CUNHA et al., 2004; NIZET e KLEIN, 2006).

O diagnóstico precoce e de certeza da sepse neonatal é muito difícil, principalmente nos casos de sepse neonatal precoce devido à inexistência de um teste diagnóstico definitivo. Além disso, a hemocultura e demais culturas de fluidos biológicos apresentam baixa sensibilidade. Sendo assim, um resultado negativo em hemocultura não implica necessariamente a inexistência de sepse bacteriana no RN, já que a hemocultura possui baixa sensibilidade (GERDES, 1991; POLIN, 2003; SHAH e PADBURY, 2014).

Definição de sepse

As definições e critérios de classificação de doenças são elaborados inicialmente para adultos. Desta forma, a definição de sepse em adultos foi proposta em 1992 (BONE et al., 1992) e posteriormente, foram definidos alguns critérios diagnósticos específicos para a população pediátrica (NIEDERMAN et al., 2001). Em 2002, durante uma conferência que contou com a participação de 20 especialistas de cinco países, foi aprovado um documento adotado posteriormente pela Seção de Pediatria do Colégio Americano de Medicina Intensiva (ACCCM) e pela Academia Americana de Pediatria (GOLDSTEIN et al., 2005).

Os consensos internacionais para a definição de sepse recomendam a incorporação dos critérios diagnósticos usados para a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) (LEVY et al., 2003; CUNNEEN e CARTWRIGTH,

2004). SIRS é definida pela presença de pelo menos duas das seguintes alterações: hipotermia ou hipertermia; taquicardia ou bradicardia; taquipnéia; anormalidades no hemograma, tais como leucocitose ou leucopenia, índice neutrofílico elevado e/ou plaquetopenia (MATOS e VICTORINO, 2004; WYNN et al., 2014).

Além das alterações acima citadas, o encontro de hemocultura positiva confirmando a presença de uma infecção de corrente sanguínea (bacteremia) também faz parte da definição de sepse bacteriana e é usada como critério para classificar a sepse nas categorias de sepse comprovada, na qual existe associação de sinais e sintomas sugestivos de infecção com uma hemocultura positiva, e sepse provável ou clínica, na qual existem sinais e sintomas sugestivos de infecção acompanhados de, pelo menos, dois parâmetros laboratoriais alterados, porém a hemocultura é negativa (SUNDARAM et al., 2009).

Sendo assim, sepse é definida como SIRS em presença de infecção (comprovada ou provável). Sepse grave é a sepse associada à disfunção cardiovascular ou disfunção respiratória ou ainda, duas ou mais disfunções de órgãos e sistemas. Choque séptico é a sepse associada à falência cardiocirculatória (taquicardia, tempo de enchimento capilar menor que três segundos, hipotensão, necessidade de reposição volêmica e uso de substâncias vasopressoras (GOLDSTEIN et al., 2005; SHAH e PADBURY, 2014).

Definição de sepse neonatal

A sepse neonatal é classificada em precoce ou tardia, de acordo com a idade de início dos sintomas. Quando o início dos sintomas ocorre nos primeiros três dias de vida a sepse neonatal é chamada de precoce, sendo geralmente sistêmica e grave, muitas vezes fulminante, quase sempre relacionada a complicações obstétricas maternas, tais como amniorrexe prematura levando a corioamnionite, infecções urinárias e outras alterações obstétricas que podem desencadear o trabalho de parto prematuro (HICKEY e MCCracken, 1997; FREIJ e MCCracken, 1999; STOLL et al., 2002a).

A sepse neonatal tardia, com início após o terceiro dia de vida, constitui doença progressiva, de evolução mais insidiosa, com infecção inicialmente focal, tendo início frequentemente com uma meningite. A sepse neonatal tardia está associada a outros fatores de risco tais como, internação em unidades de terapia intensiva, tempo prolongado de hospitalização, antibioticoterapia de amplo espectro, intubação e ventilação assistida, uso de cateteres centrais, nutrição parenteral (LAWN et al., 2005).

Sistema imune do RN

Dados da literatura demonstram alta prevalência de infecções sistêmicas causadas por enterobactérias que contaminam o feto durante o parto. Alguns fatores de risco tais como o baixo peso ao nascer e imaturidade do sistema imune do RN, juntamente com a patogenicidade dos microrganismos, fazem com que os RN sejam mais suscetíveis às infecções

invasivas, especialmente os pré-termo (LEWIS e WILSON, 2011; CAREY et al., 2008).

Logo após o nascimento, os neutrófilos são menos responsivos às substâncias que promovem a quimiotaxia em comparação aos neutrófilos de lactentes e crianças. Apesar do número de monócitos e macrófagos ser normal, a atividade fagocítica dessas células, incluindo a diapedese, se encontra reduzida, comprometendo a resposta inflamatória. Células *Natural Killer* (NK) presentes em número normal, apresentam imaturidade funcional. Como não há transferência placentária de componentes do sistema complemento, existe deficiência principalmente dos fatores finais deste complexo no RN. Níveis de fibronectina também se encontram reduzidos, porém a produção da Proteína C Reativa (CRP) parece ser normal (LEWIS e WILSON, 2011).

O sistema imune adaptativo do RN se apresenta imaturo pela falta de estimulação antigênica durante a vida intrauterina, com pouca ou nenhuma memória imunológica. Essa falta de competência imune leva a maior suscetibilidade às infecções e pode justificar a demora no desenvolvimento de resposta imune específica (JURETIC´ et al., 2000; JURETIC´ et al., 2001; PALMEIRA et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, a sepse bacteriana lidera as causas infecciosas que levam ao óbito no período neonatal. A proporção de casos de sepse tardia associados a bactérias Gram-positivas tem aumentado progressivamente ao longo das últimas duas décadas, sendo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Enterococos* as bactérias

responsáveis por cerca de 30 a 50% dos casos (STOLL et al., 2002b). Recentemente, MEIRELES e colaboradores (2011) encontraram positividade de 33,3% nas hemoculturas dos casos de sepse neonatal tardia, sendo as bactérias mais frequentemente isoladas *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus aureus*.

Simultaneamente ao aumento progressivo do isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Enterococos* em casos de sepse neonatal, houve redução do contingente de infecções causadas pelos *Streptococcus* do grupo B (*S. agalactiae*) devido ao rastreamento de gestantes a partir da 35^a semana de gestação, e ao uso profilático de antibióticos naquelas com isolamentos positivos. Quando não existe rastreamento/profilaxia materna, como ocorre em nosso meio, estima-se que 1 a 2% dos recém-nascidos filhos de mães colonizadas por *Streptococcus* do grupo B irão desenvolver quadro infeccioso, sendo as apresentações clínicas mais frequentes: sepse, osteomielite, artrite séptica, pneumonia e meningite, podendo acarretar sequelas neurológicas, visuais e auditivas graves em 15 a 30% dos recém-nascidos acometidos, ou levar ao óbito (FIOLO et al., 2012; SHAH e PADBURY, 2014).

Com relação à sepse neonatal precoce, bactérias Gram-positivas são frequentemente isoladas nos RN, representando 70,2% do total: *Staphylococcus coagulase negativa* em 47,9% dos casos; *Staphylococcus aureus* em 7,8%; *Enterococcus spp.* em 3,3%; *Streptococcus* do grupo B (*agalactiae*) em 2,3% e outras bactérias Gram-positivas em 8,9% dos casos. Bactérias Gram-negativas representam 17,6% do total de casos de sepse neonatal precoce, com a seguinte distribuição: *Escherichia coli* em 4,9% dos

casos; *Klebsiella spp* em 4,0%; *Pseudomonas spp* em 2,7%; *Enterobacter spp* em 2,5%; *Serratia spp* em 2,2% e outras bactérias Gram-negativas em 1,4% dos casos (CUNHA et al., 2004; CAREY et al., 2008). Sendo assim, nestes estudos, 87,8% dos episódios de sepse neonatal foram causados por agentes bacterianos.

Em estudo prospectivo multicêntrico realizado em Belo Horizonte entre os anos de 1993 e 2002 (COUTO et al., 2007), foram avaliados 6.243 RN de seis unidades de terapia intensiva neonatal, com um total de 3.603 casos de infecção, sendo que 46% deles foram devidos a infecções de corrente sanguínea, e 89% das infecções de corrente sanguínea foram causadas por bactérias. Dentre os casos nos quais foram identificadas bactérias, as Gram-negativas representaram 51,6%, com maior frequência de *Klebsiella spp* (26,6%), *Escherichia coli* (9,7%) e *Pseudomonas spp* (6,4%). As bactérias Gram-positivas corresponderam a 37,4% das infecções bacterianas, sendo as mais frequentes *Staphylococcus coagulase negativa* (20,8%) e *Staphylococcus aureus* (13,4%).

Avaliação da sepse neonatal bacteriana

A avaliação de pacientes com sepse bacteriana requer a combinação de dados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico de infecção bacteriana pode ser particularmente difícil em RN, notadamente nos pré-termo, pelo fato dos sinais e sintomas poderem ser confundidos com outras situações clínicas tais como alterações metabólicas (hipoglicemia) ou doenças respiratórias, como a pneumonia (WITEK e CUSACK, 1994).

Inúmeros estudos têm verificado que a contagem de leucócitos totais, o número de formas jovens sobre o total de neutrófilos (índice neutrofilico), a contagem de plaquetas e as concentrações séricas da Proteína C Reativa (CRP) solicitados rotineiramente na investigação de processos inflamatórios e infecciosos possuem baixa sensibilidade e especificidade, porém até o presente, constituem as ferramentas laboratoriais disponíveis para o diagnóstico de sepse neonatal (BERNARD et al., 2001; PINHEIRO et al., 2007).

O índice neutrofilico e a CRP são considerados marcadores tardios e pouco úteis para o diagnóstico da sepse neonatal precoce (PINHEIRO et al., 2007). A CRP faz parte do grupo de proteínas de fase aguda cuja concentração varia de acordo com o estado de inflamação/ infecção do paciente. É sintetizada no fígado e está presente em ínfimas quantidades em soro e plasma de indivíduos saudáveis. A CRP aumenta rapidamente após a instalação de um processo inflamatório ou infeccioso (4 a 8 horas), podendo atingir níveis de até 500 mg/l (valor de referência ≤ 5 mg/l). Apesar de não ser capaz de diferenciar processos inflamatórios de infecciosos, a CRP aumenta mais rapidamente e de maneira mais significativa quando comparada à velocidade de hemossedimentação (VHS) e ao leucograma. Após a cura do paciente, os níveis de CRP também retornam ao normal mais rapidamente que os outros parâmetros laboratoriais (BERNARD et al., 2001).

Outros marcadores de fase aguda tais como a procalcitonina são capazes de diferenciar SIRS de sepse em crianças (ARKADER et al., 2006), porém ainda não fazem parte da rotina diagnóstica de hospitais públicos. Ademais, existem citocinas pró-inflamatórias que se encontram alteradas em processos inflamatórios e infecciosos, mas ao menos por enquanto, são

investigadas apenas em projetos de pesquisa (CECCON et al., 2006; MUKAI et al., 2006; MAGRINI et al., 2014).

Dentre os testes diagnósticos empregados atualmente, os isolamentos em cultura de sangue periférico (hemoculturas) ainda constituem o teste de referência para o diagnóstico de sepse. Entretanto, o cultivo requer tempo significativo para a definição do diagnóstico, com excelente especificidade, porém baixa sensibilidade. Além disso, a profilaxia antimicrobiana para prevenção da infecção causada por *Streptococcus* do grupo B no final da gestação e durante o parto, e a coleta de pouco volume de sangue do RN são citadas como possíveis causas da baixa frequência de resultados positivos (MEIRELES et al., 2011).

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos RN com suspeita de sepse são essenciais para melhorar o prognóstico da sepse neonatal, que é ainda bastante reservado. Desta forma, um teste diagnóstico que associe acurácia e rapidez, utilize pouco material biológico e seja capaz de diferenciar de forma inequívoca RN infectados dos não infectados, particularmente no período neonatal precoce, causaria grande impacto na prática clínica (GUEMBE et al., 2013).

Diagnóstico molecular da sepse

Como os procedimentos diagnósticos utilizados atualmente para confirmar a presença de sepse (isolamentos em cultura de sangue periférico) exigem um período mínimo de 72 horas para a identificação da bactéria, a

terapia antimicrobiana é em geral iniciada empiricamente (CHENG et al., 2008). Entretanto, estudos comparando o desempenho de hemoculturas e testes moleculares para a detecção de microrganismos associados à sepse têm destacado que o diagnóstico molecular é significativamente mais rápido e mais sensível quando são empregadas técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (XU et al., 2003; REIER-NILSEN et al., 2009).

Ensaio moleculares com o uso de técnicas derivadas da PCR têm surgido como importantes ferramentas para a detecção de microrganismos, podendo contribuir para o diagnóstico precoce devido a maior sensibilidade, mesmo quando os alvos da amplificação se encontram presentes na amostra biológica em quantidades baixas, entre 10 e 100 Unidades Formadoras de Colônia - UFC/mL (CUCHACOVICH, 2006).

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos derivados da PCR são rápidos e têm sido empregados com sucesso no diagnóstico de várias doenças infecciosas, incluindo infecções bacterianas, virais, fúngicas e causadas por protozoários (JORDAN et al., 2005; CHAN et al., 2009; LIU et al., 2014).

Duas versões da PCR são bem conhecidas: a PCR convencional (teste qualitativo) e a PCR em tempo real (qPCR - teste quantitativo) (NOVAIS e ALVES, 2004; NASCIMENTO et al., 2011).

A possibilidade de monitorar o incremento do número de cópias na qPCR revolucionou o processo de detecção de fragmentos de DNA e de DNA complementar (cDNA), este último para a análise de expressão gênica ou para a detecção de RNA viral. A qPCR realiza a detecção e a quantificação de

ácidos nucleicos de forma simultânea, mais sensível, precisa e reprodutível que as amplificações convencionais. Neste tipo de amplificação, a aquisição de dados para o cálculo do incremento do número de cópias da sequência alvo é feita de acordo com a fluorescência emitida, e a aferição tem início quando a amostra entra na fase exponencial de amplificação, permitindo, todavia, o constante monitoramento dos produtos de amplificação após o término de cada ciclo, ao longo de toda a reação. A emissão de fluorescência gera um sinal e os valores da fluorescência são obtidos e armazenados a cada ciclo, sendo diretamente proporcionais à quantidade de produto amplificado. Esta técnica apresenta maior sensibilidade que as amplificações convencionais, uma vez que a substância fluorescente, por exemplo, o *SybrGreen*, é capaz de se ligar a todas as moléculas que contenham duplas fitas existentes na reação (NOVAIS e ALVES, 2004; NASCIMENTO et al., 2011).

A qPCR também pode ser considerada mais específica que as amplificações convencionais, porém apresenta custo mais elevado, principalmente quando são utilizadas sondas de hidrólise que se hibridizam à sequência alvo de amplificação, por exemplo, nas reações com compostos fluorescentes e sondas do tipo TaqMan®. Na qPCR a amplificação e a detecção de DNA são realizadas simultaneamente em sistema fechado, dispensando procedimentos adicionais como a eletroforese dos produtos de amplificação em géis de agarose e a visualização do material amplificado que emprega compostos carcinogênicos (brometo de etídeo, *Gel Red*, *SYBR safe*). Com a eliminação dessas etapas, os resultados são obtidos com maior rapidez em comparação à PCR convencional, maior sensibilidade, precisão, reprodutibilidade e acurácia, melhor controle de qualidade do processo,

menor risco de contaminação (*carry over*) desde que o profissional seja experiente, além da eliminação do contato do operador com substâncias que se intercalam ao DNA (NOVAIS e ALVES, 2004; FERREIRA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2011).

O uso da qPCR na detecção e identificação de bactérias constitui uma área de pesquisa em expansão, tendo sido descritas aplicações relativas à detecção de *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* e *Neisseria gonorrhoeae*. Um crescente volume de artigos científicos demonstra a utilidade da qPCR na área de microbiologia, com vantagens também em relação aos ensaios baseados na detecção de antígenos ou anticorpos (ESPY, 2006). Ademais, técnicas baseadas na PCR permitem a análise de mutações e o monitoramento de resistência de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, dentre outras, a antibióticos (VALASEK e REPA, 2005).

Atualmente, quando uma amostra chega ao laboratório clínico é necessário primeiro que a bactéria presente na amostra cresça em meio de cultura, somente assim a mesma poderá ser identificada. Ainda, para determinar o espectro de sensibilidade aos antibióticos de cada cepa, a bactéria deve crescer em uma placa contendo meio de cultura na presença de pequenos discos de papel impregnados de antibióticos, ou seja, a identificação associada ao antibiograma demorará no mínimo 72 horas para ser concluída. A adição da qPCR ao conjunto de exames realizados para o diagnóstico de sepse reforçaria a necessidade da prescrição de antibióticos nos casos positivos, ou, por outro lado, possibilitaria a exclusão do

diagnóstico de infecção se o resultado for negativo juntamente com uma hemocultura negativa (LIU et al., 2014). Um dos principais impactos seria a minimização da utilização em massa de antibióticos de amplo espectro em casos desnecessários, reduzindo os custos associados e a emergência de bactérias resistentes devido ao uso indiscriminado de antibióticos. Além disso, poderia auxiliar na detecção precoce de cepas multirresistentes a antibióticos, evitando sua disseminação (GARCIA, 2003; WOO et al., 2008; OZKAN et al., 2014).

As bactérias de crescimento lento e/ou não cultiváveis também se beneficiaram das técnicas de qPCR para sua identificação e, como exemplos, podem ser citadas: *Anaplasma phagocytophila*, *Bartonella henselae*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia spp*, *Legionella spp*, *Mycoplasma pneumonia*, *Chlamydophila pneumoniae*, assim como bactérias para as quais ainda não existem métodos de identificação, como a *Tropheryma whipplei*. A qPCR também tem sido utilizada para a identificação de agentes causadores de pneumonias comunitárias, tais como: *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella spp.*, *Streptococcus pneumoniae* e de agentes causadores da meningite: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (ESPY, 2006).

Nos últimos anos, a qPCR surgiu como uma alternativa bastante atraente devido à capacidade de amplificação e detecção simultânea de quantidades muito pequenas de sequências específicas de ácidos nucleicos. Na prática clínica, a qPCR poderia ser empregada para a avaliação da carga bacteriana, viral (HIV, HCV), parasitária, tanto para o diagnóstico, quanto

para o monitoramento do tratamento, determinação da resistência a antibióticos e, até mesmo, para a avaliação de prognóstico em indivíduos portadores de neoplasias malignas (NASCIMENTO et al., 2011; SHAH e PADBURY, 2014).

Dentre todas as sequências-alvo de amplificação para a avaliação de infecções bacterianas, incluindo os casos de sepse neonatal, a mais utilizada tem sido a 16S rDNA. Para que possamos compreender a natureza destas amplificações, alguns conceitos precisam ser esclarecidos. Todos os ribossomos são constituídos por duas subunidades e cada subunidade contém um rRNA (ácido ribonucleico ribossomal), além de várias proteínas. A unidade de medida dos ribossomos é o Svedberg (S), que mede a velocidade de sedimentação da partícula após centrifugação. Procariotos possuem ribossomos 70S, constituídos de uma unidade 30S (16S rRNA e 21 proteínas) e outra 50S (5S rRNA, 23S rRNA e 34 proteínas). Portanto, o RNA ribossomal 16S (16S rRNA) é um componente da subunidade 30S dos ribossomos de procariotos. Vários tipos de 16S rRNA podem existir em uma única bactéria (KOLBERT e PERSING, 1999; CLARRIDGE, 2004; JANDA e ABBOTT, 2007).

Todas as bactérias possuem um gene que codifica a região 16S do RNA ribossomal (rRNA), considerado um marcador universal bacteriano. O gene que codifica a porção 16S rRNA é chamado de 16S rDNA, possui cerca de 1.500 pares de base, e é usado em estudos filogenéticos por ser altamente conservado entre diferentes espécies de bactérias. Além disso, as sequências que codificam o gene 16S rDNA contêm regiões hipervariáveis que são específicas de algumas espécies, sendo utilizadas para a identificação e

diferenciação das mesmas (KOLBERT e PERSING, 1999; CLARRIDGE, 2004; SHANG et al., 2005; OHLIN et al., 2008).

O sequenciamento do gene 16S rDNA tornou-se o método de referência para a identificação de bactérias, sendo capaz de reclassificá-las e identificar novas espécies ou gêneros, incluindo aquelas que nunca foram cultivadas. Outra vantagem do gene 16S rDNA é que ele é pequeno, com cerca de 1.500 pares de base, tornando seu sequenciamento rápido, com custo relativamente baixo (ZUCOL et al., 2006; OHLIN et al., 2008).

Além do sequenciamento do gene 16S rDNA, iniciadores selecionados neste gene têm sido empregados em qPCR com marcação pelo *SybrGreen*, constituindo atualmente a metodologia de melhor custo efetividade para a identificação e quantificação de bactérias em amostras biológicas. Essa estratégia tem sido empregada para detectar infecções bacterianas na prática clínica, e a utilização da qPCR faz com que se possa ir além da identificação da infecção bacteriana, sendo possível o acompanhamento da queda do número de cópias da sequência alvo após a instalação da terapêutica antibacteriana (GREISEN et al., 1994; JORDAN e DURSO, 2000; SHANG et al., 2005; ZUCOL et al., 2006).

1.1. Justificativa do estudo

A presente pesquisa foi proposta com o intuito de complementar a investigação laboratorial da sepse neonatal, porém desta vez desenvolvendo um método rápido, específico, com excelente limiar de detecção para o

diagnóstico de infecções bacterianas neonatais, uma vez que a sepse bacteriana pode ser difícil de diagnosticar em RN, apresentando baixa positividade em culturas de sangue periférico.

Quando existe suspeita de sepse, os RN são hospitalizados e recebem antibioticoterapia empírica, enquanto se aguarda os resultados da cultura de sangue periférico. Considerando que na maior parte dos casos de sepse neonatal bacteriana, os resultados das hemoculturas são negativos, uma qPCR poderia constituir ferramenta útil não apenas para a confirmação do diagnóstico de sepse neonatal, como também para a avaliação do tratamento por meio do monitoramento da queda do número de cópias da sequência alvo, contribuindo para a redução dos custos hospitalares, do tempo de internação e do uso desnecessário de antibióticos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Geral

Desenvolver uma técnica de amplificação quantitativa (qPCR) para a detecção de fragmento do gene 16S rDNA universal de bactérias em amostras de sangue de recém-nascidos com suspeita de sepse e hemocultura positiva ou negativa.

Específicos

- 1- Desenvolver uma técnica de amplificação quantitativa (qPCR) com *SybrGreen* para a detecção de fragmento do gene 16S rDNA de bactérias;
- 2- Determinar e comparar a frequência de resultados positivos nas hemoculturas e na qPCR nos casos suspeitos de sepse neonatal;
- 3- Avaliar se a qPCR é capaz de monitorar o tratamento dos RN com sepse confirmada e sepse clínica.

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O presente projeto de pesquisa obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM-UFMT, processo nº 587/CEP-HUJM/08 em 04/02/2009 e da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC/FMUSP (CAPPesq) nº 0889/09 em 21/10/2009. Os procedimentos de coleta foram realizados após a apresentação minuciosa do projeto e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelas mães ou responsáveis pelos recém-nascidos do grupo de estudo e do grupo controle (Anexos III, IV e V).

3.2. Casuística

3.2.1. Centros participantes

Participaram dessa pesquisa a Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário Júlio Müller/ UFMT, Cuiabá que possui 10 leitos; a Unidade de Terapia Intensiva do Hospital e Maternidade Santa Helena do SUS, Cuiabá, com 20 leitos, e a Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal/Instituto da Criança do Hospital das Clínicas – FMUSP, São Paulo, que conta com 20 leitos.

A coleta de material biológico foi realizada no período de 04 de fevereiro a 30 de julho de 2012 nos três centros participantes.

3.2.2. Grupo de estudo

O grupo de estudo foi composto por 73 recém-nascidos (pré-termo e termo). Para serem incluídos neste grupo, os RN deveriam preencher no mínimo dois critérios clínicos de sepse e dois critérios laboratoriais de sepse.

3.3. Critérios clínicos para diagnóstico de sepse neonatal

Foi adotada a definição do último consenso de sepse realizado em San Antonio (Texas), EUA, e publicado por GOLDSTEIN et al. (2005), conforme descrição abaixo:

- **Instabilidade térmica:** hipotermia (temperatura < 36°C) ou hipertermia (temperatura > 38°C);
- **Alterações respiratórias:** apnéia, taquipnéia (frequência respiratória superior a 50 irp/min.); aumento progressivo da necessidade de oxigênio;
- **Alterações cardiovasculares:** aumento ou diminuição da frequência cardíaca (> 180 batimentos por minuto ou < 100 batimentos por minuto), perfusão periférica lenta, enchimento capilar prolongado (> três segundos), hipotensão arterial ou necessidade de aumento da dose de drogas inotrópicas para manter a pressão arterial adequada;
- **Alterações do estado geral:** letargia ou irritabilidade;
- **Alterações gastrintestinais:** resíduos gástricos, vômitos, distensão abdominal, sangramento nas fezes;
- **Alterações cutâneas:** petéquias, icterícia;

-Alterações neurológicas: abaulamento de fontanela, convulsões.

3.4. Critérios laboratoriais para o diagnóstico de sepse neonatal

3.4.1. Alterações no hemograma realizado em contador de células automatizado (ABX Pentra 120, Horiba®, Japan). As alterações do hemograma seriam a presença de leucocitose (número de leucócitos $\geq 20.000/\text{mm}^3$) ou leucopenia (número de leucócitos $\leq 5.000/\text{mm}^3$); presença de neutrofilia (valor de referência do número absoluto de neutrófilos varia de acordo com a idade pós-natal); presença de neutropenia (número absoluto de neutrófilos inferior a $1.000/\text{mm}^3$); índice neutrofílico $> 0,2$; presença de plaquetopenia (contagem de plaquetas inferior a $150.000/\text{mm}^3$) (MANROE, 1979; SCHMUTZ et al., 2008).

3.4.2. Positividade da cultura de sangue periférico (hemocultura): foi considerado um caso de sepse neonatal confirmado qualquer RN com positividade de hemocultura em um ou mais tempos de análise. Os RN que apresentaram as culturas negativas, porém preenchiam os critérios de inclusão do estudo foram alocados no grupo de sepse clínica (provável).

Após assepsia realizada de acordo com o protocolo para coleta de hemocultura vigente nas três instituições participantes, 1,0 ml de sangue foi obtido de punção de veia periférica e usado para a realização da cultura de organismos aeróbicos e anaeróbicos em equipamento automatizado BACT ALERT, modelo 3D, marca bioMérieux®, com posterior identificação em equipamento automatizado Vitek 2, bioMérieux®. A terceira amostra de

sangue para a realização da hemocultura do sétimo dia de vida do RN, não foi colhida apenas nos casos de transferência do paciente para outro hospital ou óbito.

3.4.3. Elevação das concentrações séricas da Proteína C Reativa (CRP)

No tempo zero do estudo (dia da suspeita clínica de sepse), bem como 48 horas após a introdução da antibioticoterapia e no sétimo dia após a introdução da antibioticoterapia, foi realizada coleta de 1,0 ml de sangue para a determinação das concentrações séricas da Proteína C Reativa (CRP), porém, essas coletas não foram feitas especificamente para este estudo, isto é, a CRP faz parte da rotina assistencial dos RN com sepse, tanto para estabelecer o diagnóstico, quanto para controle do tratamento e suspensão do mesmo, nos três centros participantes do estudo.

A determinação das concentrações séricas de CRP foi realizada por turbidimetria (kit PCR ultrassensível turbitest AA – Wiener, Argentina), sendo que o fabricante recomenda que sejam consideradas normais concentrações de CRP ≤ 5 mg/l. Para o presente estudo, foram consideradas elevadas concentrações de CRP > 10 mg/l.

3.5. Critérios de Exclusão

- Procedimentos cirúrgicos no recém-nascido;
- Recém-nascidos com asfixia neonatal grave, definido pelo Apgar no 5º minuto inferior a 4 (Academia Americana de Pediatria, 1992);
- Presença de má formação congênita;
- RN com infecções congênitas;

3.6. Coleta de sangue do grupo de estudo

As coletas de sangue foram precedidas de assepsia de acordo com protocolo para a realização de hemoculturas (CLSI, 2007). Os tempos de coleta foram os seguintes:

- **Tempo zero:** momento do diagnóstico de sepse baseado na presença de, ao menos, dois sinais/sintomas sugestivos de sepse e duas alterações laboratoriais, necessariamente antes da introdução da antibioticoterapia. Foram obtidos 2,0 ml de sangue, sendo 1,0 ml em tubo com EDTA para a realização dos testes moleculares e 1,0 ml para a hemocultura.
- **Tempo 48 horas:** dois dias após a introdução da antibioticoterapia. Foram obtidos 2,0 ml de sangue, sendo 1,0 ml em tubo com EDTA para a realização dos testes moleculares e 1,0 ml para a hemocultura.

- **Tempo 7 dias:** uma semana após a introdução da antibioticoterapia. Foram obtidos 2,0 ml de sangue, sendo 1,0 ml em tubo com EDTA para a realização dos testes moleculares e 1,0 ml para a hemocultura.

3.7. Coleta de sangue dos grupos controle

3.7.1. Grupo controle de recém-nascidos: este grupo controle foi composto por 56 RN (12 pré-termo e 44 termo) oriundos de gestações sem intercorrências, portanto apresentando risco muito baixo de infecção. Foram obtidas amostras de sangue coletadas em tubo com EDTA diretamente da placenta (sangue de cordão), após assepsia realizada com álcool 70%. Neste grupo, a coleta de sangue da placenta serviu à realização dos seguintes exames: hemocultura, hemograma, contagem de plaquetas, CRP e 1,0 ml de sangue em tubo com EDTA para a realização da qPCR.

3.7.2. Grupo controle de São Paulo: este grupo foi formado por 30 voluntários, adultos jovens saudáveis que foram submetidos à coleta de 3,0 ml de sangue periférico após lavagem da região a ser puncionada com água e sabão, seguida de assepsia realizada com clorexidina e álcool 70%. O digluconato de clorexidina alcoólica a 0,5% é um antisséptico químico, com ação antifúngica e bactericida, capaz de eliminar tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Possui também ação bacteriostática, inibindo a proliferação bacteriana (ARAUJO, 2012). Estas amostras de sangue foram submetidas apenas a qPCR.

3.7.3. Grupo controle de Cuiabá: este grupo foi formado por 30 voluntários, adultos jovens sadios que foram submetidos à coleta de 3 ml de sangue periférico após limpeza da região a ser puncionada com água e sabão neutro e posterior assepsia realizada somente com álcool 70%. Estas amostras de sangue foram submetidas apenas a qPCR.

3.8. Extração de DNA a partir de sangue periférico

O procedimento de extração de DNA foi realizado no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, IMT-USP, utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante, com a adição de etapa específica para a extração de DNA bacteriano, uma vez que é conhecido o fato das bactérias, notadamente as Gram positivas, apresentarem uma parede celular mais rígida e conseqüentemente mais difícil de ser rompida. A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída de uma camada espessa composta por peptidoglicano, responsável pela sua rigidez. Essa característica faz com que a quebra da parede celular nas Gram-positivas apresente maior dificuldade, sendo necessário o emprego da enzima lisozima (NOGUEIRA et al., 2004; ZUCOL et al., 2006).

Resumidamente, todo o material descartável foi autoclavado, todos os reagentes do kit foram filtrados em filtros 0,22 µm (Millipore, USA) e o manipulador usou avental, luvas estéreis, máscara e gorro para executar o procedimento. As micropipetas, após limpeza exaustiva com hipoclorito de

sódio diluído e posteriormente com álcool 70% foram submetidas a dois ciclos de descontaminação de 90 segundos em luz ultravioleta (GS, Gene Linker, UV Chamber, BioRad®).

A extração de DNA foi realizada de acordo com o seguinte protocolo. A um volume de 200 µL de sangue total colhido em tubo com EDTA foram acrescentados 20 µL da enzima lisozima a 20 mg/mL (Sigma-Aldrich) e 20 µL da enzima proteinase K (Sigma-Aldrich) a 20 mg/mL, além de 200 µL do tampão de lise “AL” do kit QIAamp. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-seco por 30 minutos a 37°C para a ação da lisozima e, a seguir, 10 minutos a 56°C para a ação da proteinase K. Em seguida, foram acrescentados a esta solução, 200 µL de etanol absoluto e a mistura foi homogeneizada. Seiscentos microlitros foram transferidos para a coluna do kit QIAamp e, em seguida, foi realizada centrifugação de 1 minuto a 6.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e, em seguida, foram acrescentados 500 µL do tampão *wash 1* e a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 6.000 x g. O sobrenadante foi desprezado novamente e foram acrescentados a esta coluna 500 µL do tampão *wash 2*. A centrifugação foi repetida novamente por 3 minutos a 13.000 x g e o sobrenadante desprezado. A esta coluna foram acrescentados 100 µL do tampão de eluição “AE” e a mistura foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, foi centrifugada por 1 minuto por 6.000 x g. Um microlitro do sobrenadante contendo DNA foi usado para a quantificação e o restante da amostra de DNA foi alíquotada para evitar várias aberturas e fechamentos dos microtubos, uma vez que a amplificação de fragmento do gene 16S rDNA requer manipulação em condições estéreis. Todas as alíquotas de DNA foram

armazenadas a -20°C até o momento do uso.

A estimativa da concentração de DNA nas amostras extraídas foi realizada por espectrofotometria UV (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, EUA) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. O índice de pureza foi determinado por meio da razão 260nm/280nm e considerado adequado na faixa de 1,8-2,0.

3.9. Amplificação com iniciadores do gene da β -actina humana

Todas as amostras de DNA, tanto do grupo de estudo quanto dos controles, foram submetidas à amplificação com iniciadores (β 1 e β 2) oriundos do gene que codifica a proteína β -actina humana, descritos por NAKAJIMA-ILJIMA et al. (1985). Estes iniciadores amplificam fragmento de 540 pares de bases (pb) e servem para atestar a qualidade do DNA extraído e a inexistência de inibidores da amplificação. Resumidamente, em um volume final de reação de 25 μ L, foram empregados 200 μ M de dNTP; 0,2 μ M dos iniciadores, 2,5 U da Taq DNA polimerase (Fermentas, Thermo Scientific, EUA), 1,5mM do $MgCl_2$ (Fermentas, Thermo Scientific, EUA). As sequências dos iniciadores, bem como as condições de amplificação estão descritas na tabela abaixo.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores e condições de amplificação do gene de β -actina humana.

Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Ciclos		
		D	A	E
$\beta 1$	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	95°C	45°C	72°C
$\beta 2$	CTCCTTATTGTCACGCACGATTTC	1 min	1 min	1 min

D – desnaturação; A – Hibridização (*annealing*); E – Extensão (polimerização); min. – minuto.

3.10. Seleção de iniciadores do gene 16S rDNA bacteriano

Os iniciadores *forward* 5'- CAGCTCGTGTCTGTGAGATGT-3' e *reverse* 5'- CGTAAGGGCCATGATGACT- 3' nos foram sugeridos pelo Laboratório de Bacteriologia do IMT-USP. Estes iniciadores amplificam fragmento de 150 pares de base (bp) de uma região conservada do gene 16S rDNA de bactérias, e foram capazes de amplificar todas as bactérias que causam infecções em RN no âmbito do Complexo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

3.11. Padronização da PCR em tempo real (qPCR)

As reações foram realizadas em equipamento ABI *StepOne Real Time* PCR System (*Applied Biosystems*®) instalado no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT-USP.

A mistura de reagentes para a realização das amplificações continha QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix, enzima Hot Start Taq Plus DNA, QuantiFast SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix, SYBR Green (QIAGEN) e os iniciadores *forward*: 5'-CAGCTCGTGTCTGTGAGATGT-3' e *reverse*: 5'-

CGTAAGGGCCATGATGACT- 3' selecionados na sequência do gene 16S rDNA de bactérias que amplificam fragmento de 150 bp, água livre de RNase (QIAGEN) e 100 ng de DNA genômico extraído das amostras de sangue de RN pré-termo e termo, e 100 ng de DNA genômico das amostras controle, além de amostras nas quais o DNA é substituído por água (*non template*).

Para cada lote de amostras testadas (placa de 48 orifícios) foi construída uma curva padrão de controles positivos nas seguintes concentrações (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 UFC/mL), além de dois controles negativos (água estéril e DNA de RN sem nenhum processo infeccioso). Todas as amostras foram testadas em duplicata.

O sistema ABI *StepOne* verifica o sinal fluorescente a cada segundo e calcula automaticamente o *mean baseline*, ou seja, o “sinal de fundo” ou “ruído de fundo” da fluorescência gerada durante os ciclos iniciais (3 a 15) da PCR em tempo real. Com base nessa fluorescência de fundo é possível detectar a fluorescência gerada pelo acúmulo de DNA amplificado. O *Ct* (*threshold cycle*) é definido como o ciclo em que a fluorescência excede estatisticamente o *mean baseline*, sendo proporcional ao número de moléculas de DNA alvo presentes na amostra, o que equivale à mesma quantidade de produtos amplificados presentes no tubo.

3.12. Análise estatística

Após a aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, verificou-se que o comportamento dos valores de carga bacteriana nos grupos (com exceção do grupo controle de Mato Grosso) não apresentou distribuição

normal, conseqüentemente foram calculadas as medianas das cargas bacterianas obtidas na qPCR para todos os grupos.

As comparações das medianas dos valores de carga bacteriana entre dois grupos foram realizadas com o teste de Mann-Whitney, enquanto que a comparação entre vários grupos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis.

A frequência de resultados positivos obtidos com as hemoculturas e a qPCR foi calculada e a concordância ou discordância entre estes resultados foi determinada por meio do teste de McNemar.

O programa estatístico empregado foi o Graph Pad PRISM, versão 6.0. Para todos os testes estatísticos aplicados nesta pesquisa foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características das mães do grupo de estudo

Com relação às mães, foram coletados os seguintes dados: idade, escolaridade/profissão, procedência, raça/cor, nº de consultas no pré-natal, diagnósticos maternos e no parto, nº de gestações/partos/abortos, presença e tempo de amniorrexe prematura, tabagismo/etilismo, uso de antibióticos, uso de anti-inflamatórios ou outra medicação imunossupressora. Os dados estão apresentados no Anexo I.

Foram obtidos dados de 69 mães do total de 73 do grupo de estudos. Em relação à gestação 37 fizeram parto cesáreo (37/69 - 53,62%), a média do número de gestações foi de 2,56, a paridade média foi de 2,14 e oito mães sofreram abortos (8/69 - 11,59%). Os diagnósticos maternos mais frequentes foram amniorrexe prematura em onze gestantes (11/69 - 15,94%), infecção do trato urinário em sete gestantes (7/69 - 10,14%); e tanto o descolamento prematuro de placenta, quanto a doença hipertensiva específica da gravidez ocorreram em três casos (3/69 - 4,34%).

Em relação à idade, raça/cor, procedência, tabagismo/etilismo, apenas 41 das 73 mães (56,16%) tiveram os dados coletados, pois para as demais, os dados não constavam no prontuário. Dentre estas 41 gestantes, a idade média foi de 20 anos, todas eram da cor parda, 24 eram procedentes da capital, Cuiabá (24/41 - 58,53%), e as restantes do interior do Estado. Dados em relação ao tabagismo/etilismo não foram encontrados nos prontuários em número significativo. Para apenas 30 gestantes das 73 foram obtidos dados relativos ao grau de instrução, sendo que 11 delas (11/30 -

36,66%) tinham 1º grau incompleto, sete (7/30 - 23,33%) o 1º grau completo, três (3/30 - 10,0%) o 2º grau incompleto, nove (9/30 - 30,0%) o 2º grau completo, e 15 (15/30 - 50,0%) declararam como profissão prendas domésticas.

4.2. Análise dos RN do grupo de estudo e do grupo controle

Foram obtidos os seguintes dados dos prontuários dos RN: idade gestacional materna, tipo de parto, peso ao nascer, escore de Apgar, presença de sinais e sintomas de sepse, alterações de exames laboratoriais, agente etiológico isolado na hemocultura, uso de antibióticos pelos RN, evolução clínica (alta ou óbito).

Dos 73 recém-nascidos com suspeita de sepse incluídos no estudo, 21 (21/73; 28,76%) eram de termo (idade gestacional $\geq$ 37 semanas) e 52 (52/73; 71,23%) eram pré-termo (idade gestacional $<$ 37 semanas). O cálculo da idade gestacional utilizou o método de Capurro em sala de parto (PEREIRA et al., 2013).

As coletas de sangue realizadas no tempo zero (no momento do diagnóstico de sepse, previamente à introdução de antibióticos), 48 horas e sete dias após o início da antibioticoterapia, perfizeram 200 amostras sanguíneas no grupo de estudo. Do total de 73 RN, 69 apresentaram sepse neonatal precoce (início dos sintomas até 72 horas de vida) e quatro apresentaram sepse neonatal tardia (início dos sintomas após 72 horas de vida).

As alterações laboratoriais encontradas nos 73 RN pertencentes ao grupo de estudo foram apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos 73 RN do grupo de estudo em relação às alterações laboratoriais.

Variáveis	RNPT		RNT		Total (%)
	N=52		N=21		
	N	%	N	%	
Leucocitose	03	5,76	03	14,28	06 (8,21%)
Leucopenia	24	46,15	03	14,28	27 (36,98%)
Neutrofilia	34	65,38	11	52,38	45 (61,64 %)
Neutropenia	14	26,92	07	33,33	21 (28,76%)
Plaquetopenia	29	55,76	09	42,85	38 (52,05%)
CRP > 10 mg/l	26	50,0	11	52,38	37 (50,68%)

N: Número; CRP: Proteína C Reativa; RNPT: Recém-Nascido Pré-termo; RNT: Recém-Nascido de Termo.

O grupo controle de RN foi composto por 56 RN, sendo 44 RNT e 12 RNPT todos oriundos de gestações sem intercorrências no pré-natal, com risco muito baixo de infecção. Dos RN deste grupo foi coletada apenas uma amostra de sangue do cordão para a realização dos mesmos exames laboratoriais do grupo de estudo. Originalmente, este grupo era composto por 68 RN, porém 12 deles apresentaram resultado positivo nas hemoculturas, e por este motivo foram excluídos do grupo. Infelizmente, estes casos não tiveram o agente etiológico identificado. Assim que

começaram a apresentar crescimento bacteriano, as amostras foram descartadas e os casos excluídos do grupo controle.

As características de todos os RN são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Características dos recém-nascidos do grupo de estudo e do grupo controle.

Variáveis			Grupo de estudo		Grupo Controle	
Idade no início dos sintomas						
(horas) Média ± DP			31,20 ± 0,46		Não se aplica	
Classificação do RN			RNPT	RNT	RNPT	RNT
N (%)			52 (71,24%)	21 (28,76%)	12 (21,42%)	44 (78,58%)
Idade gestacional (IG)			RNPT	RNT	RNPT	RNT
(semanas)						
Média ± DP			32,5 ± 0,70	38,5 ± 0,70	36,0 ± 0,10	38,5 ± 0,70
Mínimo - Máximo			26 - 36	37 - 40	35 - 36 ^{6/7}	38 - 40
Peso ao nascer (gramas)			RNPT	RNT	RNPT	RNT
Média ± DP			1.897,6 ± 456,84	2.996,83 ± 436,87	2.550,0 ± 70,71	3.000,0 ± 141,42
Mínimo-Máximo			1.000-2.880	2.260-2.980	2.400-2.750	2.800-3.300
Peso - IG			Grupo de estudo		Grupo Controle	
Classificação do RN			RNPT	RNT	RNPT	RNT
PIG			86,50%	38,10%	0%	0%
AIG			13,50%	61,90%	100%	100%
GIG			0%	0%	0%	0%
Classificação do RN			RNPT	RNT	RNPT	RNT
≥ 2,5 Kg			5,80%	76,20%	0%	83,30%
< 2,5 Kg			69,20%	23,80%	100%	16,70%
< 1,5 Kg			25,0%	0%	0%	0%

N: Número; DP: Desvio-Padrão; IG: Idade Gestacional; RNPT: Recém-nascido Pré-termo; RNT: Recém-nascido de Termo; PIG: Pequeno para a idade gestacional; AIG: Adequado para a idade gestacional; GIG: Grande para a idade gestacional.

4.3. Parâmetros clínicos e laboratoriais dos RN do grupo de estudo

Dos 73 RN com suspeita de sepse, 32 apresentaram ao menos uma das três hemoculturas colhidas com resultado positivo (43,83%). Destes 32 RN, 11 eram de termo e 21 eram pré-termo.

Em relação aos dados clínicos mais frequentemente encontrados entre os 32 RN com hemocultura positiva, a insuficiência respiratória foi encontrada em todos os 32 RN (100%) e anoxia neonatal em 18 RN (18/32 - 56,25%). Dentre os RNPT, sete (7/21 ou 33,33%) evoluíram a óbito e dos RNT, dois evoluíram a óbito (2/11 ou 18,18%).

Considerando os parâmetros laboratoriais dos 32 RN com sepse confirmada, as alterações mais frequentemente encontradas foram a neutrofilia em 22 RN (22/32 - 68,75%), CRP aumentada (> 10 mg/l) em 21 RN (21/32 - 65,62%), plaquetopenia em 15 RN (15/32 - 46,87%) e leucopenia em 14 RN (14/32 - 43,75%).

4.4. Casos de sepse confirmada e sepse clínica

Do total de 73 RN incluídos no estudo, havia 32 casos de sepse confirmada (32/73; 43,83%), sendo 21 RN pré-termo (21/32; 65,62%) e 11 RN de termo (11/32; 34,37%). Dentre os 41 casos de sepse clínica (41/73; 56,16%), havia 31 RN pré-termo (31/41; 75,6%) e 10 RN de termo (10/41; 24,39%).

4.5. Resultados das hemoculturas

Das 200 hemoculturas realizadas nos RN do grupo de estudo, 164 (164/200; 82,0%) foram negativas e 36 (36/200 – 18,0%) foram positivas, gerando 38 isolamentos (38/200; 19,0%), uma vez que em duas hemoculturas houve isolamento de duas bactérias.

Em relação aos microrganismos isolados, as bactérias Gram-positivas foram encontradas em 32 hemoculturas (32/38 – 84,21%), e as bactérias Gram-negativas em seis (6/38 – 15,78%). A Tabela 4 mostra os 32 RN com sepse confirmada de acordo com o tempo de coleta que apresentou a hemocultura positiva, agente etiológico isolado, classificação de GRAM, diagnósticos clínicos e alterações laboratoriais.

Dentre as bactérias Gram-positivas, destacaram-se os *Staphylococcus* coagulase negativa em 22 amostras (22/32; 68,75%). Neste grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa, em três casos não foi possível continuar a identificação, e houve posterior observação de *Staphylococcus haemolyticus* em oito amostras (8/32; 25,0%), *Staphylococcus epidermidis* em sete amostras (7/32; 21,87%), *Staphylococcus hominis* em três amostras (3/32; 9,37%) e *Staphylococcus capitis* em uma amostra (1/32; 3,13%).

Ainda dentre as bactérias Gram-positivas, foram identificadas três amostras com *Streptococcus agalactiae* (3/32; 9,37%), duas amostras com *Streptococcus pneumoniae* (2/32; 6,25%), *Staphylococcus aureus* em duas amostras (2/32; 6,25%), uma amostra com *Lysteria monocytogenes* (1/32; 3,13%), uma amostra com *Micrococcus luteus* (1/32; 3,13%) e uma amostra com *Aerococcus viridans* (1/32; 3,13%).

Dentre as seis hemoculturas contendo bactérias Gram-negativas, foram encontradas duas amostras com *Klebsiella pneumoniae*, duas amostras com *Pseudomonas aeruginosa*, uma amostra com *Serratia marcescens* e uma amostra com *Gardnerella vaginalis*.

Tabela 4 - Distribuição dos 32 RN com sepse confirmada de acordo com o tempo de coleta que apresentou a hemocultura positiva, agente etiológico isolado, classificação de GRAM, diagnósticos clínicos e alterações laboratoriais.

RN	Hemo +	Agente etiológico	GRAM	Diagnósticos Clínicos	Alterações Laboratoriais
1PT	3 ^a	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	IR; AN	Leucop.; neutrof.
3PT	3 ^a	<i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>Gardnerella vaginalis</i>	+	IR; AN	Leucop.; neutrof.
8PT	3 ^a	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	IR; AN; PTE	Leucop.; neutrof.
9PT	1 ^a	<i>Micrococcus luteus</i>	+	IR; AN; PTE	Leucop.; neutrof.; plaq.; CRP aumentada
13PT	2 ^a e 3 ^a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	IR; AN	Leucop.; neutrof.; CRP aumentada
20PT	2 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	IR; LET	Neutrop.; plaq.
22PT	3 ^a	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	IR; AN	Neutrof.; CRP aumentada
23PT	3 ^a	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	IR; AN	Leucop.; plaq.
28PT	1 ^a	<i>Lysteria monocytogenes</i>	+	IR; AN	Neutrof.; CRP aumentada
33PT	2 ^a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	IR; AN	Neutrof.; CRP aumentada
31PT	3 ^a	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	IR; LET	Leucop.; neutrop.; leucoc.
35PT	2 ^a	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	IR; AN	Neutrof.; plaq.; CRP aumentada
36PT	2 ^a	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	IR; AN	Leucop.; Neutrof.; Pla.
45PT	3 ^a	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	IR; AN; LET	Neutrof.; plaquetop.; CRP aumentada

Continuação Tabela 4.

RN	Hemo +	Agente etiológico	GRAM	Diagnósticos Clínicos	Alterações Laboratoriais
49PT	1 ^a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	IR; AN	Neutrop.; CRP aumentada
62PT	3 ^a	<i>Aerococcus viridans</i>	+	IR; AN	Neutrof.; CRP aumentada
64PT	3 ^a	<i>Serratia marcescens</i>	-	IR; AN	Neutrof.; plaq.; CRP aumentada
65PT	2 ^a	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	IR; AN	Neutrof.; plaq.; CRP aumentada
71PT	3 ^a	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	IR; AN	Leucop.; neutrop.; plaq.; CRP aumentada
77PT	1 ^a e 2 ^a	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	IR; NA; PTE	Leucop.; neutrof.; plaq.; CRP aumentada
78PT	1 ^a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	IR; HIPER	Neutrop.; CRP aumentada
2T	2 ^a	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	IR; AN	Neutrop.; CRP aumentada
5T	2 ^a	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	IR; AN	Neutrof.; leucop.; plaq.
7T	1 ^a	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	IR; AN	Leucop.; plaq. CRP aumentada
10T	3 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	IR; HIP	Neutrof.; CRP aumentada
34T	1 ^a e 3 ^a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	IR; AN;	Neutrof.; plaq.; CRP aumentada
40T	1 ^a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	IR; AN; MO	Neutrop.; CRP aumentada
		<i>Staphylococcus hominis</i>	+		
41T	1 ^a	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	IR; ASM	Leucop.; neutrof.
53T	1 ^a	<i>Staphylococcus capitis</i>	+	IR; AN	Neutrof.; plaq.; CRP aumentada
55T	1 ^a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	IR; AN	Leucop.; neutrof.
54T	2 ^a	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	+	IR; AN	Leucop.; neutrof.
56T	1 ^a e 2 ^a	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	+	IR; HIPER	Leucoc.; plaq.; CRP aumentada

Neutrof.: neutrofilia; neutrop.: neutropenia; leucop.: leucopenia; plaq.: plaquetopenia; CRP: Proteína C reativa; AN: Anoxia Neonatal; ASM: Aspiração de Mecônio; HIP: Hipoglicemia; IR: Insuficiência Respiratória; MO: Moniliase oral; PTE: Prematuridade Extrema; IRRIT: Irritabilidade; LET: Letargia; HIPER: Hipertermia; + positivo; - negativo.

A Tabela 5 mostra a frequência de isolamentos de acordo com a coleta na qual as hemoculturas foram positivas. Na primeira amostra houve uma porcentagem de isolamento de 34,21% (13/38) e na terceira amostra a porcentagem de isolamento foi de 36,84% (14/38).

Tabela 5 - Distribuição dos agentes etiológicos identificados de acordo com a coleta na qual as hemoculturas foram positivas. Houve 38 isolamentos nos três tempos estudados.

AG. ETIOLÓGICO	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra
<i>S. haemolyticus</i>	1	2	5
<i>S. hominis</i>	1	1	1
<i>S. epidermidis</i>	5	1	1
<i>S. aureus</i>	0	1	1
<i>S. coagulase negativa</i>	1	2	0
<i>S. capitis</i>	1	0	0
<i>S. agalactiae</i>	2	1	0
<i>S. pneumoniae</i>	0	1	1
<i>L. monocytogenes</i>	1	0	0
<i>M. luteus</i>	1	0	0
<i>A. viridans</i>	0	0	1
<i>K. pneumoniae</i>	0	1	1
<i>P. aeruginosa</i>	0	1	1
<i>S. marcescens</i>	0	0	1
<i>G. vaginalis</i>	0	0	1
TOTAL (%)	13 (34,21)	11 (28,95)	14 (36,84)

1ª amostra = tempo zero; segunda amostra = 48 horas; 3ª amostra = 7 dias.

Dessa casuística de 73 RN do grupo de estudo, nove evoluíram a óbito (9/73 ou 12,33%), sendo sete RNPT e dois RNT. Dentre os óbitos, cinco só tiveram a terceira amostra positiva pela hemocultura, colhida sete dias após a introdução da antibioticoterapia. Dois dos nove óbitos tiveram a primeira (e única) amostra colhida positiva pela hemocultura e um caso teve a segunda amostra positiva pela hemocultura. Quando analisamos os nove óbitos em relação às alterações clínicas, todos os RN apresentaram insuficiência respiratória. As alterações laboratoriais mais frequentes foram leucopenia, neutrofilia, plaquetopenia e CRP aumentada. O agente etiológico

mais prevalente foi o *Staphylococcus* coagulase negativa (6/9). Em relação à amniorrexe prematura, das nove mães, cinco apresentaram tempo de amniorrexe prematura superior a 24 horas, duas não apresentaram esta alteração, e não havia registro em duas (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição dos nove RN que evoluíram a óbito de acordo com os dados clínicos e laboratoriais, microrganismo isolado e tempo de amniorrexe prematura materna.

RN	Sinais/ sintomas	Alterações laboratoriais	Microrganismo isolado	Tempo de amniorrexe (horas)
8PT	IR, AN	LEUCOP.+NEUTROF.	<i>S. haemolyticus</i>	72
23PT	IR, AN	LEUCOC.+ PLAQ.	<i>S. haemolyticus</i>	72
31PT	IR, MH	LEUCOC.+NEUTROP.+ LEUCOC	<i>S. haemolyticus</i>	144
62PT	IR, AN	NEUTROF.+ CRP aumentada	<i>Aerococcus viridans</i>	24
65PT	IR, AN	NEUTROP.+PLAQ.+ CRP aumentada	<i>S. haemolyticus</i>	SR
71PT	IR	LEUCOP.+NEUTROP.+ PLAQ.+ CRP aumentada	<i>K. pneumoniae</i>	Não
77PT	IR	LEUCOP.+NEUTROF.+ PLAQ.+ CRP aumentada	<i>S. agalactiae</i>	48
34T	IR	NEUTROF.+PLAQ.+ CRP aumentada	<i>S. epidermidis</i>	Não
54T	IR, AN	LEUCOP.+NEUTROF.	<i>S. coagulase negativa</i>	SR

Neutrof.: neutrofilia; Neutrop.: neutropenia; leucop.: leucopenia; plaq.: plaquetopenia; Leucoc.: leucocitose; CRP= Proteína C reativa; AN: Anoxia Neonatal; IR: Insuficiência Respiratória (taquipnéia, apnéia, oxigenioterapia); MH: Membrana hialina; SR – sem registro.

4.6. Padronização da qPCR com iniciadores do gene 16S rDNA

A concentração dos iniciadores foi o primeiro parâmetro a ser definido. Foram testadas várias concentrações de iniciadores, variando de

0,05 μM , 0,1 μM , 0,2 μM , até 0,4 μM . A concentração que apresentou melhor desempenho foi a de 0,1 μM .

Após o estudo das concentrações de iniciadores, volumes e concentrações de reagentes, a mistura reacional da qPCR foi padronizada com um volume final de reação de 25 μL (Tabela 7). Foram realizados 40 ciclos de amplificação com o emprego de uma técnica de decréscimo de temperaturas de *annealing*, conhecida como *touchdown*. Os ciclos foram desenvolvidos da seguinte forma: incubação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 10 ciclos de 95°C por 30 segundos e 66°C por 30 segundos, 10 ciclos de 95°C por 30 segundos e 64°C por 30 segundos, 20 ciclos de 95°C por 30 segundos e 62°C por 30 segundos, finalizando com a curva de dissociação (*melting curve*). Para esta amplificação, após exaustivos testes, optamos pela adoção do protocolo descrito que não utiliza a etapa de extensão (polimerização) a 72°C.

Tabela 7 - Protocolo padronizado da qPCR.

Reagentes	Volume/tubo (μL)	Concentração Final
<i>Master Mix</i>	12,5	
H ₂ O	9,5	
Iniciador <i>forward</i> (10 μM)	0,25	0,1 μM
Iniciador <i>reverse</i> (10 μM)	0,25	0,1 μM
DNA	2,5	100 ng
Volume final	25,0	

4.7. Especificidade da qPCR

Testes de especificidade foram realizados para garantir que o DNA de outros microrganismos não seriam amplificados com os iniciadores do gene 16S rDNA de bactérias que foram delineados para este estudo. Para tanto, foram testados alguns vírus (CMV, EBV, parvovírus B19), parasitos (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*) e um fungo (*Candida albicans*), todos agentes etiológicos que podem causar infecção neonatal.

A especificidade dos iniciadores já havia sido testada em amplificações convencionais realizadas previamente a qPCR. No entanto, uma amostra de RN que foi excluída da casuística por ela apresentar hemocultura positiva apenas para o fungo *Candida albicans* foi testada e apresentou resultado negativo na qPCR, corroborando os resultados anteriores obtidos com vírus, parasitos e fungos (Figura 1).

Figura 1 - Diagrama de amplificação por qPCR da amostra de recém nascido com infecção por *Candida albicans*. O resultado negativo é confirmado pela ausência de amplificação durante os 40 ciclos da reação.

4.8. Estabelecimento da curva padrão da qPCR

Com o intuito de construir a curva padrão da qPCR foram selecionadas culturas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603), tendo como ponto de partida a concentração de bactérias equivalente a 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a 10^8 UFC/mL (UFC = Unidades Formadoras de Colônia), de acordo com o preconizado por ZUCOL et al. (2006).

Partindo destas culturas com 0,5 na escala de turbidez de McFarland ou 10^8 UFC em 1,0 mL de solução fisiológica, ou seja, 10^8 UFC/mL (LENNETTE et al., 1985), após centrifugação por 10 minutos a 4°C em velocidade de $20.817 \times g$, o *pellet* obtido das 10^8 UFC de bactérias foi colocado em 0,2 mL de sangue total colhido em tubo com EDTA de um indivíduo sabidamente não infectado. A partir desta concentração de 10^8 UFC /mL foram feitas diluições seriadas na razão 10 para o preparo de diluições. Inicialmente foram testados pontos variando de 10^7 até 10^{-2} UFC/mL (TELÓ et al., 2007; FERREIRA et al., 2011), porém após a fase de padronização optamos pela utilização da curva de calibração com os pontos variando de 10^6 a 10^1 UFC/mL, suficientes para a quantificação das amostras deste estudo.

Um exemplo de curva padrão do estudo está representado na Figura 2. Esta curva padrão apresentou *slope* de -3,20; *intercept* de 39,00 e eficiência de 105,24%. Seguindo o que foi preconizado por BUSTIN et al. (2006), foram validadas apenas as reações com inclinação da curva (*slope*)

entre -3,58 a -3,10 e eficiência compreendida entre 90 e 110%. O limite de detecção (LOD) em todos os experimentos da etapa de padronização foi de 10^1 UFC/mL, independentemente do tipo de bactérias, se Gram-positiva ou Gram-negativa (Figura 3). Salientamos que, se todos os outros parâmetros usados para a interpretação do resultado da qPCR forem compatíveis com um resultado positivo, o programa do termociclador é capaz de extrapolar os dados e calcular a carga bacteriana mesmo que a concentração esteja compreendida entre 1 e 10^1 UFC/mL.

Figura 2 - Diagrama mostrando a inclinação da curva (slope) de - 3,20, correspondendo a uma eficiência de 105,2%.

Figura 3 - Curva padrão com o teste de diluições de bactérias variando de 10^6 a 10^1 UFC/mL.

Na curva de dissociação (*melting*, T_m) de cada amostra observou-se uma variação na temperatura de no máximo 1 grau, ou seja, temperaturas compreendidas entre $84,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 4). Para termos certeza que todas as amostras apresentando T_m nesse intervalo eram realmente amostras positivas, essas amplificações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% com visualização de bandas de 150 bp, confirmando desta forma se tratar de verdadeiros positivos.

Figura 4 - Diagrama representativo da variação de 1 grau ($84,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) tolerada para a temperatura de *melting* das amostras positivas. Observa-se que todas as cinco amostras positivas representadas foram testadas em duplicata e apresentaram temperatura de *melting* dentro do intervalo estabelecido.

4.9. Critérios de positividade para a interpretação dos resultados de qPCR das amostras de sangue de RN

Amostras positivas deveriam apresentar Ct (*threshold cycle*) abaixo de 40, Tm de $84,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e carga bacteriana ≥ 1 UFC/mL nas duas avaliações (duplicata). Para que a duplicata de cada amostra fosse considerada válida, o Ct das duas aferições não poderia diferir em mais de 1,0 Ct. Foram consideradas apenas reações com eficiência compreendida entre 90-110%.

4.10. Resultados da qPCR em relação às hemoculturas

Do total de 73 casos de sepse neonatal, a hemocultura foi positiva em 32 casos (32/73 - 43,83%) e negativa em 41 casos (41/73 - 56,14%), enquanto que a qPCR foi positiva em 65 (65/73 - 89,04%) e negativa em oito casos (8/73 - 10,96%) (Tabela 8).

Dentre os 41 casos de sepse clínica, portanto com hemoculturas negativas, havia 10 RNT e 31 RNPT. Neste grupo, a qPCR foi positiva em 35 casos (35/41 - 85,37%) e foi negativa em 6 casos (6/41 - 14,63%).

Do total de 32 casos de sepse confirmada (11 RNT e 21 RNPT) a qPCR foi positiva em 30 casos (93,75%) e foi negativa em dois casos (6,25%). Estes dois casos foram positivos pela hemocultura na 3ª amostra colhida no sétimo dia após a introdução da antibioticoterapia, e os agentes isolados na hemocultura foram *Streptococcus pneumoniae* e *Gardnerella vaginalis* no caso 3PT e *Serratia marcescens* no caso 64PT (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultado da hemocultura e qPCR nos 73 casos suspeitos de sepse neonatal incluídos no estudo, considerando os três tempos de coleta.

qPCR	Hemocultura		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	30	35	65
Negativa	2	6	8
Total	32	41	73

Nesta casuística, considerando que as amostras de sangue foram colhidas no mesmo momento para a realização das hemoculturas e da qPCR, o teste de McNemar foi aplicado para medir a concordância ou discordância dos resultados obtidos pelas duas técnicas. Esta análise encontrou uma discordância de resultados, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$, IC de 95%), indicando superioridade da qPCR em relação às hemoculturas para a detecção dos casos suspeitos de sepse.

4.11. Análise das amostras testadas pela qPCR

Na Figura 5, que se segue, apresentamos os dados de um RN no qual a qPCR foi capaz de antecipar o diagnóstico de sepse e monitorar o tratamento instituído. Este RNT (2T) apresentou hemocultura positiva na 2^a amostra colhida (48 horas após a introdução da antibioticoterapia) enquanto que a qPCR foi positiva já na 1^a amostra colhida (tempo zero), evidenciando que a qPCR pode contribuir para um diagnóstico mais precoce de sepse neonatal quando comparado à hemocultura. A 3^a amostra (sete dias após a introdução do tratamento) analisada por qPCR foi negativa em concordância com o resultado da hemocultura. Como este RN apresentou evolução favorável e a 3^a amostra apresentou qPCR negativa, houve, neste caso associação entre a melhora clínica e a negatificação da qPCR que ocorreu de forma simultânea à negatificação da hemocultura. Neste RN, a qPCR poderia ter sido usada para monitorar a terapêutica e igualmente como “critério de cura”, oferecendo subsídios aos neonatologistas para a suspensão da antibioticoterapia.

Figura 5 - Diagramas representando o teste (em duplicata) das três amostras de sangue do RNT (2T) com sepse confirmada (hemocultura positiva) e para o qual a qPCR foi positiva na 1ª e 2ª amostras (linhas vermelhas e amarelas). A 3ª amostra foi negativa (ausência de amplificação – linhas verdes). No diagrama da esquerda é possível observar a subida das linhas vermelhas e amarelas a partir do ciclo 35 (1ª e 2ª amostras), o que também pode ser observado na curva de *melting* (diagrama do lado direito) que apresenta dois picos na faixa de temperatura esperada para as amostras positivas (em vermelho e amarelo). A ausência de pico (amplificação) na 3ª amostra está representada no diagrama do lado esquerdo pela manutenção da linha horizontal verde até o ciclo 40, e no diagrama do lado direito, pela linha verde que não apresentou pico no intervalo de temperatura de $84,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Do total de 32 casos de sepse confirmada a qPCR foi positiva em 30 casos. Em 14 dos 30 casos (14/30 – 46,67%) a qPCR antecipou o diagnóstico de sepse neonatal quando comparada à hemocultura. Em 13 casos a qPCR e a hemocultura foram positivas na mesma amostra (13/30 – 43,33%), porém, é preciso lembrar que os resultados da qPCR podem ser liberados em 24 horas, enquanto os resultados positivos nas hemoculturas podem demorar até 72 horas. Em três casos a qPCR foi positiva em amostra posterior quando comparada à hemocultura (3/30 – 10%).

Na Tabela 9, apresentamos a positividade das hemoculturas e da qPCR nos diferentes tempos de coleta dos 32 casos de sepse neonatal confirmada. Como podemos observar, a qPCR detectou 22 casos e a hemocultura 11 no tempo zero (50% a mais para a qPCR). No tempo 48 horas, a hemocultura foi positiva em 10 casos e a qPCR foi positiva em cinco casos. No tempo sete dias, a hemocultura e a qPCR foram positivas em 11 e três casos, respectivamente.

Tabela 9 - Positividade da hemocultura e da qPCR nos diferentes tempos de coleta dos 32 casos confirmados de sepse neonatal.

Testes	Tempo 0	Tempo 48h	Tempo 7 dias	Total
Hemocultura	11	10	11	32
qPCR	22	5	3	30

Na Tabela 10 apresentamos as cargas bacterianas determinadas por qPCR nos diferentes tempos de coleta dos 30 casos de sepse confirmada (do total de 32 casos), nos quais a qPCR foi positiva.

Tabela 10 - Carga bacteriana determinada por qPCR nos três tempos de coleta de 30 casos com sepse confirmada.

qPCR Carga bacteriana (UFC/mL)	Sepse confirmada		
	T zero	T 48h	T 7dias
>1 e ≤ 10	1	2	0
>10 e ≤ 30	6	0	1
>30 e ≤ 50	8	2	1
>50 e ≤ 10 ²	6	1	1
>10 ² e ≤ 10 ³	1	0	0
>10 ³ e ≤ 10 ⁴	0	0	0
> 10 ⁴ e ≤ 10 ⁵	0	0	0
>10 ⁵ e ≤ 10 ⁶	0	0	0
Total	22	5	3

UFC - unidades formadoras de colônias.

Dos 30 casos com resultado positivo pela qPCR, 22 (73,33%) foram positivos no tempo zero, sendo que um caso apresentou carga bacteriana igual ou inferior a 10 UFC/mL, 14 apresentaram carga bacteriana entre 10 e 50 UFC/mL, em seis casos a carga bacteriana foi entre 50 e 10² UFC/mL e um caso apresentou carga bacteriana entre 10² e 10³ UFC/mL. No tempo 48 horas, cinco casos (16,67%) foram positivos, sendo que dois apresentaram carga bacteriana entre 1 e 10 UFC/mL, dois casos com carga entre 30 e 50 UFC/mL e um caso com carga bacteriana entre 50 e 10² UFC/mL. No tempo sete dias após a introdução da antibioticoterapia, três casos (10%) foram

positivos, sendo que dois apresentaram carga entre 10 e 50 UFC/mL e um apresentou carga bacteriana entre 50 e 10^2 UFC/mL.

A Figura 6 mostra outro caso no qual foi possível observar que a qPCR poderia ser aplicada ao monitoramento da terapêutica. A primeira amostra colhida do RNT (7T) apresentou resultado positivo na hemocultura e na qPCR (azul). A qPCR foi negativa na 2ª e 3ª amostras colhidas após o início do tratamento (roxo e rosa) coincidindo com os resultados das hemoculturas. O RN (7T) apresentou evolução favorável e os resultados da qPCR acompanharam a boa resposta ao tratamento. O terceiro resultado negativo da qPCR, juntamente com a hemocultura negativa, teria sido útil para embasar a decisão de suspensão do tratamento (critério de cura).

Figura 6 - O diagrama da esquerda mostra que apenas a duplicata em azul (1ª amostra) do caso RNT (7T) apresentou amplificação no ciclo 33-34, fato confirmado na curva de *melting* (lado direito) na qual é possível observar os dois picos em azul dentro da faixa de temperatura aceita para amostras positivas, enquanto que as duplicatas em roxo e rosa não apresentam subida da curva no diagrama da esquerda, e também não apresentam picos no diagrama da direita (2ª e 3ª amostra-roxo e rosa) no intervalo de temperatura de $84,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Na Figura 7, apresentamos os resultados da qPCR que foi negativa nas três amostras colhidas de um RNT com sepse clínica (hemoculturas negativas). Desde que este RN evoluísse com melhora clínica, os resultados da qPCR, associados ao resultado negativo da primeira hemocultura (liberado no quinto dia após a coleta), poderiam auxiliar na decisão de suspensão da antibioticoterapia.

Figura 7 - Diagramas representando o teste (em duplicata) das três amostras de sangue do RNT (6T) com sepse clínica (hemoculturas negativas) e para o qual as três qPCR ratificaram o resultado das hemoculturas. No diagrama da esquerda é possível observar a inexistência de elevação das curvas até o ciclo 40, e no diagrama da direita não existem picos na curva de *melting* na faixa de temperatura esperada para as amostras positivas ($84,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Em relação aos 41 casos de sepse clínica nos quais as hemoculturas foram negativas nos três tempos de coleta, em seis casos (6/41; 14,63%) a qPCR também foi negativa; em sete casos (7/41; 17,07%) a qPCR foi positiva em apenas um tempo de coleta; em 10 casos (10/41; 24,39%) a qPCR foi

positiva em dois tempos de coleta, e em 18 casos (18/41; 43,90%) a qPCR foi positiva nos três tempos de coleta. Na Tabela 11 apresentamos a carga bacteriana por qPCR nos três tempos de coleta dos 35 casos de sepse clínica.

Tabela 11 - Carga bacteriana determinada por qPCR nos três tempos de coleta de 35 casos com sepse clínica (do total de 41 casos de sepse clínica do estudo).

qPCR Carga bacteriana (UFC/mL)	Sepse clínica		
	T zero	T 48h	T 7 dias
>1 e ≤ 10	2	0	1
>10 e ≤ 30	12	4	1
>30 e ≤ 50	8	2	1
>50 e ≤ 10 ²	2	0	0
>10 ² e ≤ 10 ³	1	0	0
>10 ³ e ≤ 10 ⁴	0	0	0
> 10 ⁴ e ≤ 10 ⁵	1	0	0
>10 ⁵ e ≤ 10 ⁶	0	0	0
Total	26	6	3

UFC- unidades formadoras de colônias

Do total de 41 casos com sepse clínica, 35 casos foram positivos na qPCR (85,36%). Dentre estes 35 casos, 26 (74,29%) foram positivos já no tempo zero, sendo que dois casos apresentaram carga bacteriana igual ou inferior a 10 UFC/mL, 20 apresentaram carga bacteriana superior a 10 e inferior ou igual a 50 UFC/mL, dois casos apresentaram carga bacteriana

entre 50 a 10^2 UFC/mL, um caso apresentou carga entre 10^2 a 10^3 UFC/mL e um caso apresentou a carga bacteriana entre $> 10^4$ e $\leq 10^5$ UFC/mL. No tempo 48 horas, seis casos (17,14%) foram positivos, desses, quatro apresentaram carga bacteriana maior que 10 e inferior ou igual a 30 UFC/mL; e dois casos apresentaram carga entre 30 e 50 UFC/mL. No tempo sete dias, apenas três casos (8,57%) foram positivos, sendo que um apresentou carga entre 1 e 10 UFC/mL, outro caso apresentou carga entre 10 e 30 UFC/mL e o último apresentou carga bacteriana entre 30 e 50 UFC/mL. Foi possível observar, com o passar do tempo e a manutenção do tratamento em todos os RN que o número de casos positivos sofreu redução, assim como as cargas bacterianas.

4.12. Resultados da qPCR nos grupos controle

Um total de 116 casos controle provenientes de três grupos foram analisados por qPCR: 56 RN com baixo risco de infecção (44 RNT e 12 RNPT), 30 adultos sadios de São Paulo-SP e 30 adultos sadios de Cuiabá-MT.

No grupo de 56 RN cujas amostras foram colhidas da placenta, 55 apresentaram resultados positivos por qPCR e apenas uma amostra foi negativa (RNPT 15). Reiteramos que esta amostra negativa foi usada tanto para a padronização da qPCR, quanto para a realização de todos os testes das amostras dos RN com sepse confirmada e sepse clínica.

No grupo composto por 30 adultos jovens sadios de São Paulo, todas as 30 amostras foram positivas por qPCR, fato que se repetiu na análise das 30 amostras do grupo controle de Mato Grosso.

4.13. Comparação entre os grupos estudados

Ao compararmos as medianas das cargas bacterianas, no tempo zero, entre os grupos com sepse confirmada (37,10 UFC/mL) e sepse clínica (24,49 UFC/mL), foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0402$, teste de Mann Whitney).

Não houve diferença entre as medianas de carga bacteriana dos grupos sepse confirmada (37,10 UFC/mL) e sepse clínica (24,49 UFC/mL) em relação à mediana dos grupos controle de RN (26,90 UFC/mL) e de indivíduos adultos procedentes de São Paulo (25,99 UFC/mL) ($p=0,2787$, teste de Kruskal-Wallis).

Houve diferença estatisticamente significativa das medianas de carga bacteriana entre os grupos sepse clínica (24,49 UFC/mL) e o grupo controle de Mato Grosso (42,92 UFC/mL) ($p=0,0023$, teste de Mann Whitney), porém salienta-se que a mediana dos valores de carga bacteriana do grupo controle de Mato Grosso foi superior àquela do grupo de RN com sepse clínica. Não houve diferença entre as medianas do grupo de RN com sepse confirmada (37,10 UFC/mL) e o grupo controle de adultos de Mato Grosso (42,92) ($p = 0,7172$, teste de Mann Whitney).

Ao analisarmos o grupo total de RN com sepse, agrupando aqueles com sepse confirmada aos com sepse clínica, em relação aos três grupos controle, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo total de RN (30,91 UFC/mL) e o grupo controle de adultos do Mato Grosso (42,92 UFC/mL) ($p=0,0414$, teste de Mann Whitney), porém novamente com superioridade da mediana do grupo controle de Mato Grosso em relação aos RN com suspeita de sepse.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos grupos controle de RN (mediana de 26,90 UFC/mL) ou do grupo controle de adultos de São Paulo (mediana de 25,99 UFC/mL) em relação ao grupo controle de Mato Grosso (mediana de 42,92 UFC/mL, $p=0,0108$, teste de Kruskal-Wallis), novamente com superioridade do valor dos controles do Mato Grosso.

Na Figura 8 apresentamos as medianas das cargas bacterianas por qPCR nos grupos de estudo (sepse confirmada e clínica) e controles de RN, São Paulo e Mato Grosso.

Figura 8 - Diagrama das medianas de cargas bacterianas (UFC/mL) obtidas pela qPCR nos grupos de estudo (sepse confirmada e clínica) no momento da suspeita de sepse (tempo zero), e nos três grupos controle, de RN (CRN), de adultos de São Paulo (CSP) e de adultos de mato Grosso (CMT) (tempo único).

4.14. Análise dos óbitos e dos casos graves

Ao analisarmos os nove RN que evoluíram a óbito, todos no grupo com sepse confirmada, verificamos que ambos os testes foram positivos (hemoculturas e qPCR) em todos os nove casos (8PT, 23PT, 31PT, 62PT, 65PT, 71PT, 77PT, 34T e 54T), no entanto, a qPCR não encontrou valores mais elevados de carga bacteriana nestes nove RN em relação aos demais RN do grupo com sepse confirmada (n=23). Dentre os nove óbitos, somente em dois casos a 1ª amostra foi positiva pela hemocultura, e em seis casos somente a terceira hemocultura foi positiva (colhida sete dias após a introdução da antibioticoterapia). Em relação à qPCR, o teste molecular foi positivo na 1ª amostra em cinco dos nove casos, em dois casos na 2ª amostra e em dois casos na terceira amostra, portanto, podemos afirmar que a qPCR detectou na 1ª amostra (colhida no momento da suspeita de sepse) três casos a mais que a hemocultura.

É importante salientar que em seis dos nove casos que evoluíram a óbito a qPCR ainda se mantinha positiva na última amostra disponível para o teste (segunda ou terceira, uma vez que nem todos os RN tiveram três amostras colhidas).

Em cinco dos nove casos que evoluíram a óbito o agente etiológico isolado foi o *Staphylococcus* coagulase negativa, em seis casos a gestante apresentava amniorrexe prematura há mais de 24 horas, e em quatro casos os RN apresentavam idade gestacional <30 semanas e peso ao nascimento <1.500g. Verificamos que todos os nove óbitos apresentaram mais de três sinais/sintomas clínicos, associados a mais de três exames laboratoriais alterados e sugestivos de sepse bacteriana. Estes nove RN evoluíram a óbito

a despeito do emprego inicial de antibioticoterapia de amplo espectro, com a associação de cefepime ao esquema tradicional (ampicilina e gentamicina), ou o início com ampicilina e gentamicina e rápida substituição por vancomicina e meropenem.

Quando o critério usado para realizar as comparações foi o de casos graves, além dos nove RN que evoluíram a óbito, todos pertencentes ao grupo com sepse confirmada (n=32), foram selecionados 12 casos nos quais os neonatologistas prescreveram, desde o início, antibioticoterapia que não era a primeira escolha por considerarem que os RN se encontravam em estado grave (casos 1PT, 9PT, 22PT, 32PT, 48PT, 49PT, 64PT, 67PT, 7T, 10T, 40T e 70T). Estes 12 casos, somados aos nove óbitos resultaram em um novo grupo de 21 casos graves. Este novo grupo foi comparado a outro formado por RN com sepse confirmada que tiveram qPCR positiva mas que não foram incluídos nos casos graves (n=11), portanto 21 casos graves comparados a 11 não graves. Este universo compreende os 32 casos de sepse confirmada. Esta comparação não encontrou diferenças estatisticamente significativas entre as cargas bacterianas dos dois grupos.

4.15. Análise dos dois casos com carga bacteriana muito elevada

Na casuística desta pesquisa, apesar das medianas de carga bacteriana terem sido relativamente baixas, foram encontrados dois casos com carga bacteriana $>10^2$ UFC/mL, destoando dos demais (RNPT de número 54 e 69). Curiosamente, estes dois casos não foram positivos por hemocultura, portanto estavam incluídos no grupo com sepse clínica. Em relação às mães, uma delas não fez pré-natal e não havia dados da outra

gestante. Além dos dois RN serem pré-termo, no caso 69 a gestante apresentou sepse, tendo recebido vancomicina e meropenem. Não foram colhidas hemoculturas desta gestante antes da introdução da antibioticoterapia e ela evoluiu com melhora. O uso de antibióticos pela gestante poderia explicar as hemoculturas negativas do RN. A outra mãe, do RNPT 54, não tinha dados disponíveis no prontuário. Em relação às cargas bacterianas, no caso do RNPT 69, cuja mãe teve sepse, no primeiro tempo a carga bacteriana foi de 41.419 UFC/mL, o segundo tempo foi 18.930 UFC/mL e o terceiro tempo foi 18.817 UFC/mL. A carga bacteriana do RNPT 54 na primeira coleta foi de 452 UFC/mL, o segundo tempo teve carga bacteriana negativa e a carga foi de 2,0 UFC/mL no terceiro tempo. Os dois RNPT evoluíram favoravelmente com ampicilina e gentamicina apesar das cargas bacterianas elevadas.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A avaliação dos casos suspeitos de sepse neonatal, principalmente naqueles de início precoce, inclui a análise dos fatores de risco maternos e neonatais, a coleta de uma hemocultura associada à coleta de líquido quando houver indicação para este procedimento, além da realização de exames rotineiros tais como o hemograma com diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas, além de mensuração da proteína C Reativa (CRP). Logo após a coleta destes exames, os recém-nascidos passam a receber antibióticos capazes de tratar infecções causadas pelas bactérias mais prevalentes naquele serviço médico (BERNER et al., 2002; SLADE et al., 2003; LAWN et al., 2005; COUTO et al., 2007). Mesmo com resultados de hemocultura negativos, os antibióticos são mantidos por períodos que variam de uma a duas semanas devido a suspeita clínica inicial, sendo assim, muitos recém-nascidos recebem antibióticos desnecessariamente. É importante salientar que o uso de antibióticos já foi relacionado a casos de enterocolite necrosante e óbitos em recém-nascidos pré-termo e de baixo peso (KUMAR et al., 2006; CHENG et al., 2008) reforçando a necessidade do uso criterioso destes medicamentos.

Considerando todos estes aspectos, chega-se à conclusão que a situação ideal seria a identificação de um biomarcador que apresentasse elevada sensibilidade, para que nenhum RN infectado deixasse de ser identificado; elevada especificidade para evitar resultados falso-positivos, acarretando o uso desnecessário de antibióticos, prolongando a internação e expondo o recém-nascido ao risco de contrair uma infecção hospitalar, além

de elevado valor preditivo negativo, sendo consequentemente capaz de excluir a presença de infecção. Todas essas características deveriam necessariamente estar associadas à rapidez de execução para que a introdução da antibioticoterapia não fosse postergada. Este novo biomarcador, juntamente com o resultado negativo da hemocultura e a melhora clínica do recém-nascido permitiria a exclusão do diagnóstico de sepse e a consequente interrupção da antibioticoterapia sem, no entanto, incorrer em riscos à saúde do recém-nascido (GUEMBE et al., 2013).

No presente estudo uma amplificação quantitativa (qPCR) foi padronizada usando iniciadores oriundos de uma região bem conservada do gene 16S rDNA universal de bactérias. Após a etapa de padronização, amostras de sangue periférico de recém-nascidos com suspeita de sepse foram obtidas para a realização das hemoculturas nos tempos zero, correspondendo ao momento da suspeita de sepse, imediatamente antes da introdução da antibioticoterapia; além dos tempos 48 horas e sete dias após a introdução dos antibióticos.

A qPCR é, teoricamente, mais sensível que as hemoculturas, apresentando ainda a vantagem de produzir resultados mais rápidos (CHAN et al., 2009; LIU et al., 2014). No caso das hemoculturas, o tempo para a liberação de resultados finais negativos em equipamentos automatizados gira em torno de cinco dias, enquanto a qPCR pode ser executada no mesmo dia, com resultados liberados em, no máximo, 24 horas, tanto negativos quanto positivos.

Os recém-nascidos recrutados para o estudo tinham necessariamente que apresentar dois sinais/sintomas sugestivos de sepse, além de dois parâmetros laboratoriais alterados e sugestivos de infecção. Os critérios de inclusão adotados no presente estudo foram mais rigorosos em relação a relatos similares da literatura, que normalmente adotam a presença de dois parâmetros alterados, podendo ser clínicos e/ou laboratoriais, justificando a porcentagem de hemoculturas positivas que foi encontrada na presente pesquisa, de 43,8%, mais elevada do que é normalmente encontrado (MEIRELES et al., 2011).

As bactérias isoladas no presente estudo indicaram predomínio de *Staphylococcus coagulase negativa*, notadamente de *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis*. Além destes, existiram poucos casos com *Streptococcus agalactiae*. Este perfil de bactérias parece ser mais compatível com o de sepse neonatal tardia (CUNHA et al., 2004; COUTO et al., 2007; CAREY et al., 2008). Corroborando este dado, verificou-se que a maior frequência de isolamentos (14/38 - 36,84%) ocorreu na terceira amostra (7 dias após início do tratamento). Uma possível explicação para este fato é que 50% das mães dos 32 RN com hemocultura positiva apresentaram amniorrexe prematura, ocasionando períodos mais prolongados de internação e, conseqüentemente, a maior exposição das gestantes e de seus fetos à microbiota hospitalar. Segundo OZKAN et al. (2014), *Staphylococcus coagulase negativa* foi o microrganismo mais encontrado em todos os tipos de sepse neonatal, sendo uma importante causa de mortalidade tanto nos países em desenvolvimento, quanto nos países desenvolvidos. Corroborando

estes dados, MULARONI et al. (2014) também relataram que o *Staphylococcus* coagulase negativa constituiu uma importante causa de sepse em RN, com risco elevado de complicações, comparado ao risco causado pela prematuridade, sem no entanto, estar associado a maior mortalidade.

Ao estabelecermos uma comparação entre os resultados das hemoculturas e da qPCR, do total de 73 casos suspeitos de sepse neonatal, a hemocultura foi positiva em 32 casos (43,8%) e a qPCR foi positiva em 65 casos (89,0%), frequência duas vezes maior de resultados positivos, muito embora o desempenho das hemoculturas no presente estudo tenha sido mais elevado que na maior parte dos relatos de sepse neonatal e qPCR descritos na literatura, provavelmente devido à adoção de quatro critérios de inclusão, dois clínicos e dois laboratoriais (JORDAN et al., 2005; OHLIN et al., 2008; WU et al., 2008; CHENG et al., 2008; CHAN et al., 2009; OHLIN et al., 2012; LIU et al., 2014). Se considerarmos os resultados dos dois testes de acordo com o número de amostras analisadas, do total de 200 amostras de DNA obtidas dos 73 RN com suspeita de sepse foram encontradas 38 hemoculturas positivas (19,0%), enquanto a qPCR foi positiva em 135 amostras (67,5%), frequência quase quatro vezes superior.

Dentre os 32 casos de sepse confirmada (hemocultura positiva), em 30 casos (93,7%) a qPCR também foi positiva. Nos dois casos discordantes a terceira amostra de sangue foi a que apresentou hemocultura positiva, isto é, aquela colhida no sétimo após a introdução da antibioticoterapia, falando contra o diagnóstico de sepse neonatal precoce, muito embora o início da sintomatologia tenha ocorrido até 72 horas de vida. Em um destes casos

(3PT) houve isolamento de dois agentes etiológicos na hemocultura, *Streptococcus pneumoniae* e *Gardenerella vaginalis*. O primeiro microrganismo não é usualmente encontrado em sepse neonatal, notadamente de início precoce, e o segundo sugere fortemente uma contaminação do RN no momento do parto. A evolução deste RN foi favorável com antibioticoterapia de primeira escolha. No outro caso (64PT), houve isolamento de *Serratia marcescens* com perfil de resistência no antibiograma compatível com a microbiota hospitalar (MOSTACHIO et al., 2012), uma vez que a bactéria só era sensível aos carbapenêmicos. No entanto, este RN foi tratado com ampicilina e gentamicina e evoluiu favoravelmente.

Nestes dois casos discordantes, os resultados da hemocultura e da qPCR se referem à 3^a amostra (7 dias após o início das antibioticoterapia). Uma possível explicação para que o sangue tenha apresentado resultado positivo pela hemocultura e negativo pela qPCR seria que a carga bacteriana poderia se encontrar abaixo do limiar de detecção da qPCR, e as hemoculturas, após vários dias de cultivo, poderiam ser positivas mesmo que inicialmente a amostra contivesse quantidade de bactérias menor que 1,0 UFC/mL (XU et al., 2003; REIER-NILSEN et al., 2009). No estudo de CHAN et al. (2009), oito casos de um total de 42 (8/42 – 19%) apresentaram resultados de hemocultura e qPCR discordantes, enquanto que no presente estudo, a hemocultura e a qPCR discordaram em dois de 32 casos (2/32 – 6,25%) de RN com sepse confirmada.

Dentre os 41 casos de sepse clínica (10 RNT e 31 RNPT) nos quais todas as hemoculturas foram negativas a despeito da existência dos quatro

critérios de inclusão (clínicos e laboratoriais), a qPCR foi positiva em 85,4% do total, em 26 (74%) já no tempo zero, e em 44% a qPCR foi positiva nas três amostras. Estes dados nos parecem muito promissores, pois confirmam a suspeita de sepse feita inicialmente pelos neonatologistas. Todos os RN deste grupo receberam antibioticoterapia por períodos de uma a duas semanas e tiveram evolução favorável.

Segundo CHAN et al. (2009), uma qPCR com sondas para a detecção de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas não mudaria a atual prática de iniciar a antibioticoterapia imediatamente após a suspeita de sepse. No entanto, um teste positivo embasaria a decisão médica em continuar o tratamento, apesar do resultado negativo da hemocultura, ou poderia dar subsídios para que o esquema antibiótico fosse modificado nos casos com evolução clínica desfavorável, especialmente naqueles causados por bactérias Gram-negativas, considerando que estes microrganismos costumam ser resistentes à antibioticoterapia de primeira escolha em diversas unidades de cuidados intensivos neonatais.

Nesta pesquisa foram encontrados dois RNPT no grupo com sepse clínica que apresentaram cargas bacterianas muito elevadas, os RNPT 54 e 69. Relembremos que, no grupo com sepse confirmada, a mediana de carga bacteriana foi de 37,10 UFC/mL e no grupo com sepse clínica foi de 24,49 UFC/mL. O caso 54 apresentou apenas a primeira coleta com carga bacteriana mais elevada, de 452 UFC/mL, seguida da segunda amostra negativa e da terceira amostra com 2,0 UFC/mL. No caso 69, as três mensurações foram bastante elevadas (41.419 UFC/mL, 18.930 UFC/mL e

18.817 UFC/mL) e este era o RNPT cuja mãe foi tratada por sepse. Considerando que os dois RNPT evoluíram bem com o esquema antibiótico de primeira escolha (ampicilina e gentamicina), estes dois casos sugerem que, no presente estudo, cargas bacterianas muito elevadas não se encontravam associadas à falha terapêutica ou a mau prognóstico.

No grupo de RN com sepse clínica, em seis dos 41 casos todas as qPCR foram negativas. Desde que a evolução clínica destes RN tenha sido favorável, a presença de hemocultura e qPCR negativas, considerando a capacidade da qPCR em detectar quantidades muito baixas de bactérias, poderia embasar a decisão médica de suspensão mais precoce do tratamento. Levando-se em consideração que os antibióticos são administrados por períodos de sete a 14 dias, em casos mais graves por três semanas, a qPCR poderia ser útil na redução dos custos hospitalares e do tempo de internação destes RN.

O custo para a realização de uma hemocultura por técnica totalmente automatizada, identificação do microrganismo e realização do antibiograma seria de aproximadamente R\$170,00, em relação à cerca de R\$160,00 por qPCR, considerando a extração de DNA, amplificação de uma amostra do caso suspeito que seria testada em duplicata, criação da curva de calibração de seis pontos (em duplicata), além dos dois controles negativos representados pelo DNA de um RN sabidamente não infectado (em duplicata), além de uma amostra contendo água estéril em lugar de DNA (*non template*) também testada em duplicata. Estes valores, tanto para a hemocultura, quanto para a qPCR não levam em conta o uso dos

equipamentos, os contratos de manutenção, e o salário dos recursos humanos que executam os testes. Apesar dos custos serem aparentemente comparáveis, a hemocultura identifica o microrganismo e sua sensibilidade aos antibióticos, enquanto a vantagem da qPCR, proposta nesta pesquisa, reside na rapidez de liberação dos resultados e na excelente sensibilidade analítica.

Dentre os 30 casos do total de 32 com sepse confirmada que foram positivos pela qPCR e pela hemocultura, em 14 casos (46,6%) a qPCR foi capaz de antecipar o diagnóstico por ter sido positiva em amostra anterior àquela que foi positiva por hemocultura. Este fato é de extrema importância considerando a elevada mortalidade da sepse neonatal e o impacto que o diagnóstico mais precoce poderia causar neste parâmetro.

Com relação ao monitoramento por qPCR dos RN em tratamento para sepse, observamos que, em geral, as cargas bacterianas não foram elevadas, mesmo no tempo zero (< 50 UFC/mL), isto é, antes da introdução dos antibióticos. Nos estudos de sepse neonatal e qPCR existentes na literatura (JORDAN et al., 2005; OHLIN et al., 2008; WU et al., 2008; CHENG et al., 2009; CHAN et al., 2009; OHLIN et al., 2012; LIU et al., 2014) os resultados das amplificações foram usados apenas de forma qualitativa (positivo ou negativo) para serem comparados aos resultados das hemoculturas. Nestes trabalhos, o limiar de detecção foi semelhante ao encontrado na qPCR do presente estudo (>1 UFC/mL) em alguns relatos, e em outros foi mais elevado (10 - 10^2 UFC/mL). ZUCOL et al. (2006) estudaram três pares de iniciadores distintos (todos da sequência 16S rDNA de bactérias) e três

protocolos de extração de DNA diferentes, utilizando para os testes um painel contendo 22 espécies de bactérias, tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas, obtendo ao final limiares de sensibilidade variando de 40 a 400 UFC/mL. Ressalta-se que não foram testadas amostras de pacientes, e sim isolados de bactérias. No estudo de Wu et al. (2008) os autores utilizaram técnica de amplificação quantitativa seguida por hibridização com sondas específicas para Gram-positivos e Gram-negativos, e o limiar de detecção ficou entre 20 e 60 UFC/mL. Caso este teste tivesse sido aplicado à casuística da presente pesquisa, 10 dos 32 casos de sepse confirmada (10/32 – 31,25%) não teriam sido detectados, assim como 20 dos 41 casos de sepse clínica (20/41 – 48,78%) pelo fato de terem apresentado carga bacteriana abaixo do limiar estabelecido no trabalho de Wu et al. (2008).

A presente pesquisa nos fez refletir sobre os resultados que esperávamos obter nas hemoculturas e nas qPCR nos três tempos de coleta. Os tempos de coleta adotados foram zero (momento da suspeita de sepse), 48 horas e sete dias após a introdução da antibioticoterapia para fazer com que as coletas da pesquisa coincidissem com aquelas que são rotineiramente realizadas nos berçários para diagnosticar e monitorar os RN com sepse. Nossa expectativa era encontrar a maior parte dos resultados positivos pelas duas técnicas no tempo zero (momento do diagnóstico). No tempo 48 horas, os RN que estivessem sendo eficientemente tratados já poderiam apresentar a hemocultura negativa, e em menor frequência a qPCR negativa por se tratar de método mais sensível, e no terceiro tempo de coleta (sete dias após a introdução da antibioticoterapia), esperaríamos que os dois testes fossem

negativos e pudessem ser usados como critério de cura. Ora, não foi o que aconteceu neste estudo em relação às hemoculturas, uma vez que a positividade da hemocultura foi a mesma na primeira e na terceira coleta. No entanto, o comportamento da qPCR seguiu o padrão previsto, com maior positividade na primeira amostra e declínio até a terceira amostra, sugerindo que ela possa ser usada como marcador de diagnóstico e para o monitoramento do tratamento.

Para monitorar a infecção teria sido, possivelmente, mais informativo colher a primeira amostra no momento da suspeita de sepse (tempo zero) como foi feito, a segunda amostra entre três e sete dias após a introdução da antibioticoterapia para saber se o esquema está sendo eficaz e também para detectar falhas terapêuticas e, finalmente, a terceira amostra 24 a 48 horas antes da suspensão do antibiótico para que o resultado pudesse ser usado como critério de cura e fornecesse subsídios para a suspensão do tratamento.

Dentre as principais dificuldades encontradas na presente pesquisa, citamos os protocolos empregados para a coleta das amostras de sangue para a realização das técnicas moleculares nos três grupos controle, a saber, o grupo controle de RN dos quais as amostras foram colhidas da placenta, ou as coletas feitas a partir de punção de veia periférica do antebraço de adultos jovens saudáveis que foram voluntários da pesquisa (grupo controle de São Paulo e de Cuiabá). As coletas das amostras dos três grupos controle adotaram protocolos distintos, que se mostraram inadequados uma vez que do total de 116 casos (56 RN, 30 adultos de São Paulo e 30 adultos de

Cuiabá), apenas uma amostra de um RNPT foi negativa na qPCR, e tem se mantido negativa ao longo de toda a pesquisa, apesar de já ter sido usada mais de duas dezenas de vezes nos experimentos para a padronização e validação da qPCR. O uso continuado desta amostra de DNA, que permanece negativa, demonstra que é possível executar as diferentes etapas da qPCR sem causar contaminação sistemática de amostras. Ademais, encontramos diferenças entre as medianas dos grupos controle, indicando que o protocolo usado em Cuiabá que empregou apenas álcool 70%, foi menos eficiente para a erradicação de bactérias do sítio de coleta em relação àqueles empregados em São Paulo (lavagem com água e sabão, limpeza com clorexidina alcóolica a 0,5% e álcool 70%) e em sala de parto (asepsia feita apenas com álcool 70%). Ademais, as coletas deveriam observar o uso e a troca das luvas de procedimento entre as etapas de limpeza e de coleta propriamente dita, além da limpeza do frasco de hemocultura e do tubo com EDTA para a qPCR. Também teria sido imprescindível que uma nova agulha estéril fosse usada para preencher os frascos de hemocultura e os tubos com EDTA. Aparentemente, estes procedimentos não foram seguidos nas coletas dos diferentes grupos controle, e a qPCR, sendo extremamente sensível, foi capaz de detectar bactérias. Não obstante, os resultados da qPCR nas 200 amostras dos 73 casos suspeitos de sepse demonstraram que a asepsia e coleta adequadas são possíveis, uma vez que 1/3 das amostras analisadas foram negativas.

Em um dado momento da pesquisa, foi cogitada a possibilidade de se calcular um valor de corte das cargas bacterianas obtidas dos indivíduos dos

grupos controle para estabelecer um valor de carga bacteriana acima do qual o teste deveria ser valorizado em casos suspeitos de sepse neonatal. No entanto, apesar das diferenças estatísticas encontradas entre as medianas dos valores de carga bacteriana dos RN do grupo com sepse confirmada em relação ao grupo com sepse clínica, os valores de carga bacteriana de todos os grupos (incluindo os controles) foram muito próximos, e em geral não foram elevados (< 50 UFC/mL). Ademais, foi possível verificar isolamentos em hemocultura de bactérias extremamente patogênicas em casos com valores de carga bacteriana baixos pela qPCR (1-10 UFC/mL). Caso um valor de corte tivesse sido proposto estes casos não teriam sido diagnosticados.

Outra estratégia que pensamos em adotar foi a de mudar de alvo molecular, trocando o 16S rDNA bacteriano por outra sequência nas amplificações quantitativas para trabalhar com uma ferramenta de menor sensibilidade analítica, aumentando as chances das amplificações resultarem negativas. Mais uma vez, tivemos que abandonar esta ideia pelo fato de existirem na casuística, casos confirmados de sepse neonatal (hemoculturas positivas), nos quais a carga bacteriana mensurada pela qPCR foi baixa (1-10 UFC/mL). Uma ferramenta molecular com menor sensibilidade analítica teria ocasionado muitos resultados falso-negativos, como já foi relatado (CUCHACOVICH, 2006). É preciso enfatizar que basta uma unidade formadora de colônia para que bactérias se multipliquem gerando resultados positivos em hemocultura após alguns dias de incubação, principalmente se o RN apresentar outros fatores predisponentes para o desenvolvimento de sepse, tais como prematuridade, baixo peso,

insuficiência respiratória, anoxia neonatal, associados ou não a alterações maternas tais como amniorrexe prematura, infecção urinária materna (XU et al., 2003; REIER-NILSEN et al., 2009).

Outra observação de fundamental importância para a compreensão do desempenho da qPCR que foi padronizada e validada nesta pesquisa é que, apesar do que ocorreu com os três grupos controle testados, nem todos os resultados foram positivos e resultantes de “contaminação das amostras” quando o sistema de amplificação foi validado, isto é, quando as amostras de DNA de RN com suspeita de sepse foram testadas. Das 200 amostras de DNA obtidas de 73 RN com suspeita de sepse, 135 amostras (67,5%) foram positivas e 65 (32,5%) negativas, correspondendo a aproximadamente 2/3 e 1/3 do total. Considerando que os 73 RN incluídos na pesquisa apresentavam quatro alterações clínicas e/ou laboratoriais sugestivas de sepse, esta proporção está de acordo com o que esperávamos encontrar.

Apesar dos resultados de qPCR dos grupos controle terem provocado uma quantidade enorme de trabalho laboratorial, eles nos alertaram que se trata de condição imprescindível para a implantação da qPCR na rotina laboratorial para o diagnóstico da sepse neonatal, a adoção de protocolos de colheita de hemoculturas e de sangue para a qPCR que gerem resultados sistematicamente negativos. O emprego de uma técnica tão sensível quanto esta qPCR, cujo alvo é um fragmento de uma região conservada do gene 16S rDNA bacteriano, nos permite detectar, nos dias atuais, quantidades tão pequenas de bactérias que não eram passíveis de detecção por métodos convencionais, mas que provavelmente sempre existiram. Estas dificuldades

em relação a grupos controle de qPCR já foram descritas por outros autores (MÜHL et al., 2010).

Outra etapa crucial para a realização da qPCR é a extração de DNA das amostras. Já foi mencionada a importância do emprego da enzima lisozima para a quebra da parede celular de bactérias (NOGUEIRA et al., 2004; ZUCOL et al., 2006; CHAN et al., 2009), uma vez que é conhecido o fato das bactérias, notadamente as Gram-positivas apresentarem uma parede celular mais rígida e conseqüentemente mais difícil de ser rompida. Além disso, as extrações devem observar condições bastante rigorosas de esterilidade. Sendo assim, todo o material descartável tem que ser autoclavado, as micropipetas limpas de forma exaustiva e submetidas a ciclos de descontaminação em luz ultravioleta, e os reagentes do kit de extração filtrados em filtros capazes de reter bactérias (0,22 μm). É oportuno lembrar que se o material estiver contaminado com bactérias e for autoclavado, ainda assim existe a possibilidade de detecção do fragmento 16S rDNA caso ele ainda não tenha sofrido degradação (MÜHL et al., 2010). Apesar de serem absolutamente indispensáveis, esses procedimentos tornam a realização da qPCR mais demorada, exigindo a atuação de recursos humanos extremamente treinados.

Quanto à qPCR, o preparo da mistura de reagentes das amplificações em sala destinada a este propósito também requereu manipulação em condições estéreis, com o manipulador utilizando avental, luvas estéreis, gorro e máscara, além da filtração de todos os reagentes em filtros 0,2 μm , que foram a seguir aliquotados e usados uma única vez. KLASCHIK et al.

(2002) compararam diferentes métodos de descontaminação de reagentes para a detecção de cargas bacterianas por qPCR tais como o emprego de *DNAse*, irradiação por luz ultravioleta sozinha ou associada ao uso do 8-metoxipsolareno e endonucleases de restrição, utilizando como alvo o 16S rDNA. Os autores verificaram que todos os métodos falharam na eliminação total dos contaminantes presentes nos reagentes, tornando o procedimento muito mais demorado e reduzindo significativamente a sensibilidade analítica da qPCR.

No presente estudo os procedimentos realizados para evitar a contaminação de reagentes, já mencionados, foram suficientes para garantir a negatividade dos controles negativos da reação de qPCR (água estéril autoclavada e filtrada, e DNA de RN sabidamente não infectado). Estas amostras foram testadas em todos os experimentos e foram repetidamente negativas.

Muito embora existam mais de 300 estudos na literatura sobre a utilização da qPCR para o diagnóstico de sepse, apenas sete estudos foram realizados em RN, com amplificações qualitativas ou quantitativas que empregaram a mesma sequência alvo que foi utilizada no presente estudo, ou seja, a 16S rRNA de bactérias, também chamada de 16S rDNA quando se faz menção ao gene que codifica a porção 16S do rRNA bacteriano. Existe ainda uma revisão sistemática sobre o diagnóstico molecular de sepse, porém englobando vários tipos de técnicas, não apenas amplificações quantitativas.

O primeiro estudo na literatura que utilizou uma qPCR com a sequência 16S rRNA para diagnosticar casos de sepse neonatal foi descrito por JORDAN et al. (2005). Estes autores elaboraram uma qPCR com sondas de hidrólise (tecnologia Taqman), mais elaborado e de custo mais elevado que o usado no presente estudo. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue com o auxílio de um kit comercial. O limite de detecção do ensaio no termociclador *Smart Cycler* foi de 40, 50, ou 2.000 CFU/mL de *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente, quando a contagem de leucócitos do sangue periférico se encontrava abaixo de 39.000/mm³. A qPCR necessitou de quatro horas para ser realizada, em comparação a 24-48 horas para a detecção de crescimento de microrganismos em cultura, ou cinco dias para definir o não crescimento em cultura. A concordância entre os resultados de cultura e da qPCR foi de 94,1%. Estes resultados sugeriram que as técnicas moleculares poderiam ser realizadas juntamente com as culturas para o diagnóstico de sepse neonatal, principalmente em RN cujas mães haviam recebido profilaxia antibiótica nos períodos pré e intraparto.

OHLIN et al. (2008) avaliaram uma qPCR para o diagnóstico de bacteremia neonatal. Neste estudo, 295 amostras de plasma de 288 recém-nascidos com suspeita de sepse neonatal foram colhidas de forma prospectiva para a realização do teste molecular cujo alvo era o gene que codifica a porção 16S do rRNA bacteriano. As amplificações empregaram sondas específicas para detectar bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, e outras duas sondas para a identificação de *Staphylococcus aureus* e

Staphylococcus coagulase negativa (tecnologia com sondas de hidrólise). Todas as amostras positivas na qPCR foram posteriormente sequenciadas para a identificação bacteriana. Dentre os 50 RN com hemoculturas positivas e 245 RN com hemoculturas negativas, a PCR em tempo real mostrou uma sensibilidade de 42%, especificidade de 95%, valor preditivo positivo de 64% e valor preditivo negativo de 89%. Este estudo foi pioneiro na aplicação de uma qPCR com sondas de hidrólise para a diferenciação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e identificação inequívoca de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa em amostras de RN com suspeita de sepse. O método conseguiu detectar bacteremia com elevada especificidade, embora a sensibilidade tenha sido baixa.

WU et al. (2008) desenvolveram uma qPCR para a detecção e diferenciação de bactérias com iniciadores da sequência 16S rDNA diretamente de amostras de sangue de RN com suspeita de sepse. A diferenciação das bactérias Gram-positivas e negativas foi realizada com sondas específicas. Inicialmente, 53 cepas bacterianas clinicamente relevantes (25 Gram-positivas e 28 Gram-negativas) foram corretamente identificadas pelas sondas da qPCR. O limiar de detecção variou de acordo com a bactéria, tendo sido de 3,0 UFC/50µL (60 UFC/mL) para o *Staphylococcus aureus* e de 1,0 UFC/50µL (20 UFC/mL) para a *Escherichia coli*. A seguir, 600 amostras de sangue de RN com suspeita de sepse foram analisadas por qPCR e hemocultura. A qPCR foi positiva em 50 amostras (8,33%) e a hemocultura em 34 (5,67%). A diferença de desempenhos foi estatisticamente significativa ($p=0,00003$). Quando a hemocultura foi usada

como referência, a qPCR obteve sensibilidade de 100% e especificidade de 97,17%, com acurácia de 0,972. O estudo concluiu que a qPCR poderia ser útil para o diagnóstico rápido e acurado de infecções bacterianas neonatais e poderia causar impacto no uso inapropriado e desnecessário de antibióticos.

CHEN et al. (2009) desenvolveram um método para a detecção de agentes patogênicos bacterianos em casos de sepse e meningite bacteriana neonatal com iniciadores da sequência 16S rRNA em amplificações quantitativas com marcação fluorescente (metodologia semelhante a da presente pesquisa). Um total de 190 amostras de sangue e cinco amostras de líquido de RN com suspeita de sepse ou meningite bacteriana foram avaliados pela qPCR com marcação fluorescente do alvo 16S rRNA. A positividade da qPCR foi significativamente mais elevada (25/195 - 12,82%) em relação à positividade das hemoculturas (15/195 - 7,69%), $p=0,002$. Quando a cultura bacteriana foi utilizada como teste de referência, a sensibilidade da PCR em tempo real foi de 100%, a especificidade foi de 94,4%, e a concordância entre os testes foi de 94,4%. Este estudo concluiu que a PCR em tempo real com marcação fluorescente do alvo 16S rRNA é um método preciso e promissor para a detecção de agentes patogênicos bacterianos em casos de sepse e meningite bacteriana neonatal.

CHAN et al. (2009) realizaram uma pesquisa em 218 RN com suspeita de sepse, sendo que em 42 RN (19,27%) a hemocultura foi positiva e em 176 (80,73%) ela foi negativa. O estudo avaliou a utilidade da qPCR associada a sondas específicas para a detecção e diferenciação de bactérias Gram-positivas e negativas. Para infecções causadas por Gram-positivos a qPCR

identificou 14 de 19 episódios, e considerando as hemoculturas como teste de referência, foram calculadas a sensibilidade e especificidade da qPCR, resultando em 73,7% e 98,5%, respectivamente. Nas infecções por Gram-negativos, a qPCR foi positiva em 19 de 22 casos, com sensibilidade e especificidade de 86,4% e 99,0%, respectivamente. De forma surpreendente, a hemocultura foi negativa em cinco RN com peritonite e a qPCR foi positiva e identificou a bactéria no sangue periférico nos cinco casos. Os autores concluíram que a técnica é altamente específica e rápida, permitindo a identificação e diferenciação de bactérias Gram-positivas e negativas na corrente sanguínea de RN, e em casos de infecções graves, tais como peritonites associadas à enterocolites, notadamente em RNPT, tendo sido possível disponibilizar o resultado da qPCR em 5 horas. Os autores concluíram que um teste positivo por qPCR é capaz de confirmar a infecção bacteriana muito antes da hemocultura, servindo de guia para predição da patogenicidade do agente causador da infecção considerando que a amplificação detecta, quantifica e indica se a infecção é causada por bactéria Gram-positiva ou negativa, desta forma contribuindo para que os RN em estado crítico recebam o tratamento adequado.

OHLIN et al. (2012) desenvolveram uma nova qPCR para a detecção de DNA bacteriano em amostras de sangue coletadas de RN com suspeita de sepse neonatal. Imediatamente após a coleta de sangue para a hemocultura, uma amostra de sangue com volume entre 0,5-1,0 mL foi coletada e usada para a qPCR com iniciadores da sequência 16S rDNA. Todas as amostras positivas foram sequenciadas. Todos os casos com resultados discordantes

foram exaustivamente analisados. O estudo compreendeu 368 amostras de 317 RN. Quando o desempenho da qPCR foi calculado com base nos resultados das hemoculturas, a sensibilidade foi de 79 %, a especificidade foi de 90%, o valor preditivo positivo foi de 59% e o valor preditivo negativo foi de 96%. Em sete das 31 amostras (22,58%) com resultado positivo na qPCR e negativo na hemocultura, o diagnóstico de sepse foi definido por outros parâmetros. Este estudo apresentou a avaliação de uma nova qPCR capaz de detectar sepse com cultura positiva (casos confirmados) e negativa (casos de sepse clínica), sugerindo ainda que a PCR tenha o potencial para detectar bactérias em amostras com cultura negativa, mesmo após o início da antibioticoterapia intravenosa.

PAMMI et al. (2012) realizaram uma revisão sistemática sobre o desempenho de diferentes métodos moleculares para o diagnóstico de sepse neonatal com o objetivo de determinar se seriam capazes de substituir as hemoculturas. Dentre os 23 trabalhos selecionados havia amplificações convencionais, multiplex e amplificações quantitativas (oito estudos). Os autores estabeleceram como sensibilidade a ser alcançada pelos testes moleculares o patamar de 98%, especificidade de 95%, e os dados foram analisados em relação à idade gestacional, tipo de RN (termo ou pré-termo) e tipo de sepse (precoce ou tardia). Foram incluídos estudos caso-controle e estudos prospectivos comparando o desempenho dos diferentes testes moleculares com as hemoculturas. Com base nos 23 estudos analisados, a estimativa geral de sensibilidade e especificidade foi de 90% (IC 95%: 78-95) e 96% (IC 95%: 94-97), respectivamente. As amplificações quantitativas e as

amplificações com iniciadores universais para bactérias selecionados na sequência 16S rDNA foram as que apresentaram maior sensibilidade e especificidade. Os dados foram insuficientes para avaliar a idade gestacional e o tipo sepse nos subgrupos de RN. A revisão sistemática concluiu que os testes moleculares não têm, ao menos por enquanto, sensibilidade suficiente para substituir as culturas microbianas no diagnóstico de sepse neonatal, mas podem ser realizadas como exames complementares.

LIU et al. (2014) comparou o desempenho de uma PCR convencional cujo alvo é o 16S rRNA com a cultura de sangue para o diagnóstico de sepse bacteriana neonatal. Além disso, a relação entre fatores de risco, sinais clínicos, parâmetros laboratoriais e o diagnóstico de sepse foi considerada. Houve suspeita de sepse em 706 RN internados na UTI neonatal dos quais uma amostra de sangue foi colhida e submetida à cultura e a PCR. O número de culturas positivas e os resultados positivos da PCR foram 95 (13,5%) e 123 (17,4%), respectivamente. Para o cálculo da sensibilidade do teste foram considerados verdadeiros positivos apenas as amostras que tiveram os dois testes positivos, e para calcular a especificidade, apenas as amostras que tiveram os dois testes negativos. Ademais, foram computadas as amostras com resultados discrepantes, isto é, positivas apenas por uma das técnicas. Usando estes dados, a PCR atingiu uma sensibilidade 100,0%, especificidade de 95,4 %, valor preditivo positivo de 77,2 %, e valor preditivo negativo de 100%. Neste estudo, os escores de Apgar no 5º minuto, peso ao nascimento, icterícia, irritabilidade, dificuldade de alimentação, idade gestacional, amniorrexe prematura, contagem de plaquetas, índice

neutrofilico e aumento acentuado da Proteína C Reativa foram fundamentais para o estabelecimento do diagnóstico de sepse nos RN. O estudo concluiu que a PCR convencional 16S rRNA aumentou a sensibilidade para a detecção dos casos de sepse, com maior rapidez em relação as hemoculturas, encurtando o tempo de tratamento. No entanto, a incerteza sobre a causa bacteriana de sepse não foi reduzida por este método tendo em vista que a técnica não permite a definição de espécie. Sendo assim, os autores consideraram que a hemocultura é atualmente insubstituível, uma vez que isolados puros de bactérias são essenciais para a realização do teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas podendo, desta forma, a PCR ocupar um lugar como teste complementar ao diagnóstico laboratorial da sepse bacteriana neonatal.

O presente estudo utilizou um número maior de critérios de inclusão, tanto clínicos quanto laboratoriais, além de um novo sistema de amplificação quantitativa que emprega iniciadores diferentes daqueles usados por outros autores, impossibilitando desta forma a comparação de nossos resultados com os acima descritos. Também não pudemos calcular a sensibilidade, especificidade e valores preditivos da hemocultura em relação à qPCR devido a falta de amostras verdadeiramente negativas em número suficiente oriundas de RN colhidas em sala de parto e dos adultos jovens saudáveis, muito embora todos os experimentos de qPCR tenham empregado amostras de DNA de RN sabidamente não infectados, além de amostras contendo água estéril em lugar de DNA. Não obstante, os resultados da presente pesquisa apontam a superioridade da qPCR em relação à hemocultura para a

confirmação do diagnóstico laboratorial de sepse neonatal, fato demonstrado pelo desempenho da qPCR notadamente no grupo de RN com sepse clínica. Ademais, a qPCR foi importante para a antecipação do diagnóstico em número significativo de RN. Os resultados desta pesquisa também sugerem que a PCR também possa ser usada para o monitoramento do tratamento da sepse, uma vez que os valores de carga bacteriana apresentaram flutuações, muitas vezes coincidindo com a evolução e o desfecho clínico dos casos (alta/cura ou óbito). No entanto, estudos prospectivos com casuísticas mais numerosas, contando com amostras colhidas de forma seriada dos RN em tratamento são necessários para comprovar estes dados.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1- Na presente pesquisa uma técnica de amplificação quantitativa (qPCR) para a detecção de fragmento do gene 16S rDNA bacteriano foi padronizada e validada com sucesso utilizando amostras de sangue de recém-nascidos com suspeita de sepse, e hemocultura positiva ou negativa.

2- Dos 73 casos suspeitos de sepse neonatal, a hemocultura foi positiva em 32 casos (43,8%) e a qPCR foi positiva em 65 (89,0%). Considerando as 200 amostras obtidas destes 73 RN, a hemocultura foi positiva em 36 amostras (18,0%) e a qPCR em 135 amostras (67,5%). A confirmação do diagnóstico feita no momento da suspeita de sepse (tempo zero) encontrou hemoculturas positivas em 11 casos (15%), e qPCR positiva em 48 casos (65,75%) do total de 73 casos suspeitos, isto é, 22 dos 32 RN com sepse confirmada e 26 dos 41 RN com sepse clínica.

3- A qPCR apresenta potencial para monitorar o tratamento de RN com sepse confirmada e clínica por ser capaz de detectar cargas bacterianas variando de extremamente baixas até muito elevadas. Os resultados da presente pesquisa apresentaram, em vários casos, associação com a evolução (alta/cura ou óbito). No entanto, com a casuística analisada, não é possível afirmar que a técnica poderia ser usada como marcador de sucesso ou falha terapêutica, ou como critério de cura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade SM, Soares DA, Matsuo T, Souza RKTS, Mathias TAFM, Iwakura MLH, Zequim MA. Condições de vida e mortalidade infantil no estado do Paraná, Brasil, 1997-2001. *Cad Saúde Pública*. 2006;22:181-9.
2. Araújo BF, Bozzetti MC, Tanaka ACA. Mortalidade neonatal precoce no município de Caxias do Sul: um estudo de coorte. *J Pediatr*. 2000;76:200-6.
3. Araujo MRE. Hemoculturas - Recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *J Infect Control*. 2012;1:8-19.
4. Arkader R, Troster EJ, Lopes MR, Junior RR, Carcillo JA, Leone C, Okay T.S. Procalcitonin does discriminate between sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Arch Dis Child*. 2006;91:117-20.
5. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated Protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001;344:699-709.
6. Berner R, Welter PA, Brandis M. Cytokine expression of cord and adult blood mononuclear cells in response to *Streptococcus agalactiae*. *Pediatr Res*. 2002;51:304-9.
7. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101:1644-55.
8. Bustin SA, Hands RE, Nolan T. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1:1559-82.
9. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4):840-62.
10. Carey AJ, Saiman L, Polin RA. Hospital-Acquired Infections in the NICU: Epidemiology for the new millennium. *Clin Perinatol*. 2008;35:223-49.
11. Ceccon MEJ, Feferba UMR, Giolo CR, Vieira RA, Diniz EMA, Krebs VJ, Araujo MCK, Galvani ALS, Vaz FAC. Neonatal sepsis - comparative analysis between two decades (1977-1987 and 1988-1998) in relation

- to incidence, etiologic agents and morbimortality. *Pediatrics (São Paulo)*. 1999;21(4):287-97.
12. Ceccon ME, Vaz FA, Diniz EM, Okay TS. Interleukins 6 and C-reactive protein for the diagnosis of late onset sepsis in the newborn infant. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52:79-85.
 13. Chan KYY, Lam HS, Cheung HM, Allen KC, Chan AKC, Li K, Fok TF. Rapid identification and differentiation of Gram-negative and Gram-positive bacterial bloodstream infections by quantitative polymerase chain reaction in preterm infants. *Crit Care Med*. 2009;37:2441-7.
 14. Cheng AC, West TE, Peacock SJ. Surviving sepsis in developing countries. *Crit Care Med*. 2008;36:2487-8.
 15. 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*. 2009;48:641-7.
 16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Principles and procedures for blood cultures*; approved guideline. CLSI document M47-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Pennsylvania, USA, 2007.
 17. Costa TX, Silveira JR, Dantas TAC, Alves EC. *Avaliação do perfil epidemiológico de bactérias confirmadas por hemocultura em neonatos*. 2001. Disponível em <http://www.paulomargotto.com.br/documentos/perfildamicro.doc> (acesso em 12/03/2012).
 18. Couto RC, Carvalho EAA, Pedrosa TMG, Pedroso ER, Neto MC, Biscione FM. A 10-year prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units. *Am J Infect Control*. 2007;35:183-9.
 19. Cuchacovich R. Clinical applications of the polymerase chain reaction: an update. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20:735-58.
 20. Cunha MLRS, Lopes AMC, Rugolo MSSL. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. *Rev Chil Pediatr*. 2004;75:283-4.
 21. Cunneen JE, Cartwright M. The puzzle of sepsis. Fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. *AACN Clinical Issues*. 2004;15:18-44.
 22. Duarte CMRD. Qualidade de vida e indicadores de saúde: aspectos da mortalidade infantil no Estado do Rio de Janeiro e suas regiões. *Cad Saúde Pública*. 1992;8:414-27.
 23. Duarte JLMB, Mendonça GAS. Comparação da mortalidade neonatal em recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento, em

maternidades do município do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2005;21:1141-7.

24. Drumond EF, Machado CJ, França E. Óbitos neonatais precoces: análise de causas múltiplas de morte pelo método Grade of Membership. *Cad Saúde Pública*. 2007;23:157-66.
25. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:165-256.
26. Ferreira LE, Dalposso K, Hackbarth BB, Gonçalves AR, Westphal GA, França PHC, Pinho MSL. Painel molecular para detecção de microrganismos associados à sepse. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23:36-40.
27. Fiolo K, Zanardi CE, Salvadego M, Bertuzzo CS, Amaral E, Calil R, Levy CE. Taxa de infecção e sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34:544-9.
28. Freij BJ, Mccracken GHJ. Acute infections. In: Avery GB, MacDonald MG, Seshia MMK, Mullett MD. *Avery's neonatology pathophysiology and management of the newborn*. 5th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1999. p.1082-116.
29. Garcia VD. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:349-59.
30. Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol*. 1991;18:361-81.
31. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 1994;32:335-51.
32. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International consensus conference on pediatric sepsis, definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6:2-8.
33. Goulart AP, Valle CF, Dal-Pizzol F, Cancelier ACL. Fatores de risco para o desenvolvimento de sepse neonatal precoce em hospital da rede pública do Brasil. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2006;18:148-53.
34. Guembe M, Marin M, Rabadán PM, Echenagusia A, Camúñez F, Rosales GR, Simó G, Echenagusia ME, Bouza E. Use of Universal 16S rRNA Gene PCR as a Diagnostic Tool for Venous Access Port-Related Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol*. 2013;51:799-804.

35. Hickey MS, Mccracken GJR. Postnatal bacterial infections. In: Fanaroff AA, Martin RJ. *Neonatal-Perinatal Medicine. Diseases of the fetus and infants*. 6th ed. Philadelphia: Mosby-Year Book Inc.; 1997. p.717-801.
36. Hudome SM, Fisher MC. Nosocomial infections in the Neonatal Intensive Care Unit. *Curr Opin Infect Dis*. 2001;14:303-7.
37. IPEA -Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada e Secretaria de Planejamento e Investimento Estratégicos (SPI/MP). *Objetivos de Desenvolvimento do Milênio – Relatório Nacional de Acompanhamento – Brasília: Ipea, 2010.*
38. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2761-4.
39. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2574-8.
40. Jordan JA, Durso MB, Butchko AR, Jones JG, Brozanski A. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detecting Bacterial DNA Directly from Blood of Neonates - Being Evaluated for Sepsis. *J Mol Diagn*. 2005;7:575-81.
41. Juretic E, Urarevic B, Petroveckii M, Juretic A. Two color flow cytometric analysis of preterm and term newborn lymphocytes. *Immunobiology*. 2000;202:421-8.
42. Juretic E, Juretic A, Urarevic B, Petroveckii M. Alterations in lymphocyte phenotype of infected preterm newborns. *Biol Neonate*. 2001;80:223-7.
43. Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Hoeft A, Stuber F. Comparison of Different Decontamination Methods for Reagents to Detect Low Concentrations of Bacterial 16S DNA by Real-Time-PCR. *Mol Biotechnol*. 2002;22:231-42.
44. Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2:299-305.
45. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*. 1999;115:462-74.
46. Krebs VLJ, Ceccon MEJR, Feferbaum R. Sepsis no período neonatal. In: Marcondes E, Vaz FAC, Ramos JL, Okay Y. *Pediatria básica Tomo I: pediatria geral e neonatal*. 9th ed. São Paulo: Sarvier; 2003.p.560-58.
47. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma A, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial

therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34:1589-96.

48. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. For the Lancet neonatal survival steering team. Four million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet.* 2005;365:891-900.
49. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. *Manual of clinical microbiology.* Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1985.
50. Levy MM, Fink MP, Marshal JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. For the International sepsis definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med.* 2003;3:1250-6.
51. Lewis DB, Wilson CB. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility to infection. In: Remington JS, Klein JO. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2011.p.80-191.
52. Liu CL, Ai HW, Wang WP, Chen L, Hu HB, Ye T, Zhu XH, Wang F, Liao YL, Wang Y, Ou G, Xu L, Sun M, Jian C, Chen ZJ, Li L, Zhang B, Tian L, Wanga B, Yan S, Sun ZY. Comparison of 16S rRNA gene PCR and blood culture for diagnosis of neonatal sepsis. *Arch Pediatr.* 2014;21:162-9.
53. Magrini L, Gagliano G, Travaglino F, Vetrone F, Marino R, Cardelli P, Salerno G, Di Somma S. Comparison between white blood cell count, procalcitonin and C reactive protein as diagnostic and prognostic biomarkers of infection or sepsis in patients presenting to emergency department. *Clin Chem Lab Med.* 2014;6:1555-610.
54. Manroe BL. The neonatal blood count in health and disease. *J Pediatr.* 1979; 95:89-98.
55. Matos GFJ, Victorino JA. Diagnosis Criteria for Sepsis, Severe and Septic shock. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2004;16(2):102-4.
56. Meireles LA, Vieira AA, Costa CR. Avaliação do diagnóstico da sepse neonatal: uso de parâmetros laboratoriais e clínicos como fatores. *Rev Esc Enferm USP.* 2011;45:33-9.
57. Ministério da Saúde. *Rede Interagencial de Informações para a Saúde. Indicadores de dados básicos - IDB 2006* [Internet]. Brasília: RIPSA; 2007 [acesso 2012 nov.]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2007/c01.htm>. Acesso em (12/04/2012).
58. Ministério da Saúde, OPAS, Bireme, Fiocruz, Abrasco, CNS, Conass e Conasems. Mortalidade Perinatal - fetal e neonatal precoce. EVIPNet

Brasil - Maio 2010. Disponível em: <http://brasil.evipnet.net> (Acesso em 09/01/2014).

59. Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39:396-401.
60. Mühl H, Kochem AJ, Disqué C, Sakka SG. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2010;66:41-9.
61. Mukai AO, Krebs VL, Bertoli CJ, Okay TS. TNF-alpha and IL-6 in the diagnosis of bacterial and aseptic meningitis in children. *Pediatr Neurol*. 2006;34:25-9.
62. Mularoni A, Madrid M, Azpeitia A, Valls I, Soler A. The role of coagulase-negative staphylococci in early onset sepsis in a large European cohort of very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33:121-5.
63. Nascimento S, Rabello SE, Pinhal MAS. Real time PCR and RT-PCR technology and its applications in the medicine field. *RBM*. 2011;10:67-70.
64. Nakajima-Iljima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: Interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:6133-7.
65. Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, Dean N, File T, Fine MJ, Gross PA, Martinez F, Marrie TJ, Plouffe JR, Ramirez J, Sarosi GA, Torres A, Wilson R, Yu VL. American Thoracic Society. Guidelines for the Management of Adults with Community-acquired Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1730-54.
66. Nizet V, Klein JO. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS, Klein JO. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2011. p.222-75.
67. Nogueira CAM, Momesso CAS, Machado RLD, Almeida MTG, Rossit ARB. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. *Rev Pan Infect*. 2004;69:35-8.
68. Novais CM, Alves MP. qPCR em Tempo Real. *Biotecnologia Cien Desenvol*. 2004;33:10-3.
69. Ohlin A, Bäckman A, Bjorkqvist M, Molling P, Jurstrand M, Schollin J. Real-time PCR of the 16S-rRNA gene in the diagnosis of neonatal bacteraemia. *Acta Paediatr*. 2008;97:1376-80.

70. 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.
71. Ozkan H1, Cetinkaya M, Koksall N, Celebi S, Hacimustafaoglu M. Culture-proven neonatal sepsis in preterm infants in a neonatal intensive care unit over a 7 year period: Coagulase-negative *Staphylococcus* as the predominant pathogen. *Pediatr Int*. 2014;56:60-6.
72. Palmeira P, Quinello C. Silveira-Lessa NA, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:985646.
73. Pammi M, Flores A, Leeftang M, Versalovic J. Molecular Assays in the Diagnosis of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*. 2012;128:973-85.
74. Pereira AP, Dias MA, Bastos MH, da Gama SG, Leal Mdo C. Determining gestational age for public health care users in Brazil: comparison of methods and algorithm creation. *BMC Res Notes*. 2013;6:60.
75. Pinheiro RS, Ferreira LCL, Brum IR. Study of maternal risk factors associated with early-onset neonatal sepsis in a tertiary hospital of the Brazilian Amazonia. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29:387-95.
76. Polin RA. The “ins and outs” of neonatal sepsis. *J Pediatr*. 2003;143(1):3-4.
77. 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;9:5.
78. Schmutz N, Henry E, Jopling J, Christensen RD. Expected ranges for blood neutrophil concentration of neonates: the Manroe and Mouzinho charts revisited. *J Perinatol*. 2008;28:275-81.
79. Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence*. 2014;5:170-8.
80. Shang S, Cheng G, Wu Y, Du L, Zaho Z. Rapid diagnosis of bacterial sepsis with PCR amplification and microarray hybridization in 16S rRNA gene. *Pediatr Res*. 2005;58:143-8.
81. Slade E, Tamber PS, Vincent JL. The surviving sepsis campaign: raising awareness to reduce mortality. *Crit Care*. 2003;7:1-2.
82. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*. 2002a;347:240-7.

83. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002b;110(2 Pt1):285-91.
84. Sundaram V, Kumar P, Dutta S, Mukhopadhyay K, Ray P, Gautam V, Narang A. Blood culture confirmed bacterial sepsis in neonates in a North Indian tertiary care center: changes over the last decade. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62:46-50.
85. Teló EP, Machado ABMP, Schmitt VM, Chesky M. Determination of detection minimum limit by polymerase chain reaction seminested to *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *RBAC*. 2007;39:197-200.
86. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005;29:151-9.
87. Witek JL, Cusack C. Neonatal sepsis: confronting the challenge. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 1994;6:405-19.
88. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:908-34.
89. Wu YD, Chen LH, Wu XJ, Shang SQ, Lou JT, Du LZ, Zhao ZY. Gram Stain-Specific-Probe-Based Real-Time PCR for Diagnosis and Discrimination of Bacterial Neonatal Sepsis. *J Clin Microbiol* 2008;46 (8):2613-9.
90. Wynn JL, Wong HR, Shanley TP, Bizzarro MJ, Saiman L, Polin RA. Time for a Neonatal-Specific Consensus definition for sepsis. *Pediatr Crit Care Med*. 2014; Apr, 18. [Epub ahead of print].
91. Xu J, Millar BC, Moore JE, Murphy K, Webb H, Fox AJ, Cafferkey M, Crowe MJ. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis - rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol*. 2003;94:197-206.
92. Zucol F, Ammann RA, Berger C, Aebi C, Altwegg M, Niggli FK, Nadal D. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2750-9.

Anexo 1 – Características das mães dos RN do grupo de estudos.

Nº AMOSTRA	NÚMERO DE CONSULTAS PRÉ-NATAL	TIPO DE PARTO	DIAGNÓSTICOS MATERNOS E NO PARTO	GESTAÇÕES/ PARTO/ ABORTO	ANTIBIÓTICOS NA GESTAÇÃO	TEMPO DE AMNIOREXE (HORAS)
1PT	7	N	TPP+AP+ ITU	1/0/0	Ampicilina	12
3PT	6	C	AP+ITU+CO	6/3/2	Ampicilina	72
4PT	6	C	SR	6/3/2	Cefaloxina, Cefosolina, Cefalotina	Não
8PT	5	N	AP	4/3/0	Ampicilina	72
9PT	0	N	DPP	2/1/0	SR	12
11PT	4	C	AP+DHEG	1/1/0	SR	Não
12PT	1	N	SR	1/1/0	SR	12
13PT	SR	N	SR	3/1/2	SR	Não
14PT	4	N	SR	1/0/0	SR	Não
16PT	SR	C	GR	SR	SR	13
19PT	SR	C	DHEG	SR	SR	Não
20PT	SR	C	DPP	SR	SR	12
21PT	4	N	SR	3/2/0	Ampicilina	12
22PT	0	N	ITU	1/0/0	SR	Não
23PT	6	C	HAS +CO+AP	3/2/0	ATB	72
24PT	SR	C	DHEG	2/2/0	SR	120
25PT	9	C	SR	1/0/0	SR	10
28PT	4	N	SR	1/1/0	SR	12
29PT	4	C	SR	4/3/0	Cefazolina e Cefalotina	6
30PT	SR	N	SR	SR	SR	24
31PT	5	C	AP+GR+GM+ SF	3/2/0	SR	144
32PT	5	C	AP+GR+GM+ SF	3/2/0	SR	144
33PT	10	C	SR	3/2/0	Cefalotina	Não
35PT	SR	N	SR	2/1/1	SR	Não
36PT	15	C	AP+DIG	1/0/0	SR	168
37PT	6	C	ITU	2/1/0	Cefazolina	72
38PT	5	N	SR	4/3/0	SR	Sim*
39PT	SR	C	TPP	SR	SR	Não
44PT	SR	N	SR	SR	SR	Não
45PT	SR	N	SR	SR	SR	1
46PT	SR	C	SR	SR	SR	120
47PT	8	C	SR	3/2/0	SR	Não
48PT	SR	C	SR	SR	SR	Não
49PT	SR	C	SR	SR	SR	SR
50PT	0	N	LEU	8/7/0	SR	Não
51PT	SR	C	SR	SR	SR	SR
54PT	SR	N	SR	SR	SR	Não
56PT	SR	N	SR	SR	SR	SR
60PT	6	N	SR	3/2/0	Ampicilina	4
62PT	SR	C	SR	SR	SR	24
64PT	5	C	EC+HAS	1/0/0	Cefalotina	Não
65PT	SR	C	SR	SR	SR	SR

66PT	SR	C	SR	SR	SR	Não
67PT	SR	C	SR	SR	SR	SR
68PT	SR	C	SR	SR	SR	Não
69PT	SR	C	Sepse	SR	SR	Não
71PT	SR	C	SP	SR	SR	Não
73PT	SR	C	ITU	SR	SR	SR
76PT	SR	N	SR	SR	SR	120
77PT	SR	N	SR	SR	SR	48
78PT	SR	C	SR	SR	SR	Não
2T	10	N	SR	1/0/0	Cefalexina	Não
5T	10	C	SR	1/0/0	Cefazolina e Cefalotina	12
6T	0	N	ITU	7/6/0	Ampicilina	12
7T	SR	N	SR	1/1/0	SR	Não
10T	SR	N	SR	SR	SR	Não
15T	10	N	SR	1/1/0	SR	Não
17T	8	N	SV	SR	SR	Não
18T	SR	N	SR	SR	SR	120
26T	6	N	DHEG	3/1/1	SR	6
34T	6	C	AP	1/0/0	SR	Não
40T	SR	N	SR	SR	SR	120
41T	SR	C	SR	SR	SR	Sim*
53T	SR	N	SR	SR	SR	Não
54T	SR	N	SR	SR	SR	SR
59T	4	C	DPP	4/3/0	SR	Não
63T	5	C	DCF + SF	2/1/0	SR	Não
70T	SR	N	SR	SR	SR	Não
72T	SR	C	ITU	2/2/0	SR	Não

T- Termo; PT – Pré-termo; C- Parto Cesáreo; N – Parto Normal; CO- Corioamnionite; DIG- Diabetes Gestacional; DPP- Descolamento Prematuro de Placenta; EC- Eclâmpsia; GR- Gestação de Risco; HAS- Hipertensão Arterial Sistêmica; ITU- Infecção do Trato Urinário; TPP- Trabalho de Parto Prematuro; SP -Sequelas de Poliomielite; DHEG- Doença Hipertensiva Específica da Gravidez, DCF- Displasia Cortical Focal; LEU- Leucorreia; AP- Amniorrexe Prematura; SV- Sangramento Vaginal; GM- Gemelar; SF- Sofrimento Fetal (presença de mecônio em líquido amniótico); SR – Sem Registro. Sim* – na coluna de amniorrexe prematura se existe registro positivo, porém sem o número de horas.

Anexo II. Resultados individuais da qPCR do grupo de sepse confirmada, sepse clínica e controles nos diferentes tempos de coleta.

Resultados da qPCR dos 32 RN com sepse confirmada nos diferentes tempos de coleta.

Identificação	CT	Tm	Quantificação (UFC/mL)
2T1	36,324	83,786	11,162
2T2	34,633	83,786	39,460
2T3	não determinado	64,854	não detectável
5T1	não determinado	61,405	não detectável
5T2	não determinado	64,710	não detectável
5T3	34,784	83,642	49,856
7T1	31,902	83,783	120,950
7T2	não determinado	64,695	não detectável
7T3	não determinado	64,695	não detectável
10T1	32,297	83,783	93,370
10T2	31,830	83,047	32,104
10T3	32,178	82,897	23,045
34T1	35,711	83,774	20,750
34T2	36,498	83,923	11,545
34T3	35,716	83,923	21,135
40T1	34,892	83,938	52,312
40T2	34,502	84,091	24,471
40T3	36,965	83,792	2,560
41T1	34,235	83,792	23,368
41T2	34,415	83,942	20,210
41T3	34,522	83,942	18,566
53T1	não determinado	65,292	não detectável
53T2	34,603	83,941	6,598
54T1	35,177	83,788	64,253
54T2	34,840	83,788	55,651
54T3	35,259	83,788	112,712
55T1	35,369	83,788	40,841
56T1	35,839	83,639	27,385
56T2	35,835	83,788	28,579
1PT1	34,940	84,205	44,180
1PT2	não determinado	61,055	não detectável
1PT3	não determinado	61,353	não detectável
3PT1	não determinado	65,142	não detectável
3PT2	não determinado	65,292	não detectável
3PT3	não determinado	64,695	não detectável
8PT1	36,231	83,791	17,896
8PT2	não determinado	64,710	não detectável
8PT3	35,059	83,791	41,192
9PT1	não determinado	65,302	não detectável
9PT2	37,463	83,488	4,973
9PT3	35,885	84,055	15,582

13PT1	não determinado	60,961	não detectável
13PT2	34,005	84,229	49,780
13PT3	não determinado	65,883	não detectável
20PT1	35,065	84,080	22,189
20PT2	35,028	83,782	22,529
20PT3	35,770	83,782	12,471
22PT1	34,109	84,068	51,673
22PT2	não determinado	61,545	não detectável
22PT3	não determinado	61,545	não detectável
23PT1	não determinado	61,396	não detectável
23PT2	34,614	83,919	35,887
23PT3	não determinado	66,467	não detectável
28PT1	33,260	83,782	32,123
28PT2	33,181	83,931	36,877
28PT3	33,241	83,931	33,628
31PT1	32,768	83,782	47,032
31PT2	33,828	83,782	20,861
31PT3	não determinado	61,503	não detectável
33PT1	34,171	83,919	72,212
33PT2	35,155	83,770	24,278
35PT1	34,658	83,774	42,951
35PT2	34,930	83,774	38,311
35PT3	34,057	83,923	66,767
36PT1	34,913	83,774	36,349
36PT2	35,836	83,923	19,142
36PT3	não determinado	61,353	não detectável
45PT1	35,401	83,938	32,870
45PT2	36,462	83,788	15,722
45PT3	não determinado	61,353	não detectável
49PT1	35,394	83,938	35,729
49PT2	36,073	83,788	19,819
49PT3	35,058	83,639	43,535
62PT1	não determinado	61,706	não detectável
62PT2	não determinado	65,286	não detectável
62PT3	28,521	83,634	18,416
64PT1	não determinado	61,109	não detectável
64PT2	não determinado	64,689	não detectável
64PT3	não determinado	92,435	não detectável
65PT1	não determinado	61,405	não detectável
65PT1	não determinado	61,405	não detectável
65PT2	33,259	83,622	61,482
71PT1	não determinado	61,402	não detectável
71PT2	não determinado	91,835	não detectável
71PT3	33,679	83,480	70,602
77PT1	34,221	83,792	8,338
77PT2	37,134	83,941	1,134
78PT1	34,896	83,639	54,176

CT – *threshold cycle*; TM – temperatura de *melting*; UFC – unidades formadoras de colônia.

Resultados da qPCR dos 41 RN com sepse clínica nos diferentes tempos de coleta

Identificação	CT	Tm	Quantificação (UFC/mL)
6T1	não determinado	65,142	não detectável
6T2	não determinado	64,844	não detectável
6T3	não determinado	64,695	não detectável
15T1	35,014	83,924	26,601
15T2	37,310	84,074	6,594
15T3	não determinado	61,374	não detectável
17T1	não determinado	91,685	não detectável
17T2	34,561	83,480	30,690
17T3	não determinado	64,236	não detectável
18T1	34,719	83,775	32,788
18T2	34,755	83,476	31,833
18T3	34,193	83,327	47,430
26T1	36,026	83,626	13,589
26T2	34,416	83,775	46,464
26T3	34,415	83,924	40,253
59T1	não determinado	61,358	não detectável
59T2	não determinado	61,059	não detectável
59T3	35,079	84,075	10,302
63T1	não determinado	62,853	não detectável
63T2	não determinado	90,053	não detectável
63T3	não determinado	61,059	não detectável
70T1	34,866	84,374	11,765
70T2	34,405	83,626	16,429
70T3	32,074	83,925	84,158
72T1	39,478	83,925	0,464
72T2	36,382	83,757	10,706
72T3	36,438	84,224	3,904
75T1	não determinado	61,508	não detectável
75T2	não determinado	61,059	não detectável
75T3	35,901	83,776	6,006
4PT1	não determinado	64,859	não detectável
4PT2	35,777	83,642	25,134
11PT1	35,284	83,642	35,028
11PT2	não determinado	61,235	não detectável
11PT3	36,557	83,642	13,219
12PT1	36,694	83,791	12,044
12PT2	não determinado	63,964	não detectável
12PT3	35,131	83,791	38,056
14PT1	34,613	83,931	31,125
14PT2	não determinado	64,988	não detectável
14PT3	33,654	83,782	66,036
16PT1	36,351	83,483	11,448
16PT2	34,854	83,632	26,263
19PT1	34,707	83,632	29,958
19PT2	34,072	83,782	48,945
19PT3	36,831	83,931	5,593

21PT1	não determinado	61,510	não detectável
21PT2	34,372	84,068	42,466
21PT3	34,198	84,068	53,364
24PT1	não determinado	61,844	não detectável
24PT2	35,837	83,419	14,652
24PT3	35,375	84,068	20,327
25PT1	33,838	83,782	21,636
25PT2	33,792	83,782	21,298
25PT3	32,825	83,782	46,007
29PT1	33,637	83,782	23,856
29PT2	32,573	83,782	62,463
29PT3	31,647	83,782	115,072
30PT1	33,155	83,782	35,302
30PT2	33,948	83,782	18,705
30PT3	não determinado	61,982	não detectável
32PT1	35,556	84,072	22,321
32PT2	35,949	83,923	17,343
32PT3	35,031	83,923	33,357
37PT1	34,120	84,072	65,153
37PT2	não determinado	61,253	não detectável
37PT3	não determinado	61,534	não detectável
38PT1	33,815	83,942	35,183
38PT2	35,638	83,792	8,052
38PT3	33,978	83,792	29,267
39PT1	34,279	83,942	23,324
39PT2	35,687	83,792	8,388
39PT3	36,686	83,942	3,204
44PT1	35,069	83,643	11,905
44PT2	33,407	83,942	46,362
44PT3	34,200	83,942	24,680
46PT1	35,456	83,938	32,214
46PT2	34,811	83,938	52,556
46PT3	34,678	84,087	58,684
47PT1	não determinado	61,503	não detectável
47PT2	não determinado	61,353	não detectável
47PT3	não determinado	61,503	não detectável
48PT1	39,479	83,938	1,277
48PT2	35,243	83,938	39,698
48PT3	35,665	84,087	28,242
50PT1	32,130	84,091	41,255
50PT2	27,374	84,091	35929,316
50PT3	32,635	83,493	28,368
51PT1	não determinado	61,557	não detectável
51PT2	não determinado	61,557	não detectável
51PT3	não determinado	61,706	não detectável
54PT1	31,225	83,626	452,544
54PT2	não determinado	65,705	não detectável
54PT3	36,250	83,622	2,875
56PT1	34,678	83,906	38,774
56PT2	36,881	84,055	7,563
56PT3	não determinado	61,353	não detectável

60PT1	não determinado	61,691	não detectável
60PT2	não determinado	65,867	não detectável
60PT3	não determinado	67,197	não detectável
66PT1	33,327	83,473	57,301
66PT2	33,703	83,473	39,166
67PT1	não determinado	61,109	não detectável
67PT2	não determinado	61,706	não detectável
67PT3	não determinado	61,557	não detectável
68PT1	não determinado	61,103	não detectável
68PT2	34,959	83,630	20,771
68PT3	não determinado	63,789	não detectável
69PT1	24,457	83,633	41419,113
69PT2	22,182	83,584	18934,131
69PT3	25,608	83,782	18817,027
73PT1	não determinado	61,253	não detectável
73PT2	não determinado	61,402	não detectável
73PT3	34,094	83,331	47,815
76PT1	34,516	83,941	6,812
76PT2	34,114	83,792	9,103
76PT3	38,026	83,643	0,615
78PT1	33,899	83,792	12,879
78PT2	37,539	83,643	1,058
78PT3	34,474	83,792	7,021

CT – *threshold cycle*; TM – temperatura de *melting*; UFC – unidades formadoras de colônia.

Resultados da qPCR no grupo controle de RN

Identificação	CT	Tm	Quantificação (UFC/mL)
CT1	32,566	83,632	43,305
CT2	33,974	84,087	82,826
CT3	34,317	83,632	15,719
CT5	35,566	84,072	18,018
CT6	33,403	83,792	35,485
CT7	33,182	83,942	52,582
CT8	33,567	83,942	36,279
CT12	33,889	83,792	9,421
CT17	33,990	84,389	8,832
CT18	32,024	84,091	38,656
CT19	32,702	84,091	18,699
CT20	33,806	84,224	27,852
CT21	34,996	83,925	11,346
CT22	34,717	84,089	18,917
CT23	34,875	83,791	35,923
CT24	35,588	85,732	22,182
CT25	34,520	84,239	27,013
CT27	33,176	84,089	81,654
CT28	35,686	84,239	20,112
CT29	32,962	83,940	57,880
CT30	33,521	83,940	38,227
CT31	33,750	84,239	34,066
CT32	34,743	83,492	38,211
CT33	39,556	84,239	6,481
CT35	34,615	83,940	26,036
CT36	33,920	83,940	31,205
CT41	35,893	84,388	18,796
CT43	33,568	83,940	66,015
CT44	34,608	83,940	32,152
CT45	34,259	84,388	39,558
CT46	35,115	83,933	34,960
CT47	35,413	83,783	12,587
CT48	35,541	84,231	12,995
CT49	35,578	83,933	25,153
CT50	34,676	84,380	18,581
CT51	35,291	84,380	11,795
CT52	34,416	84,082	27,960
CT53	33,970	84,082	59,371
CT54	34,431	84,380	19,692
CT55	37,104	84,082	6,281
CT56	36,396	84,231	13,230
CPT09	35,495	83,783	99,290
CPT13	35,255	84,231	21,555
CPT14	36,344	84,082	5,693
CPT16	29,115	84,379	952,552
CPT15	não determinado	61,543	não detectável
CPT26	31,129	83,783	232,155

CPT34	34,385	84,082	27,522
CPT37	36,946	84,082	10,013
CPT38	35,309	83,932	26,785
CPT39	35,577	83,633	18,307
CPT40	36,962	84,230	14,821
CPT42	35,657	83,932	34,193

CT – *threshold cycle*; TM – temperatura de *melting*; UFC – unidades formadoras de colônia.

Resultados da qPCR no grupo controle de São Paulo

Identificação	CT	Tm	Quantificação (UFC/mL)
CSP1	32,101	83,047	25,030
CSP2	32,067	83,047	26,451
CSP3	32,009	82,748	26,947
CSP4	31,230	82,897	63,608
CSP5	31,745	82,748	34,698
CSP6	32,353	83,047	19,145
CSP7	32,071	82,897	25,285
CSP8	32,656	82,748	14,316
CSP9	32,267	82,599	20,837
CSP10	32,642	82,748	14,473
CSP11	32,183	83,047	22,595
CSP12	31,879	82,748	30,454
CSP13	31,931	83,047	28,950
CSP14	34,882	83,634	49,827
CSP15	34,983	83,634	46,344
CSP16	34,891	83,634	50,075
CSP17	35,015	83,634	43,287
CSP18	35,024	83,634	43,386
CSP19	35,375	83,783	29,741
CSP20	35,629	83,485	22,860
CSP21	34,669	83,335	125,858
CSP22	35,775	83,335	19,830
CSP23	35,815	83,335	18,671
CSP24	35,820	83,335	18,713
CSP25	36,513	83,485	9,044
CSP26	35,686	83,485	21,367
CSP27	35,517	83,485	25,531
CSP28	35,495	83,485	27,520
CSP29	35,429	83,335	29,166
CSP30	35,680	83,634	21,540

CT – *threshold cycle*; TM – temperatura de *melting*; UFC – unidades formadoras de colônia.

Resultados do qPCR no grupo controle de Mato Grosso

Identificação	CT	Tm	Quantificação (UFC/mL)
CMT1	32,314	83,630	44,798
CMT2	34,330	83,622	49,841
CMT3	33,757	83,622	57,056
CMT4	34,454	83,622	48,307
CMT5	34,176	83,622	42,031
CMT6	35,389	83,324	11,999
CMT7	34,946	83,473	17,453
CMT8	31,767	83,780	65,855
CMT9	34,145	83,473	44,949
CMT10	32,181	83,481	43,349
CMT11	32,434	83,630	42,974
CMT12	35,263	83,175	13,785
CMT13	32,541	83,481	25,229
CMT14	33,926	83,473	60,409
CMT15	32,575	83,332	32,228
CMT16	31,536	83,630	68,725
CMT17	32,106	83,332	37,354
CMT18	32,011	83,630	54,124
CMT19	34,405	83,324	28,842
CMT20	34,135	83,622	55,061
CMT21	34,510	83,622	42,865
CMT22	34,451	83,622	31,867
CMT23	34,672	83,324	27,887
CMT24	33,911	83,622	54,016
CMT25	35,949	83,473	7,271
CMT26	32,614	83,481	26,279
CMT27	34,022	83,473	46,503
CMT28	32,569	83,332	31,976
CMT29	31,797	83,481	55,880
CMT30	32,147	83,481	38,272

CT – *threshold cycle*; TM – temperatura de *melting*; UFC – unidades formadoras de colônia.

Anexo III. APROVAÇÃO DO CEP JULIO MULLER

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller
Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/97

TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA
DE PROJETO DE PESQUISA

REFERÊNCIA: Projeto de protocolo Nº 587/CEP-HUJM/08

"COM PENDÊNCIAS"

☐

APROVADO "ad referendum"

☐

APROVAÇÃO FINAL

☒

NÃO APROVADO

☐

O projeto de pesquisa intitulado: "**Desenvolvimento de um marcador molecular para o diagnóstico e monitoramento da sepse neonatal bacteriana,**" encaminhado pelo (a) pesquisador (a), **Inês Stranieri** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada dia 04/02/09 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 04 de Fevereiro de 2009.

Profa. Dra. Shirley Ferreira Pereira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM

Anexo IV. APROVAÇÃO Cappesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 21/10/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0889/09**, intitulado: **"DESENVOLVIMENTO DE UM MARCADOR MOLECULAR PARA O DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DA SEPSE NEONATAL BACTERIANA"** apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Patrícia Palmeira**

Pesquisador (a) Executante: **Inês Stranleri**

CAPPesq, 22 de Outubro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Anexo V.

HOSPITAL E MATERNIDADE SANTA HELENA – CUIABÁ / MT

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - TÍTULO DA PESQUISA: DESENVOLVIMENTO DE UM MARCADOR MOLECULAR PARA O DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DA SEPSE NEONATAL BACTERIANA.

Justificativa e objetivos da pesquisa: *Prezada Senhora*, como já lhe foi falado, na maior parte dos casos de infecção do sangue nos recém-nascidos os resultados das culturas de sangue são negativos, dificultando o tratamento dos recém-nascidos, por este motivo pesquisamos um exame laboratorial que analisa se o DNA da bactéria está presente no sangue do RN, pois é uma maneira mais rápida e precisa para descobrir a causa da infecção. Nosso objetivo é contribuir para a diminuição da mortalidade atribuída as infecções nos recém-nascidos, infelizmente ainda bastante elevada. Neste sentido, este novo marcador de infecção poderia ser uma ferramenta útil não apenas para a confirmação do diagnóstico da infecção, como também para a avaliação da eficácia do tratamento por meio do monitoramento do recém-nascido em três etapas, contribuindo para a redução dos custos hospitalares, do tempo de internação e do uso desnecessário de antibióticos.

1. Caso a senhora e seu filho(a) não queiram participar da pesquisa, você tem todo o direito de se recusar. Caso comece na pesquisa e depois deseje desistir, também estará garantida assistência médica para a sua criança.
2. **Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Será colhido sangue periférico para extração de DNA para pesquisa do marcador molecular 16 S RNA.
3. **Desconfortos e riscos esperados:** O sangue será colhido de veia periférica juntamente com demais exames de rotina., sendo que o risco será o mesmo verificado na realização dos demais exames de rotina.
4. **Benefícios que poderão ser obtidos:** Trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de que a susceptibilidade dos neonatos humanos às infecções por bactérias Gram-positivas está relacionada, em parte, à imaturidade funcional da resposta imune inata. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

II - OBSERVAÇÃO:

- A senhora terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para diminuir eventuais dúvidas.
- A senhora terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
- A senhora terá total confidencialidade, sigilo e privacidade dos dados deste estudo.
- Disponibilidade de assistência, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa;
- Se for detectado, algum problema de saúde previamente ao início da pesquisa, a senhora será encaminhada ao Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento.
- Se houver intercorrência de saúde decorrente da pesquisa, a senhora será atendida no HUJM/UFMT segundo o critério de assistência do mesmo (hospital de atendimento secundário). Se houver necessidade de atendimento de maior complexidade, a encaminharemos ao SUS.
- A duração prevista da pesquisa é de quatro (3) anos.

III - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

NOME DOS PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

Pesquisadora executante: Ines Stranieri

Pesquisadora responsável: Dra. Patricia Palmeira

CEP-HUJM-UFMT: Av Alzira Zarur, s/nº- Campus da UFMT de Cuiabá-

CEP-HU: Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP -
Telefones: 3039-9457 ou 3039-9479 - E-mail: cep@hu.usp.br.

IV - INFORMAÇÕES DO PACIENTE:

NOME DO PACIENTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ~ F ~

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).....

V – ENCERRAMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“DECLARO QUE, APÓS CONVENIENTEMENTE ESCLARECIDO PELO PESQUISADOR E TER ENTENDIDO O QUE ME FOI EXPLICADO, CONSINTO EM PARTICIPAR DO PRESENTE PROJETO DE PESQUISA.”

CUIABÁ, DE DE 200.....

assinatura do paciente ou responsável legal

assinatura e carimbo do pesquisador

Anexo 5.**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Desenvolvimento de um marcador molecular para o diagnóstico e monitoramento da sepse neonatal bacteriana**

PESQUISADOR : Patricia Palmeira

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisadora Científica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 18195/01-D

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Pediatria – LIM-36

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐**4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos.**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

- 1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:** convidamos a senhora para fazer parte desta pesquisa porque queremos fazer um exame de sangue que procura o DNA das bactérias que causam infecção muito grave em recém-nascidos. Os exames que são feitos na UTI demoram mais tempo que este que pretendemos fazer, e também pegam menos casos que o nosso teste. Se conseguirmos provar nesta pesquisa que este nosso teste é o melhor para encontrar bactérias, ele poderá ser realizado como exame de rotina para todos os bebês da UTI que estiverem com infecção, em futuro próximo. Para realizar a pesquisa precisamos que a senhora nos autorize a colher 1,0 ml de sangue do cordão umbilical, sem dor nem formação de hematomas. Os benefícios de sua doação serão o de colaborar para que possamos melhorar o diagnóstico das infecções graves nos recém-nascidos logo que acabarmos esta pesquisa. Caso a senhora não queira participar da pesquisa, você tem todo o direito de se recusar, e isto não vai mudar em nada o seu tratamento e de seu filho neste hospital. Caso comece na pesquisa e depois queira desistir, o seu tratamento e de seu filho também vai continuar igual.
- 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Será colhido sangue do cordão umbilical para padronizar um exame que iremos procurar DNA das bactérias que causam infecção muito grave em recém-nascidos.
- 3. Desconfortos e riscos esperados:** O sangue de cordão umbilical será colhido logo após o parto, sem dor ou desconforto algum para a senhora ou para seu bebê.
- 4. Benefícios que poderão ser obtidos:** Não há benefício direto para o participante. A participação neste estudo possibilitará, num futuro próximo, a realização deste exame de laboratório de rotina para facilitar o diagnóstico e cura das crianças com infecções provocadas por bactérias.
- 5. Garantia de acesso** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dra. Patricia Palmeira** que pode ser encontrada na Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647. São Paulo, SP. Telefone(s) (11) 3069-8781. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
- 6. É garantida a liberdade** da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 7. Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 8. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas**, quando em

estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

- 9. Despesas e compensações:** não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 10. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados** e o material coletado somente para esta pesquisa.
- 11.** Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Desenvolvimento de um marcador molecular para o diagnóstico e monitoramento da sepse neonatal bacteriana**”. Eu discuti com a pesquisadora Patricia Palmeira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo VI. FICHA DE ANAMNESE

OK

GRUPO:	Pré-termo abaixo de 34 semanas ()	PT < 34
	Pré-termo acima de 34 semanas ()	PT < 37
	Termo ()	T
Hospital Santa Helena		
Caso nº		Caso nº:
Data do atendimento:		DataA:
Data do nascimento:		DataNasc:

Dados Maternos					
Nome:					
Gestação	(1)	(2)	(3) dias	(+ de 3)	Gesta
Idade gestacional (IG)	__ . __ / 7		00.0/7 (ignorada)		IG:
	(1) USG 1º trim	(2) DUM	(3) Capurro		Método IG:
	(4) N.Ballard		(5) Desconhecido		

Morbidades maternas				
Infecção:	(0) Ausente	(1) Presente	(2) Não pesquisado	Infecção:
ITU	(0) Ausente	(1) Presente	(2) Não pesquisado	ITU:
SGB	(0) Ausente	(1) Presente	(2) Não pesquisado	SGB:
Outras	(0) Ausente	(1) Presente	(2) Não pesquisado	Outros
Especificar				

Doenças Maternas				
Hipertireoidismo	(0) Ausente	(1) Presente		Hipert:
Hipotireoidismo	(0) Ausente	(1) Presente		Hipot:
Diabete Melito	(0) Ausente	(1) Presente		DM:
Diabete gestacional	(0) Ausente	(1) Presente		DG:
Pneumonias	(0) Ausente	(1) Presente		PN:
Tuberculose	(0) Ausente	(1) Presente		Tb:
Febre Reumática	(0) Ausente	(1) Presente		FR:
Doença de Chagas	(0) Ausente	(1) Presente		Chagas:
Hipertensão Arterial Aguda	(0) Ausente	(1) Presente		HASa
Hipertensão Arterial Crônica	(0) Ausente	(1) Presente		HASc
Lúpus Eritematoso Sistêmico	(0) Ausente	(1) Presente		LES:
Artrite Reumatóide	(0) Ausente	(1) Presente		AR
Polimiosite/Dermatomiosite	(0) Ausente	(1) Presente		P/D
Poliarterite Nodosa	(0) Ausente	(1) Presente		Pnodo
Outras Doenças auto-imunes	(0) Ausente	(1) Presente		Autoimune
Citar				
Alergias	(0) Ausente	(1) Presente	Qual?	Alergia
Tabagismo	(0) Ausente	(1) Presente	nº de cigarros	Tabaco
Álcool	(0) Ausente	(1) Presente	nº doses	Álcool
Drogas ilícitas	(0) Ausente	(1) Presente	Qual?	Drogas
Medicamentos:	(0) Não	(1) Sim	Quais?	Medicamentos
Citar:				
Corticóides	(0) Não	(1) Sim		Corticoide

Identificação

Morbidades maternas

Plaquetas	(1) > 150.000 / mm ³		(2) < 150.000 / mm ³		
PCR	1º dia	Data:			
	2º dia	Data:			
	3º dia	Data:			
Hemo zero					
Hemo 48 hs					
Hemos 7 dias					
HMC	(0) Negativa		(1) Positiva	(2) Não colhida	
	Agente (HMC-AE)				
LCR	(0) Normal		(1) Alterado	(2) Não colhido	
LCR	Leucócitos	Neutrófilos	linfócitos	Proteínas	Glicose
Glicemia					
Leucócitos	(1) > 20 leucócitos / mm ³		(2) < 20 leucócitos / mm ³		
Neutrófilos	(1) > 20%		(2) < 20 %		
Proteínorraquia	RNT:	(1) > 100 mg%	(2) < 100 mg%		
	RN PT	(1) > 120 mg%	(2) < 120 mg%		
Glicorraquia	(1) < 75% da glicemia		(2) > 75% da glicemia		
Bacterioscopia	(0) Negativa		(1) Positiva		
Cultura	(0) Negativa		(1) Positiva	(3) Não colhido	
LCR-AE					
Urocultura	(0) Negativa		(1) Positiva	(2) Não colhida	
	Método	(1) PSP	(2) Sondagem	(3) Saco coletor	
Urocultura-AE					
Evolução:	Alta hospitalar	(0) Não	(1) Sim	Alta:	
	Data da alta			Data Alta	
	Óbito	(0) Não	(1) Sim	Óbito	
	Data do óbito			Data Óbito	

[illegible]