

Anna Maria Duarte Miglioli

**DNA genômico de *Streptococos* e *Escherichia coli* em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento.**

Campo Grande  
2009

Anna Maria Duarte Miglioli

**DNA genômico de *Streptococcus* e *Escherichia coli* em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Convênio Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília (UnB), Universidade Federal de Goiás (UFG) e Universidade Federal de Mato Grosso Sul (UFMS), para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Campo Grande  
2009

Anna Maria Duarte Miglioli

**DNA genômico de *Streptococos* e *Escherichia coli* em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Convênio Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília (UnB), Universidade Federal de Goiás (UFG) e Universidade Federal de Mato Grosso Sul (UFMS), para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof.Dr. Durval Batista Palhares

Campo Grande  
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

M634d Miglioli, Anna Maria Duarte.  
DNA genômico de *Streptococos* e *Escherichia coli* em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento/ Anna Maria Duarte Miglioli. -- Campo Grande, MS, 2009.  
81 f. ; 30 cm.

Orientador: Durval Batista Palhares.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

1. Sepsemia neonatal. 2. PCRrt. 3. Infecções neonatais. I. Palhares, Durval Batista. II. Título.

CDD (22) – 618.32

## FOLHA DE APROVAÇÃO

ANNA MARIA DUARTE MIGLIOLI

DNA genômico de *Streptococos* e *Escherichia coli* em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento.

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Convênio Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília (UnB), Universidade Federal de Goiás (UFG) e Universidade Federal de Mato Grosso Sul (UFMS), para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Resultado: \_\_\_\_\_

Campo Grande (MS) 31 de março de 2009.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Durval Batista Palhares

Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul  
Orientador

---

Prof. Dr. Almir de Sousa Martins

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dra. Carmen Silvia Martimbianco de Figueiredo

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Yvone Maia Brustoloni

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dedico este trabalho à minha família, pela compreensão, carinho e paciência, nos momentos em que estive ausente!

Meu marido: embora distante fisicamente, tenho certeza que do céu ou de onde estiver, estará orgulhoso de me ver cumprido mais este desafio!

Meus queridos filhos e nora que souberam muito bem aceitar os momentos em que não pude ser 100% mãe!

À minha mãe, irmã, cunhados e sobrinhos por entenderem a importância deste estudo!  
Sem esta ajuda, nada teria sido possível!

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos os que me ajudaram em mais este desafio e em especial aos:

Meu Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares

Meu coorientador: Almir de Sousa Martins

À bióloga Helen Del Puerto, pela imprescindível colaboração na execução das extrações de DNA dos materiais e realização das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), e ao Laboratório de Fisiologia Genômica do ICB/UFMG, onde os exames foram realizados.

Às enfermeiras da UTI Neonatal, pela colaboração na coleta dos materiais:

Sandra Morales de Souza,  
Karine Ferreira da Costa,  
Gracianne C. J. C. Santos,  
Mikaelle Cristina G. Dos Santos.

Aos colegas plantonistas da UTI neonatal da Sociedade Beneficente de Campo Grande-Santa Casa, que me ajudaram nas trocas de plantões.

Às Profas. Dras. Carmen Silvia Martimbianco de Figueiredo  
e Aby Jaine C. Montes Moura

Aos colegas da Auditoria Médica da UNIMED Campo Grande

Aos colegas professores do Estágio Supervisionado em Pediatria da UNIDERP:

Prof. Davidson Cláudio Vincoletto,  
Profa. Delmina de S. Campagna  
Profa. Maria Aparecida Shimabukuro  
Prof. Oreste Ângelo Ferra Neto.

À Profa. Dra. Doroty Dourado e as biólogas Mayara Terra Vilela Vieira, Camila Bolognes Couto, Ana Paula Machado e Isabela Furtado pela preciosa ajuda nas extrações de DNA no Laboratório de Biologia Molecular da UNIDERP e no Laboratório do Mestrado em Pediatria da UFMS

A DEUS, pois sem ELE nada teria acontecido!

“Cerca de duas mil mulheres e 38 mil recém-nascidos brasileiros morrem a cada ano vítimas de complicações na gravidez, parto, pós-parto e abortamento. E o mais preocupante: muitas dessas vidas seriam poupadas se mulheres e bebês tivessem a saúde acompanhada de maneira correta.” (MS, 2006)



## RESUMO

**Introdução:** Embora no Centro-Oeste mais de 98% das mulheres façam consultas pré-natais, a prematuridade extrema exige cada vez mais leitos em nossas unidades de terapia intensiva neonatais. As infecções bacterianas são importante causa de morbidade e mortalidade neonatal, apesar dos avanços nos cuidados oferecidos às gestantes e neonatos. A Sepsis neonatal precoce está associada a microorganismos colonizadores do trato geniturinário materno que são adquiridos pelo recém-nascido durante o nascimento. Em 1996 o *Centers for Disease Control*, instituiu estratégias preventivas para a doença neonatal com o uso de antibióticoterapia profilática intraparto em gestantes com fatores de risco para infecção. Houve um decréscimo de 70% na incidência de sepsis precoce por *Streptococo* do Grupo B, diminuindo de 12.000 para 7600 casos e de 1.600 mortes por ano para 310, respectivamente nos Estados Unidos da América. **Justificativa** A doença neonatal precoce geralmente se apresenta com quadro de septicemia ou desconforto respiratório grave, levando os neonatos à ventilação mecânica, com alta taxa de morbidade e mortalidade. As conseqüências da infecção podem ser severas, com mortalidade de até 50% se não tratados. **Objetivo:** Detectar DNA genômico bacteriano no aspirado traqueal, gástrico e sangue de recém-nascidos, utilizando os fatores de risco para o diagnóstico de infecção neonatal do Centers for Disease Control fazendo a identificação rápida de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* nestes espécimes. **Metodologia:** Utilizar a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real para identificar sequências genômicas dos agentes *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* e *E. coli* no aspirado pulmonar e *S. agalactiae* e *E. coli* no aspirado gástrico e sangue de recém nascidos submetidos à ventilação mecânica logo após a intubação. **Resultado:** A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real detectou amplicons de segmentos genéticos de *E. coli* em 14 (43,75%) de 32 amostras de secreção traqueal, em 4 (26,67%) de 15 amostras de secreção gástrica e em 7 (31,82%) de 22 amostras de sangue periférico. Amplicons de segmentos genéticos de *S. agalactiae* foram encontrados em uma (3,13%) de 32 amostras de secreção traqueal, em três (20%) de 15 amostras de secreção gástrica e não foi encontrado nas 22 amostras de sangue dos RN pesquisados. Os amplicons de segmento genético de *S. pneumoniae* foram investigados em 45 amostras de aspirado traqueal e detectados em 12 (26,67%) delas. A viabilidade das amostras na quantificação de DNA foi de 32/80 (40%) amostras de aspirado traqueal, 15/75 (20%) de aspirado gástrico e 22/45 (48,9%) das amostras de sangue. **Conclusão** A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, ainda incipiente no Brasil, permitiu identificar o material genético dos agentes nos materiais estudados de maneira rápida, possibilitando a utilização em estudos epidemiológicos com casuísticas maiores. Os primers desenhados foram adequados e o estudo foi possível naquelas amostras com DNA genômico em quantidade acima de 5 ng/µl. Embora em todos os espécimes pesquisados a quantidade de DNA genômico tenha sido muito pequena, o mais viável foi o sangue pela maior quantidade de DNA genômico encontrado, mas o aspirado traqueal e gástrico também pode ser utilizado.

**Palavras chave-** sepsis neonatal precoce, PCR em tempo real (PCRrt), infecção neonatal, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Although in Brazil Center-West more than 98% of the women make appointments of prenatal examinations, the extreme prematurity demands increasing number of Neonatal Intensive Care Unit (NICU) beds. Bacterial infections are important causes of neonatal morbid-mortality, despite the advances on medical care offered to the pregnant women and newborns. The neonatal early sepsis is associated with microorganisms that colonize the maternal genitourinary tract, and are acquired by the newborn during birth. In 1996 the Center for Disease Control (CDC), created preventive strategies to neonatal disease, with the use of intrapartum antimicrobial prophylaxis in pregnant mothers with risk factors for infection. There was a decrease of 70% on the incidence of early sepsis by EGB, with a decrease of 12.000 to 7.600 cases and of 1.600 to 310 deaths by year, respectively in USA. **Justification:** The early neonatal disease generally presents as a sepsis clinical symptoms or severe respiratory distress, leading the newborns to mechanical ventilation, with a high number of neonatal morbid-mortality. The infection consequences can be severe, with the mortality as high as 50% when not treated. **Objective:** To verify bacterial genomic DNA extracted from newborn's tracheal, gastric secretions and blood of newborns with the CDC risk factors of neonatal infection to a fast identification of *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli* on these specimens. **Methodology:** To use the Real Time PCR (PCRrt) to identify the genomic sequences of *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* and *E. coli* agents on the tracheal secretion and *S. agalactiae* and *E. coli* on gastric secretion and blood of newborns under mechanical ventilation soon after the intubation. **Results:** The PCRrt detected amplicons of genetic segments of *E. coli* was found in 14 (43,75%) of 32 samples of tracheal secretion, in 4 (26,67%) of 15 samples of gastric secretion and in 7 (31,82%) of 22 samples of blood. Amplicons from genetic segments of *Streptococcus agalactiae* were found in one (3,13%) out of 32 samples of tracheal secretion, in three (20%) out of 15 samples of gastric secretion and were not found on the 22 blood samples of the newborns under this research. Amplicons from genetic segments of *S. pneumoniae* were found in 12 (26,67%) out of 45 samples of tracheal secretion of the newborns. The viability of the samples on the DNA quantification was of 32/80 (40%) samples of tracheal aspirate, 15/75 (20%) of gastric aspirate and 22/45 (48,9%) of the blood samples. **Conclusion:** The Polymerase Chain Reaction in real time, still incipient in Brazil, was effective to identify the agent's amplicons on the studied materials in a fast way, allowing for use in epidemiological studies with larger samples. The primers designed were appropriate and the study was effective on samples where genomic DNA were found on quantities up to 5 ng/ $\mu$ l. Although in all specimens researched the quantities of genomic DNA were very small, the viability of samples was better in the blood where the genomic DNA was found in greater quantity but the tracheal and gastric aspirate can also be used.

**Keywords-** neonatal early disease, Real time PCR (PCRrt), neonatal infection, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Seqüência de nucleotídeos da região alvo do PCR para $\beta$ -actina humana (295 pb). .....	39
Figura 2- Seqüência de nucleotídeos da região alvo do PCR para <i>S. agalactiae</i> . .....	40
Figura 3- Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das regiões codificadoras da cadeia beta da RNA polimerase escolhidas como alvo para PCR de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (P). .....	41
Figura 4-Seqüência de nucleotídeos da região alvo do PCR para <i>E. coli</i> . .....	41
Figura 5- Resultado da PCR convencional com os primers para $\beta$ -actina em amostras de DNA de sangue. ....	46
Figura 6-Purificação por eletroforese em gel de agarose a 1,2% do amplicon da $\beta$ -actina obtido no PCR convencional para quantificação e utilização como padrão na PCR em Tempo Real. ....	46
Figura 7-Resultado do PCR em Tempo Real para o amplicon de 295 pb da $\beta$ -actina amplificado de DNA genômico de sete amostras positivas para EGB no sangue. ....	47
Figura 8-Curva padrão da $\beta$ -actina humana usada como calibrador interno da PCRTr para o diagnóstico de EGB nas amostras de sangue. ....	48
Figura 9-Curva de calibração da $\beta$ -actina apresentando os quatro pontos de diluição. ....	48
Figura 10-A figura mostra o perfil típico das curvas obtidas da esquerda para a direita durante a amplificação das diluições 1ng, 10-3, 10-6 e 10-9 ng. ....	49
Figura 11-Curva Padrão para o <i>S. agalactiae</i> – Curva de Dissociação dos Positivos. ....	50
Figura 12-Curva Padrão da <i>E. coli</i> evidenciando 2 picos de temperatura de dissociação. ....	50
Figura 13-Curva de calibração da <i>E. coli</i> apresentando os quatro pontos de diluição. ....	51
Figura 14-Curva de calibração do <i>S. pneumoniae</i> apresentando os quatro pontos de diluição. ....	51
Figura 15-Curva Padrão dos Positivos para o <i>S. agalactiae</i> e primerdimers ....	52
Figura 16-Todas as Curvas para o EGB. Pode-se observar os 4 resultados positivos e os primerdimers. ....	52
Figura 17-Curva dos positivos para a ECO e os primerdimers. ....	53
Figura 18-Ciclos da PCR – Protocolo do ciclo termal. ....	54
Figura 19-Relato do experimento para o EGB ....	55
Figura 20-Exemplo de parte do relato do experimento programado para ECO ....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Tipos de parto, idade gestacional e fatores de risco para a transmissão de infecção neonatal (CDC, 2002) apresentados pelos RN incluídos no estudo. ....	43
Tabela 2-Resultados da quantificação de DNA obtidos por espectrofotometria. ....	44
Tabela 3-Resultados da quantificação de DNA obtidos por espectrofotometria. ....	45
Tabela 4-Número de amostras colhidas, amostras com quantidade de material genômico selecionado para PCRrt e o número de amplicons das seqüências genéticas que identificaram os agentes estudados.....	56
Tabela 5-Total de amostras e a freqüência com que os amplicons de seqüências genéticas de <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> foram identificados na população com quantidade de material genético > 5 ng/ µl.....	57

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1-Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa/CEP/UFMS.....	73
Anexo 2-TERMO DE CONSENTIMENTO, LIVRE E ESCLARECIDO.....	74
Anexo 3-TERMO DE CONSENTIMENTO, LIVRE E ESCLARECIDO.....	755
Anexo 4-PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÃO NEONATAL .....	766
Anexo 5-Esquema do frasco usado para a coleta do aspirado traqueal .....	77
Anexo 6-Frasco usado para a coleta do aspirado traqueal .....	77
Anexo 7-EXTRAÇÃO DE DNA .....	78

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AAP**– Academia Americana de Pediatria

**ACOG** – Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas

**CAISM-UNICAMP**- Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - UNICAMP

**CDC** – Centers for Disease Control

**ECO** – *Escherichia coli*

**EGB** – *Streptococcus do Grupo B*

**EPEC** – *Escherichia coli* enteropatogênica clássica

**IN** – Infecção do Neonato

**ITU** – Infecção do Trato Urinário

**MMWR**- Morbidity and Mortality Weekly Report

**MS, PNDS-2006** – Ministério da Saúde, Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Mulher e da Criança

**OD** – Densidade Óptica

**PCRrt** – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

**RN** – Recém nascido

**rpoB**- Cadeia beta da RNA Polimerase

**RPM** – Rotura Prematura de Membranas

**SAGA**- *Streptococcus agalactiae*

**SP** – *Streptococcus pneumoniae*

**TPP**- Trabalho de Parto Prematuro

## LISTA DE SÍMBOLOS

**μl**- microlitro

**μm** – milimicra

**rpm** – rotações por minuto

**ml** – mililitro

**ng** – nanograma

**min**- minuto

**pb**- pares de base

**°C** – Graus Celsius

## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	14
LISTA DE SÍMBOLOS.....	15
SUMÁRIO .....	16
1-INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	17
2-REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 HISTÓRICO .....	23
2.2 A DOENÇA NEONATAL.....	26
2.3 OS AGENTES .....	29
2.3.1 OS ESTREPTOCOCOS .....	30
2.3.1.(a) STREPTOCOCCUS AGLACTIAE.....	31
2.3.1.(b) STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.....	31
2.3.2 ESCHERICHIA COLI .....	32
3.OBJETIVOS .....	33
3.1 Geral: .....	34
3.2 Específicos:.....	34
4.POPULAÇÃO E MÉTODOS .....	35
4.1. POPULAÇÃO .....	36
4.2 AMOSTRAS.....	36
4.3.1 Extração de DNA genômico - .....	36
4.3.2 PCR convencional.....	37
4.3.3 Gel de Poliacrilamida .....	37
4.3.4 Purificação do Amplicon da $\beta$ -actina por Eletroforese e Eletroeluição .....	37
4.3.5 PCR em tempo real (PCRrt) - .....	38
5.RESULTADOS .....	42
6.DISSCUSSÃO .....	58
7.CONCLUSÃO.....	63
8.REFERÊNCIAS.....	65
9.ANEXOS.....	72



**1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

Embora no Centro-Oeste mais de 98% das mulheres façam consultas pré-natais (MS, PNDS-2006), a prematuridade extrema continua exigindo um número cada vez maior de leitos em nossas unidades de terapia intensiva neonatais. A grande exigência desses leitos é decorrente de infecções bacterianas que continuam sendo importante causa de morbidade e mortalidade neonatal, apesar dos avanços nos cuidados oferecidos às gestantes no período pré e perinatal. Estudos relatam que as infecções neonatais acometem até 10% dos nascidos vivos. A via hematogênica transplacentária é a mais comum para a transmissão da infecção materno-fetal. A placenta é mais “permeável” à passagem de agentes microbianos quanto mais tardia a gestação. Embora a transmissão de infecção no início da gestação leve mais freqüentemente ao óbito fetal, a infecção na segunda metade da gestação leva mais comumente a uma infecção assintomática ou inaparente ao nascimento. Esta infecção pode causar doenças no período neonatal (sepse neonatal) precoce, tardio ou mesmo levar às seqüelas tardias (MUSSI-PINHATA et al.,1999). A Sepse neonatal precoce está associada a microorganismos de origem materna, infecção transplacentária ou infecção ascendente do cérvix. É causada por organismos que colonizam o trato geniturinário materno, adquiridos pelo recém-nascido (RN) durante a passagem no canal de parto colonizado no momento do nascimento.

A doença neonatal precoce geralmente se apresenta como um quadro de septicemia ou desconforto respiratório grave, levando os recém-nascidos à ventilação mecânica, com alta taxa de morbidade e mortalidade neonatal. Não se tem diagnóstico preciso do agente envolvido na doença, o que facilitaria o tratamento, pois o padrão ouro que é a hemocultura é citado por diversos autores como um diagnóstico demorado e não específico (HONEST et al., 2006; BROZANSKI et al., 2006; YADAV et al., 2005).

Assim, visando o diagnóstico precoce da doença infecciosa no RN, seguindo o protocolo do *Centers for Disease Control* (2002), utilizamos ferramentas da biologia molecular para a identificação de seqüências genômicas dos agentes *Streptococcus agalactiae* (EGB) e *Escherichia coli* (ECO) no sangue e aspirado pulmonar e gástrico de recém nascidos, na presença de fatores de risco para a profilaxia antibiótica durante o parto, submetidos à ventilação mecânica logo após a intubação, evitando assim a colonização e a infecção por microorganismos presentes no ambiente.

Como um segundo experimento foi investigado a presença de *Streptococcus pneumoniae* (SP) e *Escherichia coli* (ECO) em DNA genômico de 43 amostras de aspirado traqueal dessas crianças.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

A sepse neonatal é uma importante causa de morbidade e mortalidade em recém-nascidos, principalmente em prematuros de baixo peso. É definida com síndrome caracterizada por sinais sistêmicos de infecção e bacteremia (BIZARRO et al., 2005; MEREMIKWU et al., 2005, PUOPOLO, 2008). Embora sua incidência seja relativamente baixa (0,3 a 15,4 casos/1.000 nascidos vivos), o risco de mortalidade é alto, variando de 10 a 50% (JORDAN; DURSO, 2000; RODRÍGUEZ-WEBER et al., 2003; MOVAHEDIAN et al., 2006.).

Os microorganismos mais comumente associados com a infecção de início precoce incluem *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae*, sendo os dois últimos de maior relevância (IREGBU et al., 2006; RODRÍGUEZ-WEBER et al., 2003; ANDERSON-BERRY, BELLIG, 2006).

As taxas de prevalência do *Streptococo do grupo B* (EGB) na septicemia neonatal podem variar de 5 a 40%. No Brasil, no entanto, as taxas têm variado de 4 a 17% (BERALDO et al., 2004).

Com a finalidade de diminuir o número de casos da infecção, em 1996, o *Centers for Disease Control* (CDC) recomendou estratégias para identificar mães colonizadas com EGB, já que 50 a 75% dos recém-nascidos expostos ao EGB intravaginal tornam-se colonizados (POGERE et al., 2005). Os fatores de risco relacionados são: antecedente de infecção por EGB em gestação anterior, bacteriúria por EGB durante a gestação, gestação com duração menor de 37 semanas, ruptura da membrana por mais de 18 horas e febre durante o trabalho de parto (CDC, 1996). No entanto, há relato que cerca de 20% das mulheres são portadoras assintomáticas de EGB (SCHRAG et al., 2000).

O EGB pode causar dois quadros clínicos principais em recém-nascidos (RN): a doença neonatal precoce e a tardia. O quadro precoce ocorre durante a primeira semana de vida e é o mais prevalente, respondendo por 80% dos casos, enquanto que a doença tardia (após a primeira semana de vida) corresponde ao restante dos casos (SCHUCHAT, 1998; SCHRAG, 2005)

Os RN infectados por EGB geralmente apresentam sepse ou pneumonia, meningite, osteomielite ou artrite séptica. Em gestantes, a maioria das mulheres não possui sintomas associados com a colonização do trato geniturinário. Infecções do trato urinário causadas por esta bactéria complicam 2- 4% das gestantes. Durante a gestação ou no período puerperal, as mulheres podem desenvolver amniotite, endometrite, sepse, ou raramente, meningite causada por EGB. Casos fatais entre mulheres com esta doença associada à gestação são extremamente raros (SCHRAG et al., 2002).

Em 1996 o CDC, na tentativa de diminuir a incidência da doença neonatal, instituiu o uso de profilaxia antibiótica intraparto em gestantes com fatores de risco para a transmissão de infecção. O resultado foi o decréscimo de 70% na incidência de sepse precoce por EGB, com a diminuição de 12.000 para 7600 casos e de 1.600 mortes por ano para 310, respectivamente, nos EUA (MIURA; MARTIN, 2001; BERALDO et al., 2004). Porém o diagnóstico da infecção neonatal continua sendo um desafio clínico e para a pesquisa.

O EGB continua sendo responsável pela maioria das complicações na infecção do neonato (IN) nos Estados Unidos. Em estudo retrospectivo de 144 casos, Ben Hamida et al. (2008), encontraram como agentes etiológicos principais da sepse neonatal precoce o EGB e a ECO, os responsáveis respectivamente de 50% e de 29.1% das infecções comprovadas. O EGB foi

reconhecido como o agente mais predominante no recém-nascido de termo (58.9%) e a ECO em recém-nascido prematuro (38.5%). As conseqüências da infecção podem ser muito severas, com mortalidade tão alta quanto 50% entre os não tratados (BELLIG, 2002).

Em tese de Doutorado, Nomura (2009), objetivou identificar a taxa de trabalho de parto prematuro (TPP) e/ou ruptura prematura de membranas (RPM), usou dois *swabs* anais e vaginais de 203 gestantes atendidas no CAISM-UNICAMP. Encontrou prevalência de colonização materna por EGB em 27,6% (56 gestantes) e taxa de colonização neonatal de 3,1%. Ocorreram dois casos de sepse precoce por EGB nesta amostra, com prevalência estimada de 10,8 casos por mil nascidos vivos e mortalidade de 50%. Concluiu que é necessário o uso de meio de cultura seletivo e a associação de culturas anorretais e vaginais para aumentar a taxa de detecção do EGB. A incidência de sepse neonatal precoce foi elevada nesta população.

Para Lajos Pinto (2009), a colonização endocervical em gestantes com trabalho de parto prematuro e/ou ruptura prematura de membranas ocorreu em 212 gestantes encontrou como microorganismo mais freqüente, o EGB (9,4%), *Candida sp* (5 casos), *Streptococcus sp* (2 casos), e um caso de *Streptococcus pneumoniae (SP)*, ECO e *Enterococcus sp*.

Após a queda das taxas de sepse por EGB, com as medidas preventivas indicadas pelo CDC (1996) houve uma preocupação maior com a ECO, que foi uma importante causa de infecção entre os recém-nascidos antes que a doença por EGB surgisse. Em 2005, foi publicado pelo CDC que a incidência da doença invasiva precoce pelo EGB se aproximava de 0,3 por 1000 nascidos vivos, e a doença infecciosa precoce por ECO era semelhante, sendo em algumas populações tão alta quanto por EGB (STOLL et al., 2005; HYDE et al., 2002). Segundo Lopez Sastre et al. (2000) a sepse por ECO é uma importante causa de morte entre os prematuros, principalmente entre os de muito baixo peso ao nascimento e infecção vaginal materna por esta bactéria parece ser uma causa importante para a prematuridade e a prematuridade é um forte fator de risco para a infecção (STOLL, et al., 2005; GOLDEMBERG, CULHANE; 2003). Para Towers e Briggs (2002), os fatores de risco para a infecção neonatal por ECO ainda não estão bem esclarecidos e a profilaxia intraparto com antibióticos pode aumentar o risco de torná-la resistente à ampicilina.

Entre as sepses causadas por outros agentes, que não o EGB, particularmente os Gram negativos como a ECO, estão associados a alto índice de mortalidade e resistência a antibióticos. Borges et al. (2005), avaliando a colonização por EGB em gestantes e a suscetibilidade das amostras isoladas aos antibióticos entre 2003 a 2004 no Brasil, encontraram a colonização em 19,9% (p=0,05) na população que estudaram, com cepas resistentes aos antimicrobianos recomendados para os casos de alergia à penicilina (9,4% para a eritromicina e 6,2% para a clindamicina), com tendência ao aumento desta resistência.

Jaconias e Picoli (2007) relataram ter encontrado uroculturas positivas em 16% de gestantes assintomáticas até o terceiro mês de gestação. Em 76% destas amostras foi encontrado ECO, que é o agente mais comum na infecção do trato urinário (ITU) e presente em 10 a 12% das gestantes.

O *Streptococcus pneumoniae (SP)* está presente em mais de 50% da população saudável no trato respiratório. Foi raramente responsável pela sepse neonatal (1-8%). As características clínicas

desta infecção são similares aos de outras infecções neonatais, porém o resultado foi particularmente grave com mortalidade de 50% e seqüelas neurológicas de 13%. Os RN são mais freqüentemente infectados no canal vaginal materno que foi colonizado por SP, apesar da sua raridade na colonização. Essa situação rara, juntamente com a dificuldade em isolar SP a partir de esfregaços vaginais, inviabiliza a busca sistemática a este organismo no pré-natal. No entanto, maior importância deve ser anexada no conhecimento da colonização vaginal por pneumococo na gravidez ou no recém-nascido, a fim de melhorar o tratamento e os resultados obtidos (NADER et al., 2005, HOFFMAN, et al., 2005).

Os sintomas da infecção neonatal não são específicos, mesmo para os diferentes agentes, havendo a necessidade de testes microbiológicos e moleculares mais sensíveis e específicos (KE et al., 2000; BROZANSKI et al., 2006). A hemocultura é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de sepse, embora sejam levantadas questões quanto a sua credibilidade (HONEST et al., 2006; BROZANSKI et al., 2006). Ademais, os resultados das culturas ficam disponíveis em tempo não menor que 48-72 horas, atrasando o início do tratamento específico (YADAV et al., 2005).

**2.1 HISTÓRICO**

Os agentes etiológicos responsáveis pelas infecções congênitas variam no tempo. Antes de 1940, o estreptococo hemolítico *S. pyogenes* era o agente mais freqüente responsável por infecções com risco de vida no período neonatal. Com a introdução do uso da penicilina, houve um declínio da doença estreptocócica. Na década de 50, surgiu o *Staphylococcus aureus* como patógeno neonatal predominante. A melhora da assistência ao neonato, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos ativos contra estafilococos produtores de penicilinase e o aumento da sobrevivência dos neonatos de baixo peso no final da década de 50, coincidiram com a emergência de microrganismos entéricos Gram negativos, principalmente ECO, como principal patógeno neonatal. Na década de 60, houve o conhecimento da epidemiologia da colonização e doença bacteriana Gram negativa, a introdução de agentes antimicrobianos ativos contra microrganismos entéricos e a evidência de EGB, que passa a ser reconhecido como o principal agente das septicemias e meningites neonatais. Na década de 70 houve um decréscimo na incidência da doença neonatal pelo EGB e a ocorrência dos Estreptococos alfa-hemolíticos não pertencentes ao grupo D, do *Haemophilus influenzae*, do *Staphylococcus epidermidis* e do *Streptococcus pneumoniae* como patógenos neonatais importantes (SPECK; ARONOFF; FANAROFF, 1990). Porém, os *Estreptococos do grupo B*, que surgiram como a principal causa de morbidade e mortalidade neonatal nos Estados Unidos nos anos 70, apresentaram taxas de mortalidade iniciais tão altas como 50%. No início dos anos 80, triagens clínicas demonstraram que a administração de antibióticos, durante o trabalho de parto, às mulheres com presença de fatores de risco para a transmissão da infecção aos seus recém nascidos, prevenia a doença invasiva na primeira semana de vida, isto é, a doença de início precoce e as taxas de mortalidade caíram para 15% a 25% (CDC, 2002). Nos anos 90, as medidas preconizadas pelo CDC, foram adotadas e debatidas pelo Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (ACOG) e CDC em 1996 e pela Academia Americana de Pediatria (AAP) em 1997. Essas diretrizes recomendavam duas estratégias na prevenção da transmissão da infecção: uma baseada em fatores de risco e outra baseada em culturas de *swab* vaginal e retal de todas as gestantes na 35ª e 37ª semanas de gestação. Esses métodos eram utilizados para identificar as mulheres que receberiam a quimioprofilaxia intraparto. Os fatores de risco eram: parto prematuro (< 37 semanas de gestação), febre intraparto ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ), bolsa rota em tempo  $\geq 18$  horas antes do parto, história de parto prévio com doença neonatal precoce pelo EGB (com cultura positiva ou não em *swab* vaginal ou retal). As culturas identificavam as portadoras assintomáticas e as portadoras de infecção do trato urinário ou com bacteriúria pelo EGB (CDC, 2002). Medidas preventivas foram adotadas reduzindo a taxa de incidência da infecção neonatal pelo EGB para 1,8 a 4 por 1.000 nascidos vivos e taxas de óbitos menores que 10%. Após 1996, quando foram adotadas as diretrizes do CDC mais amplamente, a incidência da infecção neonatal pelo EGB ficou entre 1,4 a 1,3 por 1.000 nascidos vivos, com uma taxa de óbitos menor que 5%, tanto nos Estados Unidos da América, como nos países que adotaram protocolo semelhante. Estima-se em 78% a redução dos casos de doença neonatal precoce com a estratégia baseada nas culturas no pré-natal e 41% se a estratégia for baseada nos fatores de risco materno (WALKER; ESTRADA, 2003). Barrington (2002) em correspondência sobre a Força Tarefa Canadense em setembro de 2002, referia que somente 50% das mães de RN com infecção pelo EGB tinham os fatores de risco listados e poucas se beneficiavam com a quimioprofilaxia intraparto. Portanto, se fosse utilizado o benefício



dos exames rápidos universais propostos pela Força Tarefa, seria reduzido o número de mães que receberiam a quimioprofilaxia intraparto. Porém, segundo McMillan (2003) a estratégia baseada em dados demonstra que a investigação através de cultura é significativamente mais efetiva na prevenção da doença, que a baseada nos fatores de risco e há relatos de que está aumentando o número de infecções por Gram negativos ampicilina resistentes entre os RN em algumas áreas, o que não está sendo observado com o EGB. Mas já se sabe que outros organismos Gram positivos, que também causam doença neonatal – especialmente os *Streptococcus pneumoniae* (SP) – estão se tornando resistentes. Nas orientações do MMWR (2009) é citado um relatório de 2007 mostrando que no período de 2003 – 2005 a doença neonatal precoce aumentou em relação à de início tardio, impulsionado por um aumento da incidência em RN da raça negra, sugerindo ser necessário um acompanhamento das tendências desta infecção e determinar as intervenções necessárias.



Entre os fatores predisponentes e de risco mais importantes para a septicemia neonatal encontramos a prematuridade e, conseqüentemente, os fatores que a promovem. Esses fatores estão relacionados com o: i) hospedeiro (prematuridade, gemelaridade, mesmo quando controlada quanto ao baixo peso e à idade gestacional, erros inatos do metabolismo, diferenças no sistema imune do RN em relação aos lactentes e crianças maiores, monitorização fetal, manipulação obstétrica, esforços vigorosos de ressuscitação); ii) fatores maternos (raça, saúde e a flora bacteriana vaginal); iii) fatores ambientais facilitando a transmissão de germes da flora vaginal por via ascendente (ruptura das membranas fetais por um período maior que 24 horas) são reconhecidos como causadores de septicemia neonatal. A transmissão transplacentária e a infecção intra-uterina devido aos patógenos bacterianos são raras, porém já vinha sendo observada com o *Streptococcus sp* entre outros (SPECK; ARONOFF; FANAROFF, 1990).

Para Pereira et al. (2004) os fatores de risco para infecção neonatal de causa obstétrica materna, variam de 2 – 11%, principalmente quando há mais de um fator associado. Os principais mecanismos de infecção fetal são por via transplacentária e por via ascendente. Mais raramente a infecção pode ser causada por extensão de uma infecção em vias adjacentes ou conseqüentes ao emprego de métodos invasivos para diagnóstico ou terapêutica intra-uterina.

Pela via transplacentária, o germe que atingiu diretamente a corrente sanguínea materna pode levar às seguintes conseqüências:

Infecção placentária sem infecção fetal;

Infecção fetal sem infecção placentária;

Infecção placentária e fetal;

Ausência de infecção placentária e fetal.

A via ascendente é aquela seguida por agentes bacterianos encontrados na flora vaginal ou digestiva materna. Produz invasão do líquido amniótico, com ou sem reação inflamatória das membranas. É de conhecimento geral que algumas cepas de ECO, em particular as que possuem antígeno K1, estão freqüentemente associadas à sepse neonatal. As infecções ascendentes são observadas principalmente, depois de ruptura das membranas sendo sua incidência aumentada em proporção direta ao tempo da bolsa rota. A presença de bactérias na cavidade amniótica é detectada em quase 100% dos casos após 24 horas de bolsa rota, o mesmo acontecendo com a manipulação excessiva da gestante, pois favorece a contaminação da cavidade amniótica. Porém, em apenas 5% a 10% dos casos de amnionite se observa infecção fetal. Por outro lado, em 5% dos casos, encontramos bactérias no líquido amniótico, com bolsa íntegra (CDC 2002; CHEN et al., 2002; ODDIE; EMBLETON, 2002).

Diversos estudos colaborativos concluíram que a incidência de sepse em RN de mães com bolsa rota por tempo superior a 24 horas é de aproximadamente 1 a 2%. Na presença de sinais e sintomas de corioamnionite, o risco de sepse comprovada eleva-se para 3% a 5%. Infecção intra-amniótica clinicamente evidente complica 1% a 10% das gestações, podendo resultar em morbidade materna e morbidade e mortalidade perinatal mais elevadas. O diagnóstico clínico de corioamnionite

é difícil, com achados inespecíficos, devendo ser suspeitado sempre que a gestante apresente sinais gerais de infecção ou o feto apresente taquicardia. Na corioamnionite o risco de sepse é de 10% a 15% no RN a termo e de 35% a 50% no prematuro (MIURA; SILVEIRA; PROCIANOY, 1999; PEREIRA et al., 2004).

Estudando a taxa de mortalidade neonatal por EGB na Croácia, após a implantação do protocolo do CDC, Elvedi-Gasparović e Peter (2008), encontraram como formas comuns da doença neonatal precoce, sepse (65%), pneumonias (32,2%) e meningite (3%). A idade gestacional média no estudo foi de 34,5 semanas e ocorreram 2 óbitos neonatais (3%). A mortalidade entre os prematuros caiu de 5% para 3% na população estudada. Embora a incidência da doença nesta população tenha sido considerada alta, ficou evidenciado que a quimioprofilaxia intraparto para o EGB reduziu a mortalidade perinatal devido à infecção neonatal e sepse.

Os efeitos imediatos e em longo prazo das infecções de transmissão mãe-filho (vertical) representam um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Os dados observados na literatura de referência variam, porém a grande maioria dos autores confirma que as taxas de colonização nas populações estudadas variam entre 4% e 30%. Nos neonatos de mulheres colonizadas, ocorre a transmissão vertical em 60% a 70% e a incidência de transmissão da doença invasiva em neonatos com cultura positiva é inferior a 1%.

Nos neonatos infectados pelos EGB, a doença de início precoce se apresenta de modo agudo, multissistêmica e é caracterizada clinicamente por apnéia, dificuldade respiratória e hipotensão, em tudo se assemelhando à Doença da Membrana Hialina; a doença tardia apresenta-se de modo insidioso depois da primeira semana de vida, sendo a meningite a apresentação mais comum e o EGB do tipo III é isolado com maior frequência (90%) (SPECK; ARONOFF; FANAROFF, 1990). Para a *Escherichia coli* o quadro mais freqüente, além de septicemia neonatal, é o de Meningite neonatal.

Os fatores de risco comuns para o EGB e ECO (baixa idade gestacional, baixo peso ao nascer e rotura prolongada de membranas) não pareceram ser fatores de risco para a Infecção neonatal pelo SP. A maioria dos relatos sugerem que os bebês infectados tem idade gestacional maior ou igual a 38 semanas e a maioria das mães estavam assintomáticas no momento do parto. A sepse neonatal precoce por SP teve um pior prognóstico e maior mortalidade do que a sepse tardia (GOMEZ et al., 1999).

O diagnóstico precoce e de certeza é difícil, principalmente nas situações de sepse neonatal precoce, porque não há teste diagnóstico definitivo; além disso, a hemocultura e demais exames de culturas de líquidos biológicos e de secreções do organismo apresentam uma inaceitável baixa incidência de resultados positivos (MIURA; SILVEIRA; PROCIANOY, 1999).



### 2.3.1 OS ESTREPTOCOCOS:

Segundo Santos (1999), “A primeira vez em que foi isolado microorganismo esférico disposto caracteristicamente em cadeia foi em 1874, por Billroth, coletando material purulento de pacientes com erisipela”.

Em 1884, Rosenhac (apud TCHARNIAKOVSKY, 1976) emprega pela primeira vez o nome *streptococcus* (do grego *strepto* = cadeia) para designar essa bactéria, que posteriormente foi responsabilizada por várias infecções e encontrada como saprófita do homem e de animais.

Os estreptococos são bactérias Gram positivas, esféricas ou ovóides, na sua grande maioria imóvel, menor que 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Apresentam-se em cadeias em meio líquido e aos pares quando in vivo. São classificados como pertencentes à família *Streptococcaceae*, gênero *streptococcus*, com 21 espécies diferentes.

Existem várias classificações laboratoriais diferentes envolvendo esses microorganismos: considerando o comportamento quanto ao padrão de hemólise, composição antigênica, características de crescimento e reações bioquímicas.

Devido à sua diversidade de comportamento nos meios de cultura em placas de Ágar-sangue, foi primeiramente classificado por Schottmüller em 1903 (apud TCHARNIAKOVSKY, 1976), em três tipos:

1. **Estreptococo alfa ou viridante:** produz um halo de hemólise parcial em torno da colônia;
2. **Estreptococo beta hemolítico:** produz lise total das hemácias em torno da colônia;
3. **Estreptococo gama ou inerte:** não determina hemólise.

Os estreptococos betas hemolíticos são encontrados causando doenças no homem, enquanto os alfas hemolíticos são encontrados como saprófitas na orofaringe e intestinos humanos, podendo causar endocardites bacterianas e até septicemia neonatal (SANTOS 1999).

Em 1919, Brown, sistematizou a primeira classificação dos estreptococos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Em 1933, Rebecca Lancefield, descreveu um novo método sorológico para diferenciar o estreptococo beta hemolítico, a partir dos componentes antigênicos da parede celular da bactéria. Por reação de precipitação com soros específicos, ela classificou o estreptococo beta hemolíticos em grupos A, B, C, D,..., R, S. Observou também que algumas cepas  $\alpha$  e  $\gamma$  hemolíticas podiam apresentar antígenos grupo específicos. Em 1935, Lancefield e Hare, mostraram que praticamente todas as infecções humanas graves provocadas pelos estreptococos beta hemolíticos, no puerpério principalmente, eram causados pelos estreptococos do grupo A e B, de acordo com observações no isolamento do Queen Charlotte`s Hospital (FRY; ENG, 1938).

Nos estudos da septicemia neonatal, o estreptococo beta hemolítico ocupa ainda hoje papel importante na sua etiologia. Com o melhor conhecimento da sua epidemiologia, voltou a ser responsabilizado por um grande número de casos de septicemias e meningites neonatais. O mesmo

vem acontecendo com outro grupo de estreptococos (grupo *Milleri* e o *S. pneumoniae*).

Os estreptococos possuem na sua estrutura três componentes principais: cápsula, parede celular e membrana citoplasmática, e os produtos extracelulares.

Cápsula: é um revestimento que retarda a fagocitose por polimorfonucleares e macrófagos, sendo um fator de virulência;

Parede celular: está relacionada com a sua patogenicidade. É onde está localizado o carboidrato grupo específico que vai determinar a separação dos estreptococos beta hemolíticos em grupos específicos (A a O) de Rebecca Lancefield. Localizado superficialmente na parede celular, possibilita a reação com anticorpos específicos dirigidos diretamente contra ele. O estreptococo do grupo B possui em sua parede o carboidrato B específico e são identificados cinco sorotipos diferentes: Ia, Ib, Ic, II e III, sendo os tipos mais comumente isolados o II e III. Membrana celular ou citoplasmática: é delgada e possui na sua estrutura antígenos distintos dos encontrados na parede celular. Quando os estreptococos perdem a cápsula (protoplastos ou formas L) ficam revestidos externamente pela membrana celular, são osmoticamente frágeis e resistentes à penicilina e outros antibióticos beta – lactâmicos;

Produtos extracelulares: a ampla variedade de doenças causadas pelo estreptococo beta hemolíticos está relacionada ao grande número de produtos extracelulares produzidos. São substâncias, predominantemente proteínas com ações tóxicas, enzimáticas ou com outras atividades biológicas. Esses produtos comumente estimulam a formação de anticorpos específicos durante a infecção, que podem ser utilizados para testes sorológicos diagnósticos (SANTOS 1999).

### **2.3.1.(a) STREPTOCOCCUS AGALACTIAE:**

O *Streptococcus agalactiae* ou Estreptococos do Grupo B (EGB) é um diplococo Gram positivo beta hemolítico, faz parte da microbiota de seres humanos e animais, colonizando o trato intestinal e geniturinário. A contaminação de neonatos ocasiona quadros graves de septicemia, pneumonia e meningite (SCHRAG et al.,2002).

### **2.3.1.(b) STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE:**

O *Streptococcus pneumoniae* é um diplococo Gram positivos alfa hemolítico. Está presente em mais de 50% da população saudável no trato respiratório. São relativamente raros nas infecções em recém-nascidos mas estão associados com significativa morbidade e mortalidade (HOFFMAN et al., 2005; STROBEL et al.,1999). O SP nos recém-nascidos é transmitido pela via ascendente, na passagem pelo canal do parto. O *Streptococcus pneumoniae* não faz parte da microbiota vaginal, mas coloniza algumas mulheres, podendo ser parte da microbiota vaginal transitória e a infecção pélvica pode ocorrer especialmente se existir uma condição predisponente (p.ex. utilização de um dispositivo contraceptivo intra-uterino (DIU), parto anterior recente ou cirurgia ginecológica). A

colonização do trato genital feminino ocorre possivelmente por instrumentos obstétricos contaminados ou por práticas sexuais oro-genitais. A melhoria nas práticas citadas diminuirá a sua incidência (KHALIFA; AGARWAL, 2005).

### **2.3.2 ESCHERICHIA COLI:**

O gênero *Escherichia* foi assim denominado em homenagem a Theodor von Escherich, que em 1885, descreveu a *Escherichia coli*.

Graças aos trabalhos de KAUFFMAN et al. (apud BIER, 1985), sabemos que a ECO compreende numerosos sorotipos, com diferenciações baseadas nos seguintes antígenos: antígeno somático (O), antígeno de invólucro e o antígeno flagelar. A ECO produz duas toxinas distintas, ambas capazes de produzir dilatação e aumento do volume de fluido em segmento do íleo de coelho e quem afeta o metabolismo hidrossalino. Com relação à patogenicidade, podemos distinguir que a ECO, normal da microbiota intestinal, só é patogênica em localizações extra-intestinais. A ECO enteropatogênica é discriminadas em três grupos: a *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC); a *E. coli* enterotoxígena; e a *E. coli* invasora. A enteropatogenicidade está associada a certos sorogrupos. O RN pode adquirir a infecção ainda no útero, durante o parto ou ainda no período pós-parto (FREDDI, 1985).



**3. OBJETIVOS**

**3.1 Geral:**

Avaliar a viabilidade da extração de DNA genômico de sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos que foram intubados logo após o nascimento, para diagnóstico molecular precoce de microorganismos alvos, por PCR de alta sensibilidade em tempo real.

**3.2 Específicos:**

3.2.1. Avaliar a viabilidade desses espécimes biológicos (sangue e aspirado traqueal e gástrico e para a presença de DNA genômico.

3.2.2. Desenhar oligonucleotídeos iniciadores para PCR em tempo real, a partir de seqüências genômicas de microorganismos definidos como alvos na sepse neonatal

3.2.3. Aplicar a técnica de PCR em tempo real para a identificação dos microorganismos alvos, nos espécimes estudados.

#### **4. POPULAÇÃO E MÉTODOS**

**4.1. POPULAÇÃO** - Participaram do estudo 81 crianças nascidas no período de outubro de 2006 a Setembro de 2008. A população foi selecionada utilizando-se os fatores de risco do protocolo do CDC (2002) que contém as estratégias para a profilaxia antimicrobiana intraparto para prevenção da doença perinatal pelo Estreptococo do Grupo B (*Streptococcus agalactiae*), entre os RN que evoluíram para ventilação mecânica logo após o nascimento.

As crianças foram incluídas conforme a ordem de chegada na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Universitário - UFMS e da ABCG - Santa Casa de Campo Grande/MS, independentemente de etnia, cor, sexo e idade gestacional.

A pesquisa foi iniciada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS e as mães ou responsáveis deram o seu consentimento de participação voluntária no estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

**4.2 AMOSTRAS** - Das crianças que preencheram os critérios de seleção para o estudo (Protocolo CDC-2002) e necessitaram intubação num período de até 2 horas após o nascimento, foi colhido aspirado traqueal imediatamente após a intubação. O material foi colhido assepticamente na UTI neonatal dos hospitais e colocado em frasco estéril, conservado em congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a extração de DNA. Posteriormente foi realizada Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCRtr). Em algumas crianças foi colhido simultaneamente aspirado gástrico e sangue periférico. O aspirado gástrico foi colocado em frasco estéril, conservado em congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  e o sangue periférico, aproximadamente 1 ml, colocado em tubo com EDTA e também conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**4.3.1 Extração de DNA genômico** - Para o ensaio molecular foi extraído o DNA do sangue e dos aspirados traqueais e gástricos de acordo com o método de Grimberg et al (1989) com algumas modificações realizadas no Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica Funcional (NUFIGEN-ICB-UFMG) para sangue total a fresco ou congelados em nitrogênio líquido. Foi removida uma alíquota de 0,3 ml (300  $\mu\text{l}$ ) do sangue, aspirado traqueal e gástrico, colocado em um tubo de 2ml. Acrescentou-se 1ml de Tampão de Lise Celular. Centrifugou-se por 5 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante foi então desprezado em papel absorvente. Estes procedimentos foram repetidos por quatro vezes. Foi acrescentado 400 $\mu\text{l}$  de Master Mix, sendo 390  $\mu\text{l}$  de Tampão de digestão de proteínas e 10  $\mu\text{l}$  de Proteinase K, e agitado por 15 segundos. As amostras foram incubadas a  $55^{\circ}\text{C}$  em Banho Maria por pelo menos 2 horas, e agitadas a cada 30 min. O material foi centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, e acrescentado 190  $\mu\text{l}$  de Cloreto de Litium 7,5 M. As amostras foram agitadas por aproximadamente 5 segundos e colocadas no gelo seco por 10 minutos. Foram então centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm. De cada amostra foi retirado cuidadosamente o sobrenadante e colocado em um novo tubo. O DNA genômico foi precipitado com a adição de 1 ml de etanol a 100%. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet de DNA lavado com 1 ml de Etanol 70%, centrifugado novamente. O etanol 70% foi descartado, o pellet deixado secar por 30 min. e acrescentado 250 $\mu\text{l}$  de tampão TE pH 7,5 em cada amostra. Após a extração, o DNA genômico foi

quantificado pela leitura em Genequant-OD260. Alíquotas de aproximadamente 200 ng de cada amostra foram utilizadas para PCR convencional ou 5 ng/μl para PCRrt.

As alíquotas de DNA genômico foram submetidas à PCR em datas diferentes e em locais diferentes: Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Pediatria da UFMS – Extração de DNA genômico, e Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica Funcional (NUFIGEN-ICB-UFMG) para PCR e PCRrt. As amostras foram submetidas novamente à PCRrt no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia da Universidade de Akron, EUA. Neste Laboratório as amostras foram quantificadas pelo espectrofotômetro NanoDrop™.

**4.3.2 PCR convencional** - Para verificação da viabilidade das amostras de DNA genômico selecionados para posterior PCR em Tempo Real, utilizou-se PCR convencional (Saiki et al, 1985) com algumas modificações para β-actina humana. Os primers selecionados foram: HFORBACT = 5'-tcaccacactgtgccatctacga-3' e HREVBACT = 5'-cagcggaaaccgctcattgccaatgg-3' para o gene da β-actina humana, para um amplicon de 295pb (**Fig. 1**).

Resumidamente, a PCR foi realizada em 7 amostras escolhidas aleatoriamente com 200 ng de DNA genômico de cada, resultando num volume de 10 μl. Foi feito um mix de primers. Utilizando-se para cada tubo 14 μl de água mili-Q SF; 2,5 μl de tampão PCR 10x; 2 μl de dNTP mix (200 μM cada dNTP); 2,5 μl de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM; 2 μl de cada *primer* (10 pmol/μl); 0,125 μl (2,5 U) de Taq DNA polimerase (Laboratório Phoneutria) e 2 μl de DNA genômico, num volume total de 50 μl de reação. Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água. Adicionou-se 30 μl de óleo mineral em cada tubo. A reação foi desenvolvida em termociclador *MJ Research Minicycler* com o seguinte programa: 95°C/5 min.; seguido de 52°C/2 min. e 72°C/2 min.; seguidos de 05 ciclos de 94°C/1 min.; 56°C/1 min. e 72°C/1 min.; seguidos de 40 ciclos de: 93°C/ 1 min.; 56°C/ 1 min. e 72°C/1 min.; com extensão final a 72°C/4 min. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 3 μl da PCR para eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata.

**4.3.3 Gel de Poliacrilamida** - Para a eletroforese dos produtos de PCR convencional, o gel de poliacrilamida foi preparado utilizando-se 5,4 ml de solução estoque de acrilamida 30%; 4 ml de TAE 5x; 150 μl de persulfato de amônio 10%; 10 μl de TEMED e q.s.p. 10 ml H<sub>2</sub>O destilada. Foram utilizados 3 μl (100 ng) de marcador 100 pb DNA *ladder* e 3 μl de amostras para os produtos de PCR. Após o fracionamento, foi feita uma fixação por 10 minutos em 20 ml etanol (100%), 1 ml ácido acético (0,5%) e H<sub>2</sub>O destilada (q.s.p.) 100 ml. Em seguida, foi realizada a impregnação por 10 minutos em AgNO<sub>3</sub> (0,1%). Lavou-se o gel em H<sub>2</sub>O destilada por 3 a 5 minutos e revelou-se por 10 minutos em solução contendo 6 gramas de NaOH (3,6%), 600 μl formol (0,3%) e q.s.p. 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada (GRIMBERG et al, 1989).

**4.3.4 Purificação do Amplicon da β-actina por Eletroforese e Eletroeluição** - Com o objetivo de se obter um fragmento de PCR puro e específico para quantificação e utilização como padrão na

PCR em Tempo Real, foi feito um pool de 10 µl de cada amostra da PCR convencional contendo o amplicon da β-actina, resultando em 70 µl que foram purificados em gel de agarose a 3%. Foram adicionados 10 µl de tampão de aplicação, num volume final de 80 µl, em seguida 35 µl foram aplicados em duas canaletas. A eletroforese foi realizada a 85 volts por aproximadamente 90 minutos de corrida em tampão TBE (1x). Com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, a banda do amplicon de 295 pb, específico da β-actina, foi cortada do gel, evitando-se excesso de agarose. A banda foi colocada em um saco de diálise de 1,5 x 4 cm, com 1 mL de tampão TBE 0,5x e submetido a separação do gel por eletroeluição durante 30 min. a 100 volts. O fragmento de PCR da β-actina separado do gel por eletroeluição foi posteriormente purificado de acordo com o seguinte protocolo: acrescentou-se álcool isoamílico (1:1, v/v) e a fase inferior foi transferida para outro tubo. Em seguida, acrescentou-se 0,1 volumes de acetato de sódio e 1 volume de isopropanol. O *pellet* de DNA precipitado foi obtido por centrifugação a 13.000 rpm/15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 500 µl de etanol a 75% e centrifugado novamente por 5 minutos. O *pellet* foi seco em centrífuga a vácuo e ressuscitado em 300 µl de água mili-Q SF. O fragmento purificado foi quantificado em espectrofotômetro *GeneQuant*. Após a purificação foi feito um gel de poliacrilamida com 3 µl (200 ng) de marcador 100 pb DNA *ladder* e 3 µl (≈ 100 ng) do fragmento purificado para confirmação da integridade e pureza do amplicon. Depois de purificado foi feita a determinação das concentrações do amplicon para posteriormente ser usado na curva de calibração da PCRtr, através de diluições sucessivas de 1ng até 10<sup>-9</sup> ng.

**4.3.5 PCR em tempo real (PCRrt) -** Para a reação de PCR em Tempo Real foi utilizado o kit *SYBR GREEN PCR core Reagents* da PE Biosystems (No. Cat. 4304886; Warrington, UK). Os primers selecionados foram: SAGAFOR = 5'-TTGCAGCCAGTTGAAGATCGTTAT- 3' e SAGAREV = 5'-TAATTCCATAAATCGCTTTGTATC- 3' para o gene *rpoB* da RNA polimerase de EGB, para um amplicon de 90pb (**Fig. 2**). Para o *S.pneumoniae* os primers selecionados foram SPNFOR = 5'-GCCGTTGCGACAGCATGTATTCCT-3' SPCAREV = 5'-GACGTTGTATGTTGGTACCCATGA-3' com amplicon de 92 pb (**Fig. 3**). Para a *E.coli* os primers selecionados foram ECOFOR = 5'- CAT CAG ATG GAG CCG GGC ATG CCA-3'e ECOREV = 5'- GAG AAT TAC TCG TCT TCC AGT TCG-3'com amplicon de 98 pb (**Fig. 4**).

Utilizou-se o protocolo básico mantendo as concentrações usuais de reagente num volume final de reação de 20 µl. Resumidamente, a reação consistiu-se de: 8,7 µl de água para PCR (SF); 10 µl de tampão (*10x SYBR Green PCR buffer*); 1,2 µl de dNTP mix (200 µM cada); 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 3 µl de EGB *primer mix* (1,5 pmol de SAGAFOR e 1,5 pmol SAGAREV), (1,5 pmol de SPNFOR e 1,5 pmol SPCAREV) , (1,5 pmol de ECOFOR e 1,5 pmol ECOREV) ou 3 µl de β-actina *primer mix* (senso e antisenso - 1,5 pmol cada); 0,15 µl (5 U/µl) de enzima AmpliTaq Gold™ e 1 µl de DNA genômico (aproximadamente 200 ng). Os controles negativos para EGB, *S.pneumoniae*, *E.coli* ou β-actina foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. A reação em tempo real foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 SDS* no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°C/1 min. Como controle positivo e para posterior quantificação dos resultados, uma curva-padrão

do amplicon de  $\beta$ -actina purificado foi construída a partir de diluições seriais de: 1 ng,  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-9}$  ng. Para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR em Tempo Real foi realizada uma curva de dissociação como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS* e os fragmentos amplificados também foram posteriormente visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.

TCACCCACACTGTGCCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCCCCATGCCATCCT  
GCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACTGACTACCTCATGAAGATCCTC  
ACCGAGCGCGGCTACAGCTTCACCACCACGGCCGAGCGGGAAATCGTGCGT  
GACATTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAAGAGATGG  
CCACGGCTGCTTCCAGCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCTGACGG  
CCAGGTCATCACCATTGGCAATGAGCGGTTCCGCTG

**Figura 1-** Sequência de nucleotídeos da região alvo do PCR para  $\beta$ -actina humana (295 pb). Os iniciadores selecionados para PCR convencional e PCRrt estão sublinhados.

**SAGAF1**

1 **TTG CAG CCA GTT GAA GAT CGT TAT** GAA GAG TTA GGT GAG TTA CTT  
AAC GTC GGT CAA CTT CTA GCA ATA CTT CTC AAT CCA CTC AAT GAA

46 AGT GAT CCA TAT GTT GTT TCA **GAT ACA AAG CGA TTT ATG GAA TTA**  
TCA CTA GGT ATA CAA CAA AGT CTA TGT TTC GCT AAA TAC CTT AAT

91 TCA CGT GAA GAA GCT AAT ACT CGA GAA ACT GTC ACA GCT TAT AGA  
AGT GCA CTT CTT CGA TTA TGA GCT CTT TGA CAG TGT CGA ATA TCT

136 GAA TAT AAG CAA GTC ATT CAA AAT ATT TCA GAT GCT GAA GAA ATG  
CTT ATA TTC GTT CAG TAA GTT TTA TAA AGT CTA CGA CTT CTT TAC

181 ATC AAG GAT GCT TCT GGT GAT GCT GAA TTG GAA GAA ATG GCT AAA  
TAG TTC CTA CGA AGA CCA CTA CGA CTT AAC CTT CTT TAC CGA TTT

226 GAA GAA CTT AAA GAA TCA AAA GCA GCT AAA GAA GAG TAT GAA GAA  
CTT CTT GAA TTT CTT AGT TTT CGT CGA TTT CTT CTC ATA CTT CTT

271 AGA TTA AAA ATC CTT CTA TTA CCT AAA GAT CCT AAC GAT GAT AAA  
TCT AAT TTT TAG GAA GAT AAT GGA TTT CTA GGA TTG CTA CTA TTT

316 AAC ATT ATT TTA GAA ATT CGT GGT GCT GCT GGT GG  
TTG TAA TAA AAT CTT TAA GCA CCA CGA CGA CCA CC

AMPLICON ALVO DE 90 pb

**TTGCAGCCAGTTGAAGATCGTTAT**GAAGAGTTAGGTGAGTTACTTAGTGATCCA  
TATGTTGTTTC**GATACAAAGCGATTTATGGAATTA**

SAGAFOR = 5'- **TTGCAGCCAGTTGAAGATCGTTAT**-3'  
SAGAREV = 5'- **TAATTCCATAAATCGCTTTGTATC**-3'

Figura 2- Sequência de nucleotídeos da região alvo do PCR para *S. agalactiae*. As sequências estão descritas na direção 5'-3' (CHIOU, 2001). Os iniciadores selecionados para PCRrt estão sublinhados. O fragmento do gene *rpoB* região selecionada de 350 pb com 35% de GC contém o amplicon específico de 90 pb.



**STRF1**

GAAGTGC GTGACGTGCACTACACTCACTATGGTCGTATGTGTCCAATCGA 50  
**STRR2**  
 GACACCTGAAGGACCTAACATCGGTTTGATCAATAACTTGTCATCTTATG 100  
 GACACTTGAACAAATATGGTTTTGTTCAAACACCATACCGTAAGGTTGAC 150  
 CGTGCAACTGGTGAAGTTACCAACGAAATTGTTGGTTGACTGCCGATGA 200  
 AGAAGATGAATACACAGTAGCTCAGGCTAACTCTAAATTGAACGCAGATG 250  
 GAACTTTTGCTGAAAAAGTTGTCATGGGACGTCACCAAGGGGTTAACCAA 300  
 GAATATCCAGCATCAAGCGTTGACTATATGGACGTTTCTCCTAAACAGGT 350  
 AGTTGCCGTTGCGACAGCATGTATTCCTTTCTTGAAAACGATGACTCCA 400

**STRR3**

ACCGTGCCCTCATGGGTGCCAACATGCAACGTC 433

STRF1: 5'-GAA GTG CGT GAC GTG CAC TA -3'

STRR2: 5'-GAC AAG TTA TTG ATC AAA CC -3'

Figura 3- Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das regiões codificadoras da cadeia beta da RNA polimerase escolhidas como alvo para PCR de *Streptococcus pneumoniae* (P).As seqüências estão descritas na direção 5'-3' (Padayachee & KLUGMAN, 1999 - *S. pneumoniae*. Os iniciadores selecionados estão sublinhados seqüencialmente. O alinhamento das seqüências de nucleotídeos para PCR apresentou 433 bases e identidade. Os amplicons de P contém 44,6%, de GC.

**ECOF1**

1 CTG GTC GAC GAC AAG ATG CAC GCG CGT TCC ACC GGT TCT TAC AGC  
 GAC CAG CTG CTG TTC TAC GTG CGC GCA AGG TGG CCA AGA ATG TCG

46 CTG GTT ACT CAG CAG CCG CTG GGT GGT AAG GCA CAG TTC GGT GGT  
 GAC CAA TGA GTC GTC GGC GAC CCA CCA TTC CGT GTC AAG CCA CCA

91 CAG CGT TTC GGG GAG ATG GAA GTG TGG GCG CTG GAA GCA TAC GGC  
 GTC GCA AAG CCC CTC TAC CTT CAC ACC CGC GAC CTT CGT ATG CCG

136 GCA GCA TAC ACC CTG CAG GAA ATG CTC ACC GTT AAG TCT GAT GAC  
 CGT CGT ATG TGG GAC GTC CTT TAC GAG TGG CAA TTC AGA CTA CTG

181 GTG AAC GGT CGT ACC AAG ATG TAT AAA AAC ATC GTG GAC GGC AAC  
 CAC TTG CCA GCA TGG TTC TAC ATA TTT TTG TAG CAC CTG CCG TTG

226 CAT CAG ATG GAG CCG GGC ATG CCA GAA TCC TTC AAC GTA TTG TTG  
 GTA GTC TAC CTC GGC CCG TAC GGT CTT AGG AAG TTG CAT AAC AAC

**ECOR2**

271 AAA GAG ATT CGT TCG CTG GGT ATC AAC ATC GAA CTG GAA GAC GAG  
 TTT CTC TAA GCA AGC GAC CCA TAG TTG TAG CTT GAC CTT CTG CTC

316 TAA TTC TC  
ATT AAG AG

ECOFOR = 5'- CAT CAG ATG GAG CCG GGC ATG CCA-3'

ECOREV = 5'- GAG AAT TAC TCG TCT TCC AGT TCG-3'

Figura 1-Sequência de nucleotídeos da região alvo do PCR para *E. coli*. As seqüências estão descritas na direção 5'-3' (OVCHINNIKOV et al., 1981).Os iniciadores selecionados estão sublinhados seqüencialmente. O amplicon de 323 pb contém 53% de GC.



Participaram do estudo as 81 crianças, cujas mães apresentaram algum dos fatores de risco (CDC, 2002) para receberem profilaxia antibiótica intraparto. Foram incluídas conforme a ordem de chegada às Unidades de Terapia Intensiva Neonatais do Núcleo do Hospital Universitário da UFMS e da Associação Beneficente de Campo Grande – Santa Casa.

Os parâmetros de inclusão e fatores de risco encontrados foram: Parâmetros de inclusão: Gestação pré-termo, Gestação na adolescência, Gestação gemelar, Parto cesariana.

Fatores de risco: Febre no momento do parto, Infecção do trato urinário (ITU), Bolsa rota por 18 horas ou mais (BR).

Os parâmetros e os fatores de risco para a inclusão no estudo, o número de amostras colhidas e o percentual da sua freqüência na população estudada estão descritos na tabela 1.

Freqüência dos parâmetros de inclusão e fatores de risco apresentados pelas gestantes incluídas no estudo e a proporção em que apareceram na população estudada.

<b>Parâmetros</b>	<b>Total de Amostras</b>	<b>% no total da população</b>
<b>Gestação na adolescência</b>	<b>13</b>	<b>16%</b>
<b>Gestação gemelar</b>	<b>15</b>	<b>18,50%</b>
<b>Gestação à termo (AT)</b>	<b>4</b>	<b>4,94%</b>
<b>Gestação pré-termo (PT)</b>	<b>77</b>	<b>95%</b>
<b>Febre no momento do parto</b>	<b>2</b>	<b>2,50%</b>
<b>Infecção do Trato Urinário (ITU)</b>	<b>34</b>	<b>42%</b>
<b>Bolsa Rota por &gt; 18 horas (BR)</b>	<b>28</b>	<b>34,60%</b>
<b>Parto Cesariana</b>	<b>50</b>	<b>61,70%</b>
<b>Parto normal (vaginal)</b>	<b>31</b>	<b>38,30%</b>

Tabela 1-Tipos de parto, idade gestacional e fatores de risco para a transmissão de infecção neonatal (CDC, 2002) apresentados pelos RN incluídos no estudo.

Os resultados da quantificação de DNA obtidos das amostras de aspirado traqueal, gástrico e sangue por espectrofotometria são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Quantificação das amostras de DNA genômico no sangue e aspirado traqueal e gástrico.

<b>Quantidade de material genético determinado nas amostras</b>					
<b>traqueia</b>	<b>ng/ul</b>	<b>gastrica</b>	<b>ng/ul</b>	<b>sangue</b>	<b>ng/ul</b>
1	15	1	14	7	64
2	14	5	12	27	32
5	10	6	32	29	26
6	54	21	7	31	238
7	134	22	2016	32	107
8	18	24	16	33	130
9	49	29	31	34	107
23	517	30	15	38	26
26	26	38	22	48	31
28	18	41	139	58	25
29	34	45	7	60	11
30	15	47	7	61	6
31	37	64	166	62	17
32	39	70	8	63	6
33	9	72	9	64	11
34	82	<b>total</b>	<b>15</b>	66	13
38	12			69	7
40	6			72	9
43	6			73	9
52	8			76	44
59	15			78	12
60	64			79	6
65	141			<b>total</b>	<b>22</b>
67	21				
71	10				
74	10				
75	6				
78	13				
79	17				
80	104				
81	164				
82	29				
<b>total</b>	<b>32</b>				

Tabela 2-Resultados da quantificação de DNA obtidos por espectrofotometria. As leituras de densidade óptica (OD) nos comprimentos de ondas de 260 para ácido nucléico. A quantidade total de DNA por amostra variou de 5 a 2016 ng por µl.

A Tabela 3 apresenta a quantificação de DNA genômico das 45 amostras de secreção traqueal onde foi investigado o *S. pneumoniae* e *E.coli*.

Quantificação das amostras de DNA genômico em aspirado traqueal.

	$\lambda = 260$	Concentration		$\lambda = 260$	Concentration
		( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )			( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
<b>10</b>	0,014	0,007	<b>33</b>		Nd
<b>11</b>	0,011	0,006	<b>34</b>	0,081	0,041
<b>12</b>	0,024	0,012	<b>36</b>		Nd
<b>13</b>	0	nd	<b>37</b>		Nd
<b>14</b>	0	nd	<b>38</b>	0,009	0,005
<b>15</b>	0	nd	<b>39</b>		Nd
<b>16</b>	0,011	0,006	<b>40</b>	0,003	0,002
<b>17</b>	0	nd	<b>41</b>	0,013	0,007
<b>18</b>	0	nd	<b>42</b>	0,012	0,006
<b>19</b>	0	nd	<b>43</b>	0,005	0,003
<b>20</b>	0	nd	<b>44</b>		Nd
<b>21</b>	0	nd	<b>45</b>	0,016	0,008
<b>23</b>	0,764	0,382	<b>46</b>	0,006	0,003
<b>24</b>	0	nd	<b>47</b>		Nd
<b>25</b>	0,004	0,002	<b>48</b>		Nd
<b>26</b>	0,025	0,013	<b>49</b>	0,063	0,032
<b>27</b>	0	nd	<b>50</b>		Nd
<b>28</b>	0	nd	<b>51</b>	0,021	0,011
<b>29</b>	0,025	0,013	<b>52</b>		Nd
<b>30</b>	0,007	0,004	<b>54</b>		Nd
<b>31</b>	0,024	0,012	<b>56</b>	0,014	0,007
<b>32</b>	0,041	0,021			

**Tabela 3-Resultados da quantificação de DNA obtidos por espectrofotometria. As leituras de densidade óptica (OD) nos comprimentos de ondas de 260 para ácido nucléico. A quantidade total de DNA por amostra variou de 2ng a 382ng por  $\mu\text{l}$ , (nd = não detectável).**

As leituras de densidade óptica (OD) em comprimento de onda de 260 nm para ácido nucléico (SAMBROOK et al, 1989) são apresentadas e os valores finais de concentração calculados após correção da diluição. As amostras foram consideradas viáveis para a etapa seguinte de PCR.

As concentrações finais de DNA genômico por amostra variaram de 5 a 2016 ng por  $\mu\text{l}$ .

Como teste de viabilidade das amostras de DNA dos aspirados traqueal, gástrico e sangue , foi realizado a PCR convencional com os primers da  $\beta$ -actina humana para o amplicon alvo de 295 pb. A Figura 5 mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR convencional de sete das amostras selecionadas aleatoriamente, para evidenciar a especificidade dos oligonucleotídios.

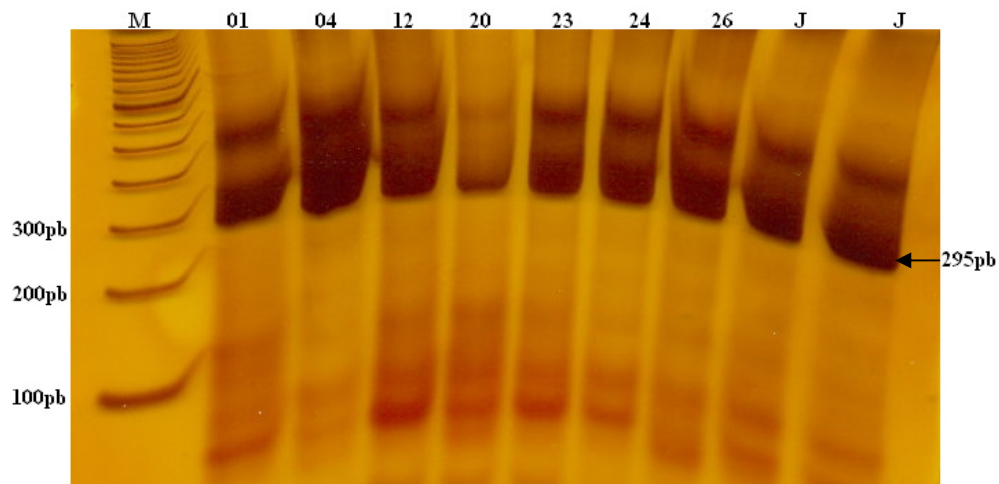
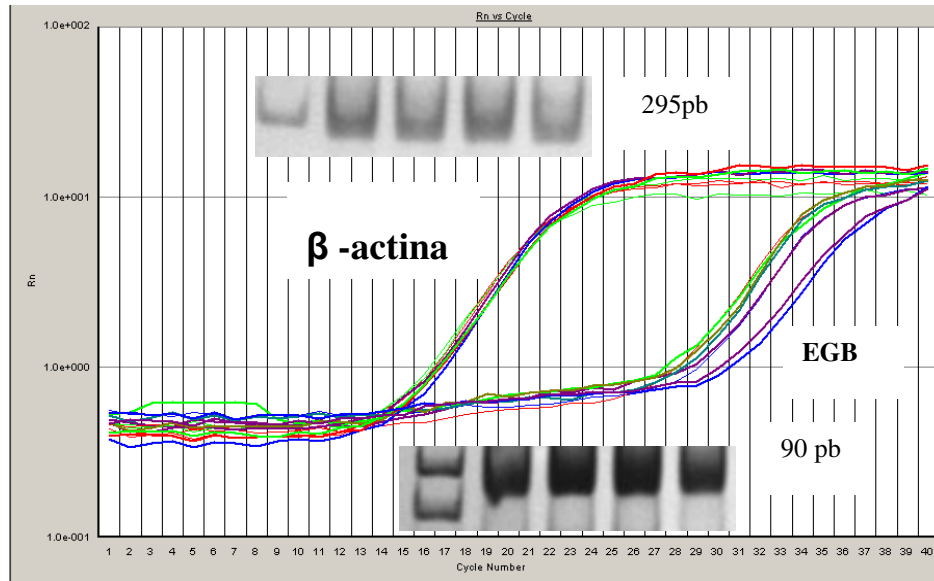


Figura 5- Resultado da PCR convencional com os primers para  $\beta$ -actina em amostras de DNA de sangue. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 3  $\mu$ l da PCR para eletroforese em gel de poliacrilamida a 110 volts/1 hora, corado com nitrato de prata. Os produtos de PCR de 295 pb são mostrados pela seta inferior para cada amostra. Canaleta 1, marcador 100 pb DNA ladder; (2-8) amostras de sangue; (9-10) amostras controles positivas para  $\beta$ -actina.

A purificação do fragmento da  $\beta$ -actina foi obtida por eletroforese em gel de agarose de PCR convencional para quantificação e como padrão na PCRrt (**Fig. 6**). Após a determinação da viabilidade das amostras foi realizado a PCRrt.



Figura 6-Purificação por eletroforese em gel de agarose a 1,2% do amplicon da  $\beta$ -actina obtido no PCR convencional para quantificação e utilização como padrão na PCR em Tempo Real. Foram utilizados 35  $\mu$ l do amplicon para cada canaleta. A eletroforese foi realizada a 85 volts por, aproximadamente, 90 min. de corrida em tampão TBE 1x. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, o fragmento de 295 pb (seta), específico da  $\beta$ -actina, foi cortado do gel e submetido a um processo de eletroeluição para separá-lo do gel.



**Figura7-Resultado do PCR em Tempo Real para o amplicon de 295 pb da  $\beta$ -actina amplificado de DNA genômico de sete amostras positivas para EGB no sangue. O gel superior mostra os amplicons de b-actina no ponto final da reação (fase estacionária da curva). O gel inferior mostra os amplicons para EGB das respectivas amostras positivas.**

Como parte do estudo foi realizada a curva padrão  $\beta$ -actina humana usada como calibrador interno da PCRrt para o diagnóstico dos amplicons alvos.

A figura 8 mostra a amplificação da Curva padrão da  $\beta$ -actina humana usada para calibrar a PCRrt para o diagnóstico de EGB, *S.pneumoniae*, *E.coli* nas amostras de aspirados traqueal, gástrico e sangue. Estes resultados demonstraram um perfil linear típico de amplificação das diluições 1ng,  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-9}$  ng, pelo SyberGreen em função do número de ciclos (Ct). Isto permite a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na PCRrt.

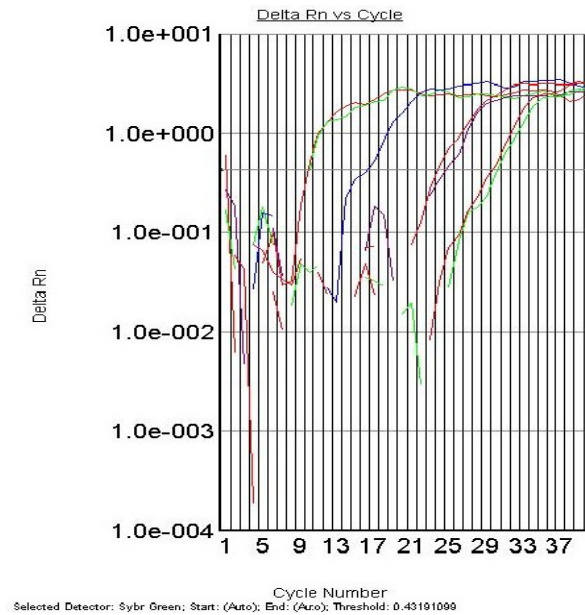


Figura 8-Curva padrão da  $\beta$ -actina humana usada como calibrador interno da PCRrt para o diagnóstico de EGB nas amostras de sangue. A figura mostra o perfil típico das curvas obtidas da esquerda para a direita durante a amplificação das diluições 1ng, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-9</sup> ng. Os valores em y são resultados da detecção de fragmentos marcados cumulativamente pelo SyberGreen em função do número de ciclos (Ct) no eixo x.

Curva de calibração da  $\beta$ -actina apresentando os quatro pontos de diluição. É dada pelo equipamento. A alta linearidade e o valor de slope da curva mostram eficiência de 100% da reação.

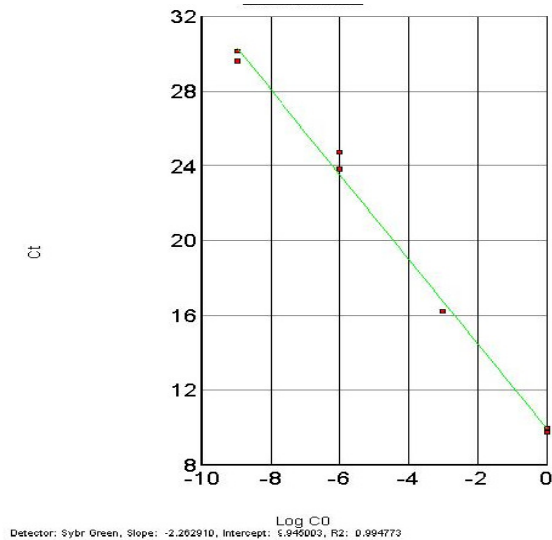


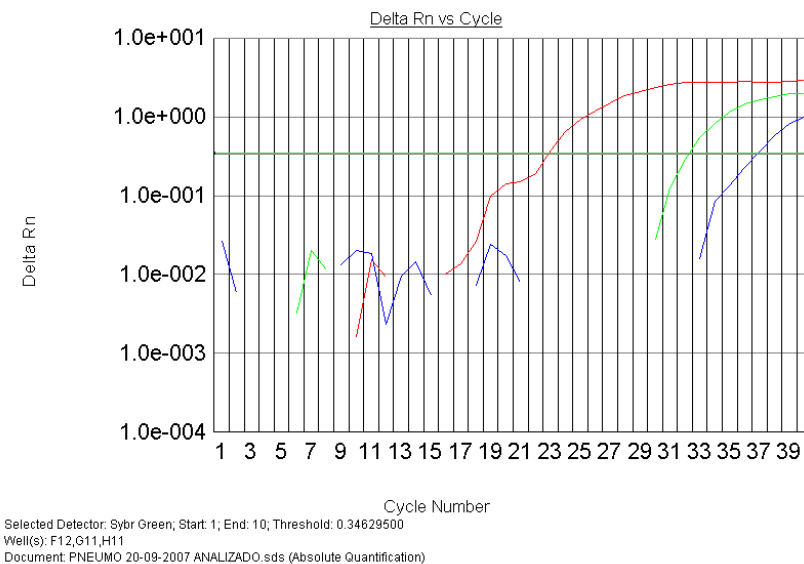
Figura 9-Curva de calibração da  $\beta$ -actina apresentando os quatro pontos de diluição. A curva apresenta alta linearidade demonstrada pelo coeficiente de regressão linear elevado ( $r^2 = 0.9947$ ). O valor de slope da curva mostra uma eficiência de 100% da reação pela equação  $E = 10\{-1/\text{slope}\}$ . Essa eficiência permite a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na PCRrt.



A figura 9 mostra os resultados obtidos pela curva de calibração da  $\beta$ -actina apresentando os quatro pontos de diluição. A curva apresentou alta linearidade demonstrada com um elevado coeficiente de regressão linear  $r^2 = 0.9947$ . Os dados mostraram que a eficiência da reação de PCR foi de 100% pela equação  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ . Estes valores de eficiência e alta linearidade da curva permitem a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na PCR, como sugerido por Pfaffl (2003).

Foram construídas curvas semelhantes para cada agente alvo do estudo, exemplificados nas figuras 10, 15, 16 e 17 (Curvas Padrões), figuras 13 e 14 (Curvas de calibração) e figuras 11, 12 e 15 (Curvas de dissociação dos positivos). A curva de dissociação substitui o gel de agarose. A banda no gel equivale ao pico visualizado na curva.

### Curva padrão para *S.pneumoniae*



**Figura 10-** A figura mostra o perfil típico das curvas obtidas da esquerda para a direita durante a amplificação das diluições 1ng, 10-3, 10-6 e 10-9 ng. Os valores em y são resultados da detecção de fragmentos marcados cumulativamente pelo SyberGreen em função do número de ciclos (Ct) no eixo x. A partir dos valores conhecidos dessas curvas o ABI prism software permite o diagnóstico quantitativo de DNA de *S.pneumoniae*.

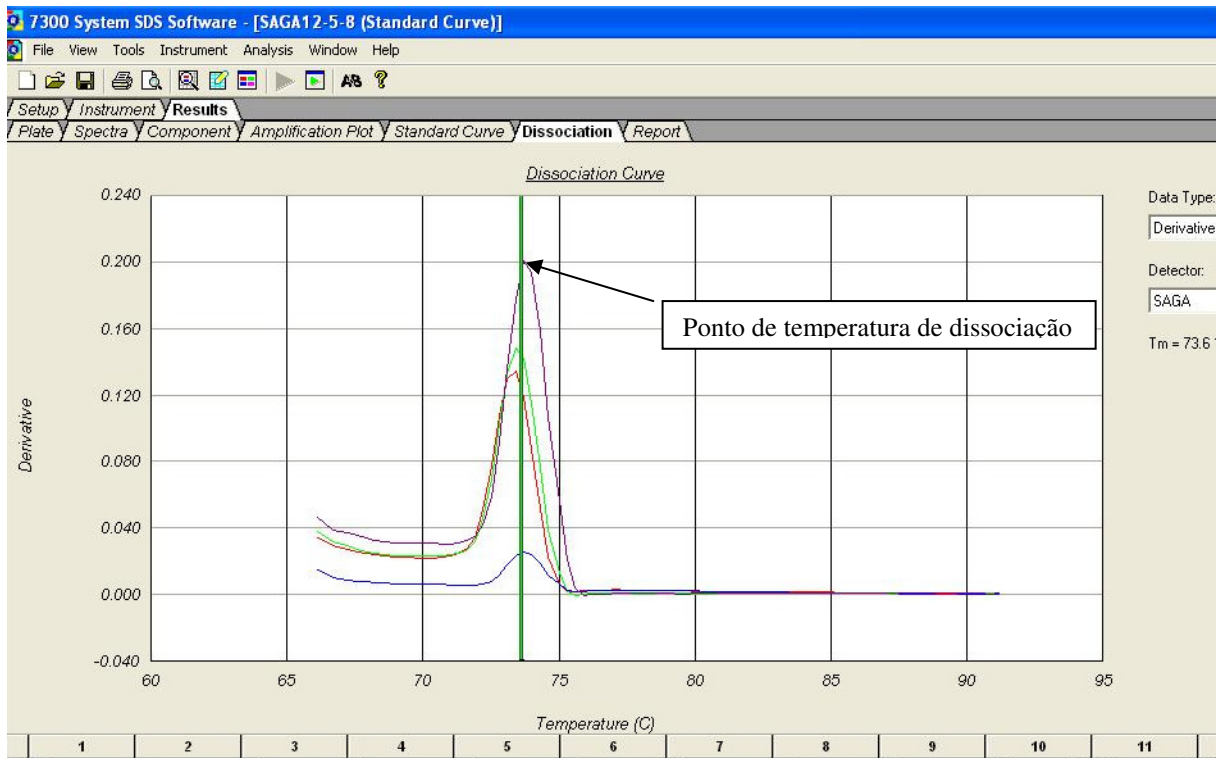


Figura 11-Curva Padrão para o *S.agalactiae* – Curva de Dissociação dos Positivos.

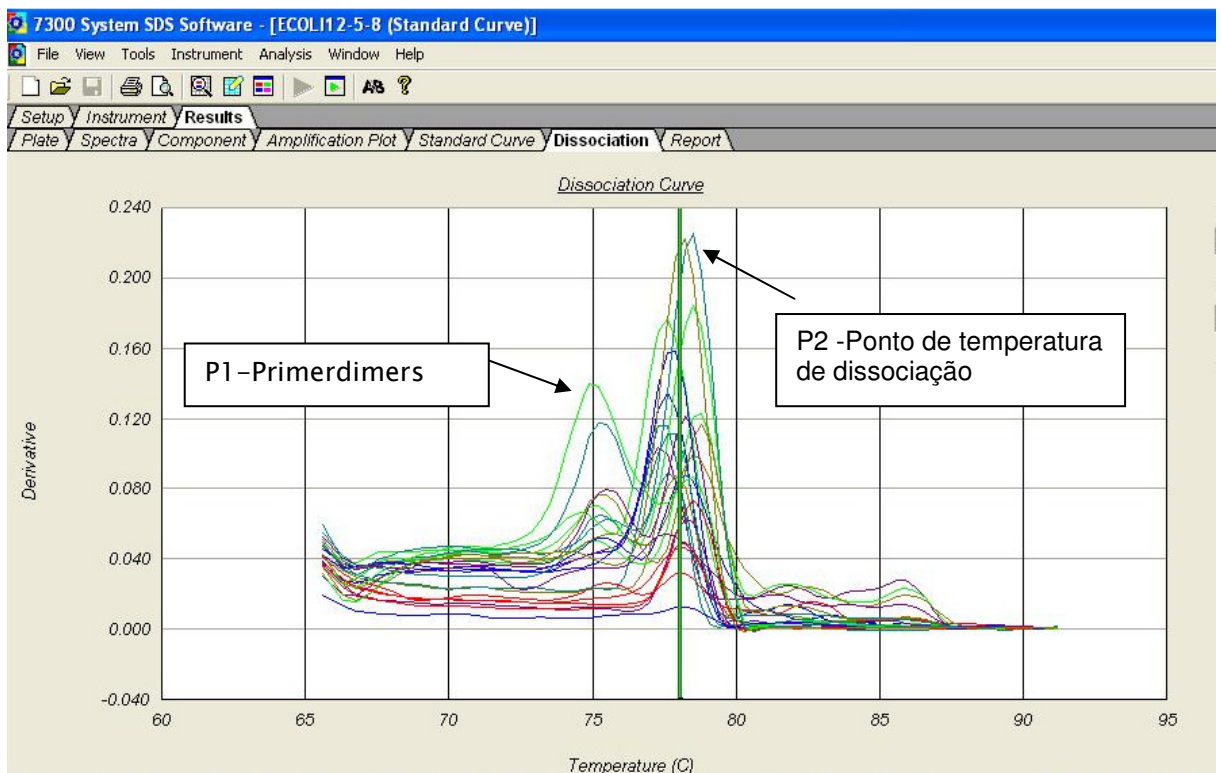


Figura 12-Curva Padrão da *E.coli* evidenciando 2 picos de temperatura de dissociação.

### Curva de calibração da ECO

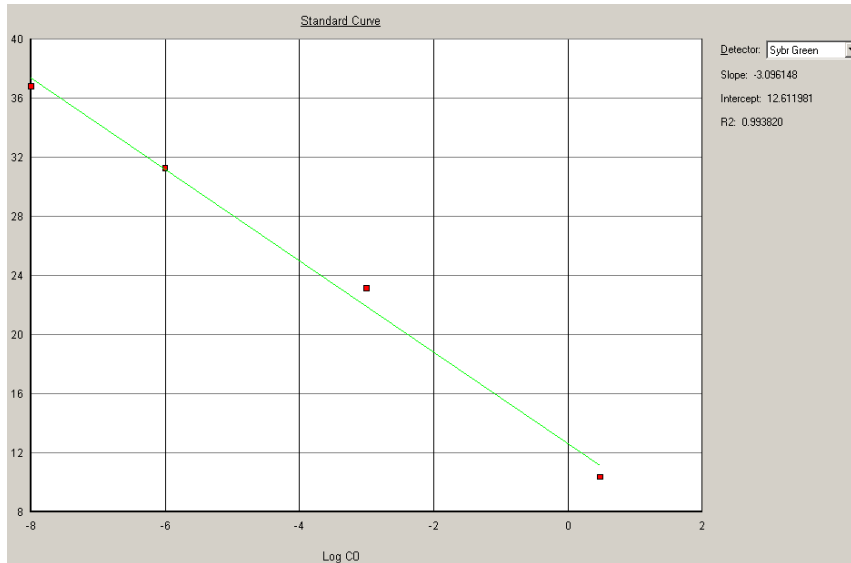


Figura 13-Curva de calibração da *E.coli* apresentando os quatro pontos de diluição. A curva apresentada de alta linearidade demonstrada pelo coeficiente de regressão linear elevado ( $r^2 = 0.9938$ ). O valor de slope da curva mostra uma eficiência de 100% da reação pela equação  $E = 10\{-1/\text{slope}\}$ . Essa eficiência permite a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na PCRrt.

### Curva de calibração do *S.pneumoniae*

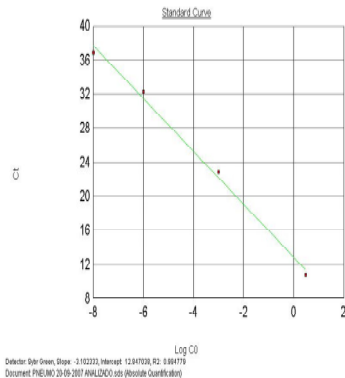


Figura 14-Curva de calibração do *S.pneumoniae* apresentando os quatro pontos de diluição. A curva apresentada de alta linearidade demonstrada pelo coeficiente de regressão linear elevado ( $r^2 = 0.995$ ). O valor de slope da curva mostra uma eficiência de 100% da reação pela equação  $E = 10\{-1/\text{slope}\}$ . Essa eficiência permite a quantificação absoluta das amostras pelo uso deste controle interno na PCRrt.

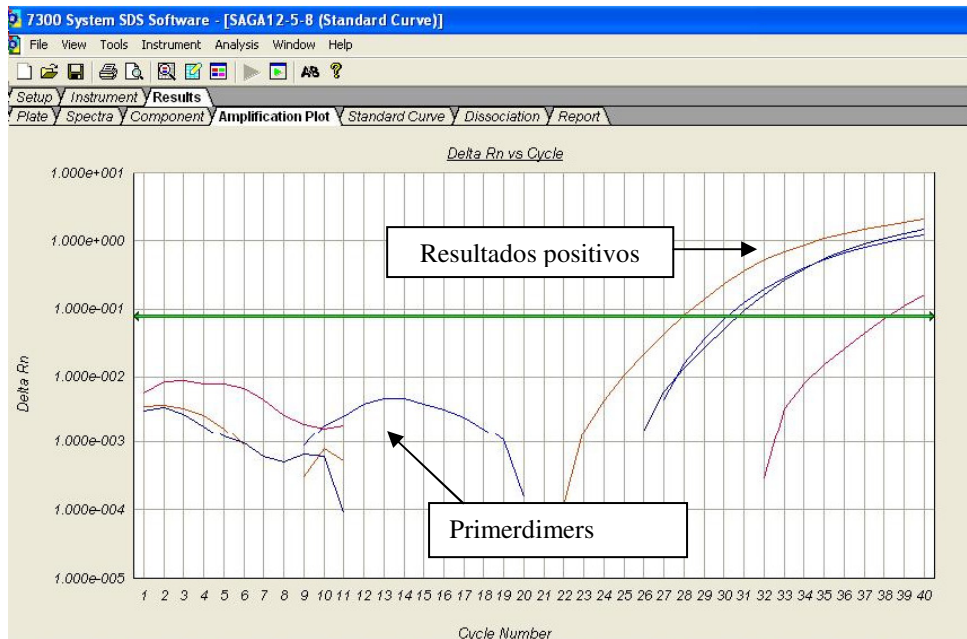


Figura 15-Curva Padrão dos Positivos para o *S.agalactiae* e primerdimers.

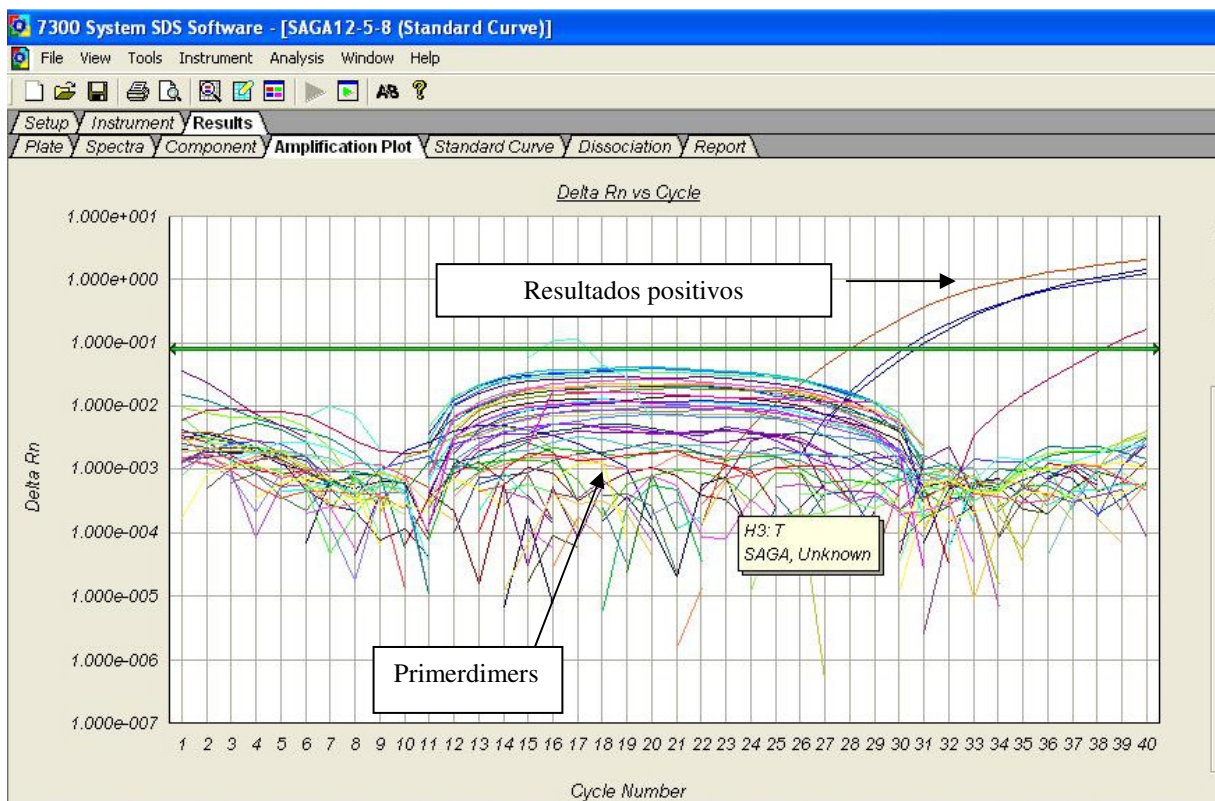


Figura 16-Todas as Curvas para o EGB. Pode-se observar os 4 resultados positivos e os primerdimers.

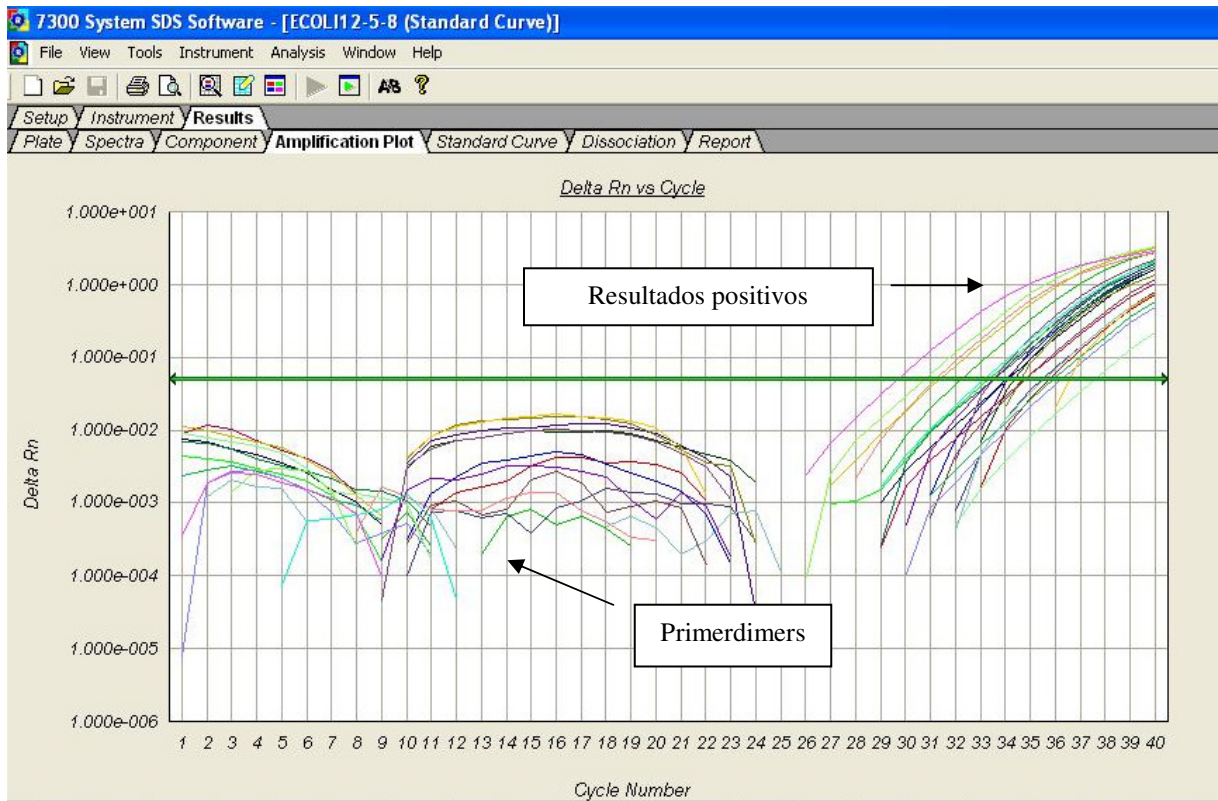


Figura 17-Curva dos positivos para a ECO e os primerdimers.

O protocolo do ciclo termal para a *Escherichia coli* está demonstrado na figura 18

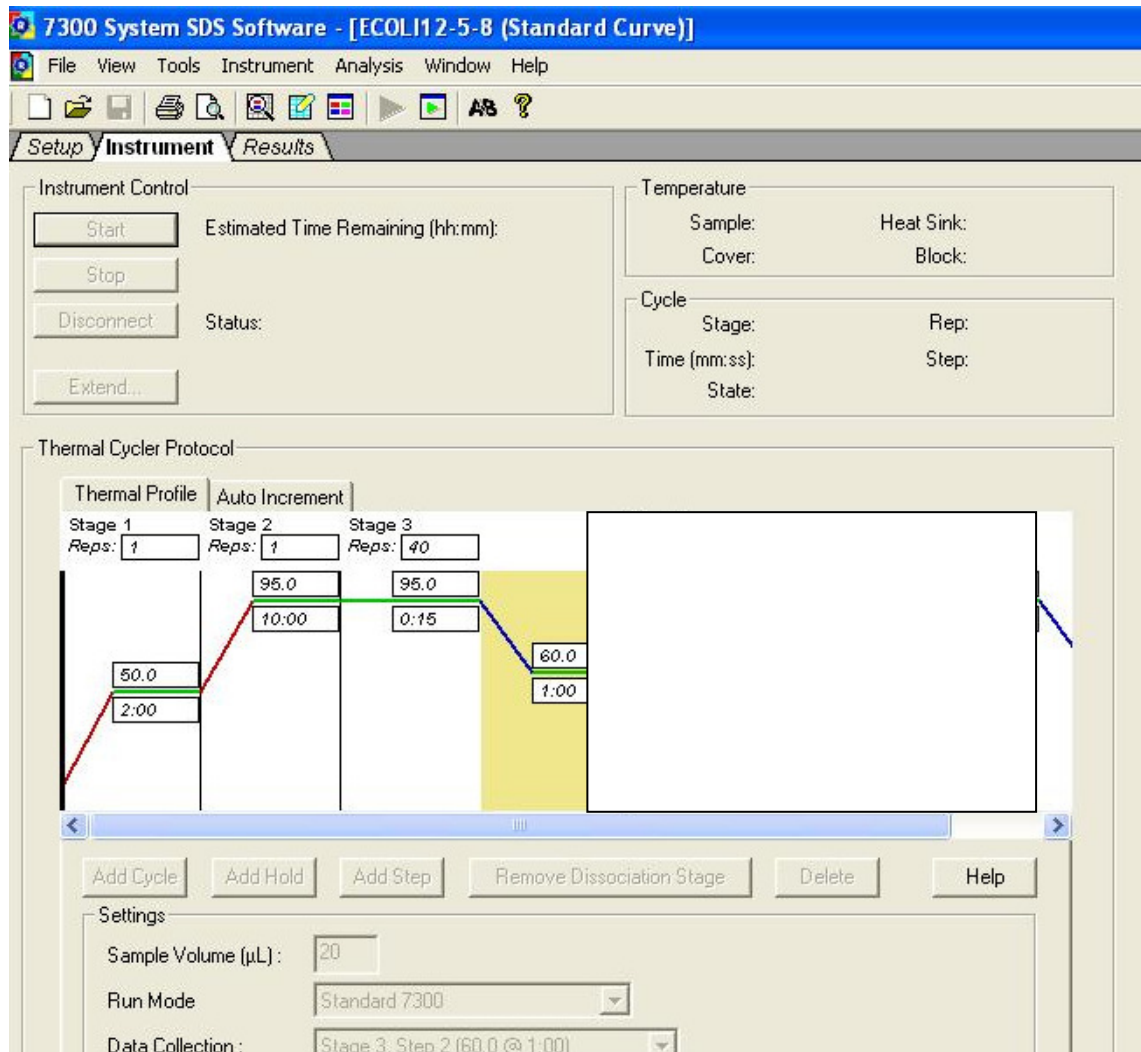


Figura 18-Ciclos da PCR – Protocolo do ciclo termal

Para o *Streptococcus agalactiae* o relato do experimento está exemplificado na figura 19

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm	User Defined #
A1	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					71.3 °C	
A2	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					70.1 °C	
A3	T	SAGA	Unknown	30.1488	10.4					73.4 °C	
A4	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					70.7 °C	
A5	G	SAGA	Unknown	Undet.	5.29					69.8 °C	
A6	G	SAGA	Unknown	30.6184	5.29					73.4 °C	
A7	S	SAGA	Unknown	Undet.						75.9 °C	
A8	S	SAGA	Unknown	Undet.						77.1 °C	
A9	S	SAGA	Unknown	Undet.						70.4 °C	
B1	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					71.9 °C	
B2	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					70.4 °C	
B3	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					74.0 °C	
B4	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					71.6 °C	
B5	G	SAGA	Unknown	Undet.	5.29					86.6 °C	
B6	G	SAGA	Unknown	Undet.	5.29					71.3 °C	
B7	S	SAGA	Unknown	Undet.						70.7 °C	
B8	S	SAGA	Unknown	Undet.						69.5 °C	
B9	S	SAGA	Unknown	Undet.						77.4 °C	
C1	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					75.3 °C	
C2	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					77.4 °C	
C3	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					77.1 °C	
C4	T	SAGA	Unknown	Undet.	10.4					70.7 °C	
C5	G	SAGA	Unknown	38.1764	5.29					73.7 °C	
C6	G	SAGA	Unknown	27.9793	5.29					73.7 °C	
C7	S	SAGA	Unknown	Undet.						69.5 °C	
C8	S	SAGA	Unknown	Undet.						70.4 °C	
C9	S	SAGA	Unknown	Undet.						69.5 °C	

Figura 19-Relato do experimento para o EGB

Para a *Escherichia coli* o relato do experimento está demonstrado na figura 20

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	
A1	T	ECO	Unknown	35.684	1.83					78
A2	T	ECO	Unknown	32.1847	1.83					77
A3	T	ECO	Unknown	33.979	1.83					77
A8	S	ECO	Unknown	34.2484	2.07					77
A9	S	ECO	Unknown	34.0658	2.07					77
B1	T	ECO	Unknown	34.757	1.83					77
B3	T	ECO	Unknown	35.4276	1.83					78
B8	S	ECO	Unknown	34.0436	2.07					78
B9	S	ECO	Unknown	33.446	2.07					78
C4	T	ECO	Unknown	35.9374	1.83					78
C5	G	ECO	Unknown	34.7491	2.61					77
C8	S	ECO	Unknown	33.4262	2.07					78
D1	T	ECO	Unknown	36.1991	1.83					78
D2	T	ECO	Unknown	31.1576	1.83					78
D3	T	ECO	Unknown	37.4858	1.83					78
D9	S	ECO	Unknown	33.2445	2.07					78
E2	T	ECO	Unknown	33.3993	1.83					75
E6	G	ECO	Unknown	34.4776	2.61					78
F1	T	ECO	Unknown	35.4747	1.83					78
F9	S	ECO	Unknown	31.3066	2.07					74
G1	T	ECO	Unknown	33.0934	1.83					77
G3	T	ECO	Unknown	36.3898	1.83					77
G6	G	ECO	Unknown	30.7205	2.61					78
H5	G	ECO	Unknown	29.6169	2.61					78

Figura 20-Exemplo de parte do relato do experimento programado para ECO

Entre os recém nascidos incluídos, encontramos 70 (86,42%) com idade gestacional menor que 34 semanas, 7 (8,64%) com idade gestacional maior ou igual a 34 semanas e 4 (4,93%) RN eram a termo, isto é 38 semanas ou mais.

Resultados após a PCRrt:

Entre as amostras que apresentaram amplicons de ECO, a idade gestacional média foi 31 semanas para as amostras de aspirado traqueal e 30 semanas para as amostras de aspirado gástrico e sangue. Para o EGB, nos materiais onde foram detectados os amplicons característicos, a média da idade gestacional foi de 32,5 semanas.

Nestas amostras, após PCRrt, foi encontrado amplicons de segmentos genéticos de *Escherichia coli* em 14 amostras de secreção traqueal, em 4 amostras de secreção gástrica e em 7 amostras de sangue periférico. Amplicons de segmentos genéticos de *Streptococcus agalactiae* foram encontrados em uma amostra de secreção traqueal, em três amostras de secreção gástrica e não foi encontrado nas amostras de sangue dos RN pesquisados.

Os espécimes trabalhados foram colocados na tabela 4, com o número de amostras colhidas, a quantidade de DNA genômico obtido em quantidade  $\geq 5$  ng/ $\mu$ l, considerada mínima para o experimento PCRrt e o número de agentes identificados pelas seqüências genômicas (amplicons) que os caracterizaram.

Na tabela 4 encontramos o total das amostras viáveis dos espécimes estudados e a freqüência com que os amplicons dos agentes alvos foram identificados após serem submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCRrt)

<b>Material</b>	<b>Amostras colhidas</b>	<b>Amostras com &gt;5ng/<math>\mu</math>l</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b><i>Streptococcus agalactiae</i></b>
<b>Aspirado traqueal</b>	<b>80</b>	<b>32(40%)</b>	<b>14(43,75%)</b>	<b>1(3,13%)</b>
<b>Aspirado gástrico</b>	<b>75</b>	<b>15(20%)</b>	<b>4(26,67%)</b>	<b>3(20%)</b>
<b>Sangue</b>	<b>45</b>	<b>22(49%)</b>	<b>7(31,82%)</b>	<b>0</b>

**Tabela 4-Número de amostras colhidas, amostras com quantidade de material genômico selecionado para PCRrt e o número de amplicons das seqüências genéticas que identificaram os agentes estudados.**



Na tabela 4 está descrito a frequência dos amplicons dos agentes alvos nos espécimes estudados.

	<b>Secreção traqueal (32)</b>	<b>Secreção gástrica (15)</b>	<b>Sangue periférico (22)</b>	<b>Total das amostras</b>
<b>S. agalactiae</b>	1 (3,13%)	3 (20%)	0	4 (5,8%)
<b>E. coli</b>	14 (43,75%)	4 (26,67%)	7 (31,82%)	25 (36,23%)
<b>Total (+)</b>	15 (46,88%)	7 (46,67%)	7 (31,82%)	29 (42%)

**Tabela 5-Total de amostras e a frequência com que os amplicons de seqüências genéticas de *S. agalactiae* e *E. coli* foram identificados na população com quantidade de material genético > 5 ng/ µl.**

As amostras de 10 a 56 (45 amostras) foram submetidas a PCRrt para a identificação de amplicons de *S.pneumoniae* e *E. coli*. Houve positividade para *Streptococcus pneumoniae* em 12 amostras (26,67%) e *Escherichia coli* em 6 amostras (13,33%).



Para o diagnóstico molecular de amplicons de *S. agalactiae*, *E. coli* e *S. pneumoniae* em espécimes biológicos de RN (aspirado traqueal, gástrico e sangue) com fatores de risco para infecção neonatal, utilizamos a PCRrt por ser um método rápido e específico. Para isto colhemos o material logo após o nascimento (até 2 horas) para evitar a contaminação ambiental ou do ventilador mecânico. Após a coleta do material, o DNA genômico foi extraído das amostras e quantificado por espectrofotometria. As amostras consideradas viáveis (aquelas com mais de 5 ng/μl) estão apresentadas na Tabela 2.

As amostras tiveram a sua viabilidade testada na PCR convencional com o primer da beta actina humana em 7 amostras aleatórias da população estudada, evidenciando a especificidade dos oligonucleotídeos. O amplicon da β-actina, foi obtido após eletroeluição do fragmento de PCR convencional e usado como normalizador, determinante da eficiência da reação de PCRtr e padrão para quantificação dos amplicons de EGB, *S. pneumoniae*, *E. coli*. O resultado da β-actina foi importante para mostrar a viabilidade das amostras de DNA a serem utilizadas posteriormente na PCRrt.

Os resultados das curvas de calibração e padrão, apresentadas nas figuras 10 e 12 neste trabalho, demonstraram uma boa qualidade de pipetagem, diluição e sensibilidade. Pode-se observar nessas figuras que os Cts (total de ciclos) foram coerentes mostrando uma relação logarítmica, com as diluições da curva padrão bem distinta. Este resultado é fundamental para quantificações absolutas da presença de EGB, *S. pneumoniae* e *E. coli* em amostras com concentrações raras como nos aspirados traqueal, gástrico e sangue. Além disso, estes dados demonstram que a expressão de cada amostra pode ser quantificável. Baseadas nas padronizações acima foram obtidos resultados positivos para as amostras. Os resultados das curvas padrão para β-actina padrão e de EGB (**Fig. 8 e 11**), *S. pneumoniae*, *E. coli* (**Fig. 10 e 12**) das amostras positivas apresentadas confirmaram a pureza, qualidade, tamanho e especificidade dos fragmentos amplificados pelo PCR em Tempo Real. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS* para todos os fragmentos.

Os resultados da (**Fig. 7**) da PCRrt mostram o diagnóstico de EGB no sangue periférico, em DNA genômico das amostras e alguns amplicons foram verificados através de gel de poliacrilamida no ponto final da reação (fase estacionária da curva). As quantidades detectadas de DNA de EGB, *S. pneumoniae*, *E. coli* por amostra de PCRtr variaram entre 5 até 2016 ng, com CTs entre 30 e 35.

Os resultados positivos obtidos pela PCRrt identificando *Streptococcus agalactiae* em 1 das 32 amostras (3,13%) de sangue, demonstram ser compatíveis com a literatura onde este método foi empregado. A PCR é um método rápido, específico e sensível o suficiente para detectar uma única cópia do genoma de EGB. Estes métodos podem ser úteis devido à alta sensibilidade e especificidade.

A PCR se tornou um dos métodos mais amplamente usados em diagnóstico molecular. No entanto pouco se tem feito na detecção de infecções neonatais. Ciclos termais rápidos para amplificação por PCR junto com monitoramento da fluorescência em tempo real fornecem uma nova ferramenta para a rápida detecção de microorganismos. Devido à amplificação e detecção ocorrerem ao mesmo tempo e não ser necessário a realização de gel de eletroforese, a PCRrt se torna um

método mais apropriado para ser usado na rotina clínica laboratorial que a PCR convencional e gel de agarose. (BERGERON et al., 2000; KE et al., 2000; RALLU et al., 2006). A PCR, tanto convencional quanto em tempo real, tem como principal benefício a rapidez no diagnóstico, com alto valor preditivo negativo e especificidade, possibilitando o uso racional de antibióticos e diminuição de custos nas Unidades de Cuidados Intensivos Neonatais (HABERLAND et al., 2002; YADAV, 2005; BROZANSKI et al., 2006).

Atualmente, o “padrão ouro” para a detecção de colonização vaginal de EGB é a cultura seletiva feita com 35-37 semanas de gestação, que é sensível o suficiente para detectar tanto leve como grande colonização por EGB, mas os resultados somente ficam disponíveis após no mínimo 48 horas. No entanto, este método não é eficaz para a identificação de EGB próximo ou no momento do parto. Ainda, cultura com 35-37 semanas não é sempre indicativo do *status* de colonização no nascimento, pois essa colonização é transitória (SCHRAG et al., 2002; RALLU, 2006). O método de Gram é de ajuda clínica limitada devido à baixa sensibilidade e especificidade. Ademais, uma importante limitação da detecção de EGB em cultura é a necessidade de organismos viáveis.

Aproximadamente 6 a 13% de recém-nascidos colonizados nascem de mães com cultura para EGB negativa (KE et al., 2000; BEITUNE et al., 2005). Outro fator que torna questionável o uso de cultura como “padrão ouro” para diagnóstico de sepse neonatal é que o recém-nascido está exposto a antibióticos dentro do útero, principalmente pela prática comum de usá-los intraparto em gestantes com fatores de risco, diminuindo consideravelmente sua sensibilidade (JORDAN; DURSO, 2000). É estimado que 20 a 40% dos recém-nascidos com sepse apresentam hemocultura negativa (BROZANSKI et al., 2006).

Das amostras positivas para as bactérias estudadas na PCRt, todas possuíam algum parâmetro ou fator de risco, sendo gestação gemelar (15 = 18,5%), Bolsa Rota por > 48 horas (28 = 34,6%), Infecção do Trato Urinário (34 = 42%), Parto Cesariana (50 = 61,70%), Gestação pré termo (77 = 95%), Gestação na adolescência (13 = 16%) principalmente nesta população. A identificação de uma população de alto risco para ser realizada a triagem para colonização por EGB é um desafio considerável. Isto porque a colonização é também observada em gestantes que não apresentam fatores de risco clássicos, representando 25 a 30% dos neonatos que desenvolvem sepse neonatal (SCHRAG, 2002).

Em hipótese de sepse neonatal, o uso de antibióticos no trabalho de parto é a intervenção profilática recomendada, porém existem divergências quanto à estratégia mais adequada para selecionar as gestantes que devem receber esta profilaxia (CDC, 1996). Após uma revisão feita em 2002 pelo CDC, foi dada prioridade para a estratégia de cultura para EGB em mulheres com 35-37 semanas de gestação (SCHRAG et al, 2002). No Brasil não há consenso ou recomendação técnica sobre o tema. No projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira, sugere-se a realização de cultura no terceiro trimestre se houver fatores de risco (AMB, 2003).

A relação entre fatores de risco e presença de EGB encontrada em nosso estudo sugere que o uso de antibióticos exclusivamente baseados em fatores de risco pode não ser a melhor opção. Este critério leva à desnecessária administração de antibióticos em 5 a 10% das parturientes, já que aproximadamente 3% da população possuem algum desses fatores (BEITUNE et al, 2005).

Schrag et al (2002) calcularam que a incidência da sepse é 5,1 / 1000 partos quando a cultura é positiva, sem os fatores de risco e 0,9 / 1000 quando um dos fatores de risco está presente e a cultura pré-natal é negativa, reforçando a idéia da maior efetividade de uma estratégia baseada em triagem pré-natal.

Embora a PCRrt seja um método insipiente no Brasil, permite realizar o estudo em 96 amostras ao mesmo tempo. Com seu programa de ciclos, temperaturas mais elevadas do que a PCR convencional, faz a PCRrt mais específica, além de promover a quantificação bacteriana absoluta.

Os resultados foram positivos, em maior quantidade e nos três espécimes, para a *E. coli*. Porém, apesar das vantagens da PCRrt, obtivemos a identificação dos agentes em quantidade semelhantes ao da literatura, quando comparado com o encontrado por Ben Hamida et al. (2008) e Lopez Sastre et al. (2000) que encontraram *E. coli* como o principal agente das infecções comprovadas em recém-nascidos prematuros. A amostra do presente estudo teve idade gestacional média de 32 semanas. Para a identificação de sequencia gênica da *E. coli*, a idade gestacional média foi 31 semanas e para o *S. agalactiae* foi 32,5 semanas. A seqüência gênica da *E. coli* foi encontrada em 43,75% das amostras de aspirado traqueal estudadas por PCRrt, em 26,67% das amostras de aspirado gástrico e 36,23% das amostras de sangue. Para o *S. agalactiae* (EGB) foi encontrado apenas no aspirado traqueal em 3,13% das amostras, em 20% das amostras de secreção gástrica e não foi encontrado no sangue. Diferentemente de nossos resultados neste estudo, AMBE J.P, GASI I.S, MAVA Y.(2007) revendo os casos de infecção no hospital escola de Maiduguri, no período de 1995 a 1999, encontraram 1304 RN admitidos no período, 813 (62,3%) tinham fatores de risco para infecção neonatal. O *Staphylococcus aureus* (46.2%) foi o principal organismo isolado nas hemoculturas, seguido por *Klebsiella spp* (24.8%). *S. pneumoniae* e *Pseudomonas* foram os menos encontrados.

A ECO apareceu na mesma proporção que aparece na literatura BEN HAMIDA et al. (2008). O EGB apareceu apenas em dois espécimes estudados, não aparecendo nas amostras de sangue. Podemos então, questionar o método utilizado na extração do DNA genômico.

O *Streptococcus pneumoniae* (SP) é citado como raramente responsável pela sepse neonatal, juntamente com a infecção materna. Tem características clínicas similares aos de outras infecções neonatais, mas resultado é particularmente grave (mortalidade: 50%, sequelas neurológicas: 13%). Os recém-nascidos são mais frequentemente infectados da vagina materna que foi colonizado por *S. pneumoniae*, embora seja rara a colonização vaginal por SP. Essa raridade na colonização, juntamente com a dificuldade no isolamento de SP a partir de esfregaços vaginais, faz a busca sistemática a este organismo muito difícil. No entanto, dado a elevada taxa de infecção / colonização, deve ser dada maior importância à descoberta da colonização vaginal com pneumococo na gravidez ou no recém-nascido, a fim de melhorar o tratamento e os resultados obtidos (NADER, et al., 2005). No presente estudo o *S. pneumoniae* foi identificado em 12 (26,67%) das 45 amostras. Em trabalho publicado, BIZZARRO (2005) observou que a percentagem global de sepse causada por *estreptococo do grupo B* e *E. coli* diminuiu. O número de episódios de sepse de *S. pneumoniae* ou *S. pyogenes*, comuns nos primeiros anos do estudo, foram mantidas. A sepse relacionada com a taxa de mortalidade diminuiu acentuadamente, de 87% em 1928 para 3% em 2003. Em nosso meio, a

taxa de sepse continua alta, elevando a taxa de prematuridade extrema em nossas UTIs neonatais com grande número de seqüelas, neurológicas e pulmonares.

Este estudo pode como contribuição, direcionar um estudo epidemiológico, já que temos uma metodologia previamente definida, usando uma técnica ainda pouco utilizada em nosso meio. É um método rápido, específico e muito sensível aos agentes para os quais foi desenhada, desde que se tenha material genômico para a identificação.

Há poucos trabalhos na literatura pesquisada fazendo uso da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, na busca de amplicons de agentes bacterianos nos materiais aspirados gástrico e traqueal de recém nascidos.

Foi verificado que o material com maior viabilidade é o sangue. Isto porque das 45 amostras colhidas, 22 (49%) possuíam material genético para a PCRrt, enquanto o aspirado gástrico teve material genético para a PCRtr em 15 das 75 (20%) amostras colhidas e o aspirado traqueal em 32 das 80(40%) amostras colhidas.

A PCRrt, este é um bom exame para avaliações de grandes populações, pois confirma especificamente o agente para o qual foi desenhado.

Os hospitais deveriam ter Laboratório de Biologia Molecular para o desenvolvimento de técnicas que propiciem o diagnóstico precoce e preciso de agentes infecciosos.



Foi possível avaliar a viabilidade da extração de DNA genômico de sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos que foram intubados logo após o nascimento e, assim, realizar o diagnóstico molecular precoce de microorganismos alvos, por PCR de alta sensibilidade em tempo real.

Para isto, foi avaliada a viabilidade dos espécimes biológicos (sangue e aspirado traqueal e gástrico) para a presença de DNA genômico, que permitiram o diagnóstico molecular dos agentes alvos.

Foi desenhado oligonucleotídeos iniciadores para PCR em tempo real, a partir de seqüências genômicas dos microorganismos definidos como alvos na sepse neonatal.

Após a aplicação da técnica de PCR em tempo real foram identificados os microorganismos alvos, nos espécimes estudados.

A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, ainda incipiente no Brasil, permitiu identificar o material genético dos agentes nos materiais estudados de maneira rápida, possibilitando a utilização em estudos epidemiológicos com casuísticas maiores.

Os primers desenhados foram adequados e o estudo foi possível naquelas amostras com DNA genômico em quantidade acima de 5 ng/ $\mu$ l.

Embora em todos os espécimes pesquisados a quantidade de DNA genômico tenha sido muito pequena, o mais viável foi o sangue pela maior quantidade de DNA genômico encontrado, mas o aspirado traqueal e gástrico também pode ser utilizado.



**8. REFERÊNCIAS**

AMBE J.P.; GASI, I.S.; MAVA, Y. Review of neonatal infections in University of Maiduguri Teaching Hospital: common bacterial pathogens visto. **Nigerian Journal of Clinical Practice**. v.10, n.4, p 290-3, dec.2007.

ANDERSON-BERRY,A.L.; BELLIG, L.L. Neonatal Sepsis. Emedicine. Nov. 2008. Disponível em:<<http://www.emedicine.com/ped/TOPIC2630.HTM> > acesso em 14 mar.2009.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA. **Projeto diretrizes**. Assistência pré-natal. São Paulo, 2003. Disponível em <[www.amb.org.br](http://www.amb.org.br)> acesso 13 mar.2009.

BARRINGTON, K. J. Group B streptococcal infection risk factors,– letters – correspondance. **Canadian Medical Association Journal**, v. 167, n. 6, p. 625, sep. 2002.

BEITUNE, P. E.; DUARTE, G.; MAFFEI, C. M. L. Colonization by *Streptococcus agalactiae* during pregnancy: maternal and perinatal prognosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 276-282, 2005.

BEN HAMIDA, N. E. et al. Early-onset neonatal bacterial infections: a retrospective series of 144 case. **Tunis Med**. V.86, n.2, p. 136-9, feb. 2008.

BERALDO, C. et al. Prevalência da colonização vaginal e anorretal por Estreptococo do grupo B em gestantes do terceiro trimestre. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 7, p. 543-549, 2004.

BERGERON, M. G. et al. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 3, p. 175-179, 2000.

BIER, O. Bactérias intestinais. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia e Imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1985. cap. 32, p. 615-621.

BIZARRO, M. J.et al. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. **Pediatrics**, v. 116, n. 3, p. 595-602, 2005.

BORGER, I. L. et al. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**.v. 27, n.10, p. 575-579, 2005.

BROZANSKI, B. S.et al. Use of polymerase chain reaction as a dignostic tool for neonatal sepsis can result in a decrease in use of antibiotics and total neonatal intensive care unit length of stay. **Journal of Perinatology**, v. 26, n. 11, p. 688-692, 2006.

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trends in Perinatal Group B Streptococcal Disease – United States, 2000-2006

Disponível em:<<http://www.cdc.gov/media/mmwrnews/2009/n090212.htm#2>> acesso em 10 mar.2009

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: morbidity and mortality weekly report. 1996

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: morbidity and mortality weekly report. Revised Guidelines from CDC - Recommendations and Reports, v. 51, (RR-11), ago, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Early-onset and late-onset neonatal group B streptococcal disease: United States, 1996-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep.v. 54, p.1205-1208, 2005

CHIOU, J. Molecular cloning of the Streptococcus agalactiae gene encoding peptide-chain release factor. **J. Subm.: Nat. Taiwan Univ.**, Jen-Ai Rd. section 1, n.1, Taipei, Taiwan 10018, Republic of China, 30 jan. 2001.

ELVEDI-GASPAROVIĆ, V.; PETER, B. Maternal group B streptococcus infection, neonatal outcome and the role of preventive strategies. **Collegium Antropologicum**. V.32, n.1, p.147-151, mar.2008 .

FREDDI, A. N. Septicemia e Meningite do RN. In: SEGRE, C. M.; ARMELLINI, P. A. **RN**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1985. p. 286-9.

FRY, R. M., ENG, M. R. C. S. Fatal infections by haemolytic streptococcus group B. **Lancet**, London, n. 5.966, p. 199-201, jan. 1938.

GOLDEMBERG, R. L.; CULHANE, J. F. La infección como causa de parto pretérmino. **Clinics in Perinatology**. 2003(4): 667-90

GOMEZ, M. et al. Neonatal Streptococcus pneumoniae infection: case reports and review of the literature. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v.18, n.11, p.1014-1018, nov.1999.

GRIMBERG J.et al. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Research*.v. 17, n. 20, p. 83-90, 1989.

HABERLAND, C. A.et al. Perinatal screening for group B streptococci: cost-benefit analysis of rapid polymerase chain reaction. **Pediatrics**, v. 110, n. 3, p. 471-480, 2002.

HOFFMAN, J.A. et al., *Streptococcus pneumoniae* Infections in the Neonate **Pediatrics**. v.112, n.5, p.1095-1102, **nov.** 2003.

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

HYDE, T.B. et al. Trends in the incidence and antimicrobial resistance of early onset sepsis: population-based surveillance in San Francisco and Atlanta. **Pediatrics**.; n.110, p.690-695, 2002.

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

JACONIAS, L.V.; PICOLI, S.U. Avaliação de infecção urinária em gestantes no primeiro trimestre de gravidez. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 39, n.1, p. 55-57, 2007.

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

KE, D. et al. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. Molecular Diagnosis and Clinical Chemistry, in **Clinical Chemistry** v. 46, n. 3, p. 324-331, 2000.

KHALIFA, K.; AGARWAL, M. Neonatal Streptococcus Pneumoniae Sepsis: rare but fatal . **The Internet Journal of Pediatrics and Neonatology**. v. 5, n.2, 2005

LAJOS PINTO, G. J. Colonização endocervical em gestantes com trabalho de parto prematuro e/ou ruptura prematura de membranas.fev.2009. Disponível em:<  
<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000366509>> acesso em 20 mar.2009.

LOPEZ SASTRE, J.; COTO COTALLO, G.; FERNANDEZ COLOMER, B. Neonatal sepsis of vertical Transmission: an epidemiological study from the "Grupo de Hospitales Castrillo." **Journal of Perinatal Medicine**. v 28, n.4, p.303-315, 2000.

MCMILLAN, J. A. Editorial. **Contemporary Pediatrics**, England, set. 2003.

MEREMIKWU, M. M. et al. Bacterial isolates from blood cultures of children with suspected septicaemia in Calabar, Nigeria. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n.1, p. 110-114, 2005.

Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde de 2006 -(PNDS-2006). DEMOGRAFIA E SAÚDE, publicado em 4/7/2008, Disponível <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pndscentrooeste.pdf>.> jan.2009

MIURA, E.; MARTIN, M. C. Group B Streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 5, p. 243-246, 2001.

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

MUSSI-PINHATA, M. M. et al. Infecções congênitas e perinatais. **Jornal de Pediatria**, v. 75, Suplemento, p. 15-30, jul./ago. 1999.

NADER, R. et al. Streptococcus pneumoniae neonatal infection. **Annales de Biologie Clinique (Paris)**. v.63, n.6, p. 643-646.nov/dez. 2005.

PEREIRA, A. et al. Risco Infecçioso e Rastreamento Séptico. Disponível em:

<[www.spp.pt/UserFiles/File/Consensos\\_Nacionais\\_Neonatologia\\_2004/Risco\\_Infecçioso\\_Rastreamento\\_Septico.pdf](http://www.spp.pt/UserFiles/File/Consensos_Nacionais_Neonatologia_2004/Risco_Infecçioso_Rastreamento_Septico.pdf)> acesso em 10 mar, 2009.

PFAFFL, M.W., Livestock Transcriptomics: Quantitative mRNA Analytics in Molecular Endocrinology and Physiology. Weihenstephan, 2003. 42f. Habilitation - Faculty Center of Life and Food Sciences, Technische Universität München.

POGERE, A. et al. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas em ambulatório pré-natal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 4, p. 174-180, 2005.

PUOPOLO, K. M. Epidemiology of Neonatal Early-onset Sepsis. NeoReviews **American Academy of Pediatrics**. v.9, n.12, p.571, 2008.

RALLU, F. et al. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B *Streptococcus* carriage in pregnant women. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 3, p.725-728, 2006.

RODRÍGUEX-WEBER, M. A. et al. Morbilidad y mortalidad por sepsis neonatal en un hospital de tercer nivel de atención. **Salud Publica de Mexico**. v. 45, n. 2, p. 90-95, 2003.

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

- SAIKI, R.K. et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**. v. 239, n 4839, p. 487-491, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, D. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- SANTOS, V. P. Estreptococcias. In: FARHAT, C. K. et al. (Eds). **Infectologia pediátrica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 242-253, 1999.
- SCHRAG, S. J.; WHITNEY, C. G.; SCHUCHAT, A. Neonatal group B Streptococcal disease: how infection control teams can contribute to prevention efforts. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 21, n. 7, p. 473-483, 2000.
- SCHRAG, S. Prevention of neonatal sepsis. **Clinical of Perinatology**. v. 32, n.3, p. 601-615, set. 2005.
- SCHRAG, S. et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. **Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and reports**. v. 51, n. RR-11, p. 1-22, 2002.
- SCHUCHAT, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p.497-513, 1998.
- SPECK, W. T.; ARONOFF, S. C.; FANAROFF, A. A. Infecções neonatais. In: FANAROFF, A. A. **Alto risco em neonatologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 12, p. 240-259, 1990.
- STOLL, B.J. et al. Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis. **Journal of Pediatric Infectious Diseases**. v.24, n.7, p.635-639, 2005.
- STOLL. B.J. et al. Changes in pathogens causing early onset sepsis in very-low-birthweight infants. **New England Journal of Medicine**. v.4, n.347, p.240-247, 2002.
- STROBEL M. et al. Pneumococcus: an unusual agent of maternal-fetal infection. **Presse Med**. v.28, n.38, p.2100-2102, dez.1999.
- TCHARNIAKOVSKY, I. Estreptococcias. In: VERONESI, R. (Eds). **Doenças infecciosas e parasitárias**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. p. 254-259.
- TOWERS, C.; BRIGGS, G. Antepartum use of antibiotics and early-onset neonatal sepsis: the next 4 years. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v.187, n.2, p. 495-500, 2002.

WALKER, T.; ESTRADA, B. Antibiotic prophylaxis for neonatal group B streptococcal disease. **Infections in Medicine**. v. 18, n. 9, p. 419-427, 2001. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/419190>>. Acesso em: 22 mar. 2003.

WESTH, H.; SKIBSTED, L.,; KORNER, B. Streptococcus pneumoniae infections of the female genital tract and in the newborn child. **Reviews Infectious Diseases**. V.12, n.3, p.416-422, mai/jun.1990

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







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



|

## *Carta de Aprovação*

*A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 488 da Pesquisadora Anna Maria Duarte Miglioli “Determinação da prevalência de Streptococos do Grupo B, em recém-nascidos com pneumonia e em ventilação mecânica, através da reação em cadeia da Polimerase”, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 29 de março de 2005, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*

*Prof. Odair Pimentel Martins*

*Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

*Campo Grande, 29 de março de 2005.*

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

**Anexo 2-TERMO DE CONSENTIMENTO, LIVRE E ESCLARECIDO.**

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa médico-científico.

Você decidirá se quer participar ou não.

Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo, qualquer dúvida que você tiver.

Este estudo está sendo realizada pela Médica Pediatra Anna Maria Duarte Miglioli do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

A finalidade deste estudo é verificar a ocorrência da pneumonia neonatal causada por uma bactéria comum no nosso meio (Estreptococos do Grupo B). Esta bactéria, quando acomete o recém-nascido, causa infecção grave levando a grande maioria à morte.

Um outro propósito, é conseguir fazer o diagnóstico desta infecção no recém-nascido de uma maneira mais rápida, permitindo assim, iniciar prontamente o tratamento específico, aumentando a chance de cura do bebê.

Poderão participar deste estudo todos os recém-nascidos que apresentarem sinais de pneumonia no período neonatal e que evoluírem para ventilação mecânica.

Você poderá participar voluntariamente, respondendo alguns dados sobre a sua gravidez e assinando o termo de consentimento. O material que será utilizado na pesquisa é normalmente descartado.

Isto permitirá pesquisarmos a infecção do seu bebê. Você estará colaborando para conhecermos a frequência destas infecções e como diagnosticá-las e tratá-las rapidamente.

Outras pessoas estarão participando desta pesquisa, que será realizada nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatais do Hospital Universitário e da Santa Casa.

Caso concorde em participar, o seu nome e o de seu bebê serão mantidos em absoluto sigilo.

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

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

**Anexo 3-TERMO DE CONSENTIMENTO, LIVRE E ESCLARECIDO.**

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ SSP/\_\_\_ responsável pelo (a) paciente \_\_\_\_\_, com registro nº \_\_\_\_\_, no Hospital \_\_\_\_\_, voluntariamente dou o meu consentimento para a participação no estudo: **“DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B, EM RECÉM-NASCIDOS COM PNEUMONIA MANTIDOS EM VENTILAÇÃO MECÂNICA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE”**.

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

Estou ciente de que poderei deixar de participar do estudo sem que com isto tenha o meu tratamento médico prejudicado.

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

Se tiver dúvidas a respeito deste estudo poderei ligar para a Médica Pediatra Anna Maria Duarte Miglioli, no telefone (067) 9984 8007.

Para perguntas sobre meus direitos como participante deste estudo, chamarei o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67) 345 2299.

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

Campo Grande (MS), \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

---

Assinatura do responsável legal

**Anexo 4-PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE INFEÇÃO NEONATAL**

HOSPITAL: \_\_\_\_\_ PRONTUÁRIO N° \_\_\_\_\_

IDENTIFICAÇÃO DA MÃE \_\_\_\_\_ IDADE DA MÃE: \_\_\_\_\_

**1. ANTECEDENTES MATERNNOS**

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

Gesta \_\_\_\_\_ Para \_\_\_\_\_ Abortos \_\_\_\_\_ Natimortos \_\_\_\_\_

Prematuros \_\_\_\_\_ Filhos Vivos \_\_\_\_\_ Filhos Mortos \_\_\_\_\_

Teve problemas de saúde durante as gestações? \_\_\_\_\_

Tomou medicamentos? \_\_\_\_\_

Quais? \_\_\_\_\_

**2. GESTAÇÃO ATUAL**

DUM \_\_\_\_\_ Duração da Gestação \_\_\_\_\_ semanas.

Apresentou algum problema de saúde ? \_\_\_\_\_

Teve febre? \_\_\_\_\_

Tomou algum medicamento? \_\_\_\_\_

Quais? \_\_\_\_\_

Ruptura da Bolsa \_\_\_\_\_ Sofrimento Fetal \_\_\_\_\_

Data do Nascimento \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Hora \_\_\_\_ : \_\_\_\_ Minutos

Parto \_\_\_\_\_ Apresentação \_\_\_\_\_

Bolsa rota \_\_\_\_\_ horas do parto

Líquido Amniótico: Claro \_\_\_\_\_ Esverdeado \_\_\_\_\_ Fino \_\_\_\_\_ Espesso \_\_\_\_\_

Grumos \_\_\_\_\_ Odor (Fétido/ característico) \_\_\_\_\_

Condições ao nascer \_\_\_\_\_

Índice de APGAR 1º minuto \_\_\_\_\_ 5º minuto \_\_\_\_\_

Aspiração (tipo resultado) \_\_\_\_\_

Antes do 1º movimento respiratório? \_\_\_\_\_

Reanimação? \_\_\_\_\_

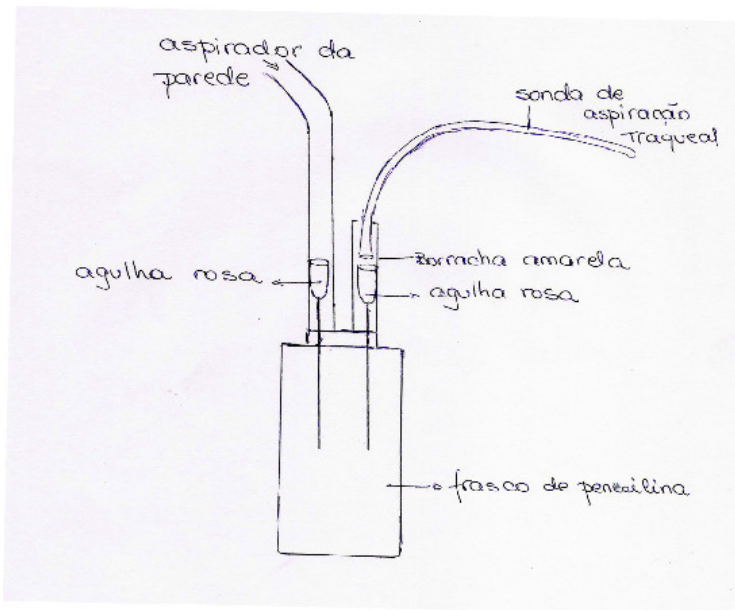
Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Pediatra Assistente (Neonatologista)

### Anexo 5-Esquema do frasco usado para a coleta do aspirado traqueal



#### Material Utilizado

- Borracha de Aspirador
- Sonda de aspiração traqueal nº 4 ou 6
- Agulha 40X 12 (Rosa)
- Frasco de Penicilina, reutilizado.

Depois de montado, o material foi esterilizado por Oxido de Etileno.

### Anexo 6-Frasco usado para a coleta do aspirado traqueal



## Anexo 7-EXTRAÇÃO DE DNA

### A – EXTRAÇÃO DE DNA NO SANGUE:

#### A - 1 DESCRIÇÃO:

Este método é um dos muitos protocolos avaliados para a extração de DNA.

Este procedimento é uma modificação de um método publicado (1), no qual inclui a adição de 0,5% para o Tampão de Digestão de Proteína. É um procedimento simples, rápido e eficiente para a extração de DNA genômico de amostras de sangue ou swab bucal, o qual elimina a necessidade de qualquer reagente orgânico. Ele envolve lise celular, seguida pela digestão de Proteinase K a 55°C. O rendimento de DNA é cerca de 5 a 15µg por 0,3 ml de sangue e aproximadamente 2 µg por swab bucal, com uma média de tamanho de fragmento de 300kb. O DNA extraído pelo processo é prontamente digerido com uma variedade de enzimas de restrição.

**Para proteger as amostras de contaminação, luvas limpas devem ser usadas todo o tempo durante o processo de extração.**

Tempo requerido: Cerca de 4 horas

#### A – 2 REAGENTES, EQUIPAMENTOS E ESTOQUE:

##### REAGENTES

##### ⇒ Tampão de lise celular

320 mM de sacarose

10 mM de Tris-HCL, pH7, cinco (Cat No. 15567-027- 1M Tris-HCl, pH 7,5 (1L)).

5 mM deMgCl<sub>2</sub>

1% (v/v) TritonX-100

Instrução: Estocar e usar a 4°C

##### ⇒ Tampão para digestão de proteínas w/SDS

10 mM de Tris-HCl, pH 7,5 (Cat. No. 15567-027- 1M Tris-HCl, pH 7,5 (1L)).

10 mM de EDTA (Cat.No.15575-020- 0,5 M EDTA, pH 8.0 (4 x 100ml)).

10 mM de NaCl (Cat. No. 24740-011-5M NaCl (10L)).

0,5 SDS (Cat. No. 24730-020- 10% SDS (1L)).

Instrução: Estocar a temperatura ambiente.

##### ⇒ Proteinase K (20 mg/ml)

Cat. No. 25530-49 (5ml)

Instrução: Estocar a -20° C. Descongelar imediatamente antes de usar, e guardar em gelo seco.

##### ⇒ Tampão TE-4

10 mM de Tris-HCl, Ph 7,5 (Cat. No. 15567-027 – 1M Tris-Hcl, pH 7,5 (1L)).

0,1 mM de EDTA (Cat. No. 15575-020 – 0,5 M EDTA, pH 8,0 (4 x 100 ml)).

Instrução: Estocar a temperatura ambiente.

##### ⇒ Etanol 100%

Instrução: Estocar a temperatura ambiente.

##### ⇒ Etanol 70%

Instrução: Estocar a temperatura ambiente.

## EQUIPAMENTOS

- ⇒ **Microcentrífuga:**  
Rotador designado para tubos de 1,5 a 2,0 ml. Capaz de obter velocidade de no mínimo 13.000 rpm.
- ⇒ **Banho Maria de 55°C.**
- ⇒ **Pipetas.**  
De 3 volumes diferentes: 1-20ul, 20-200ul e 200-1000ul.
- ⇒ **Sistema de concentração de DNA.**
- ⇒ **Agitador.**
- ⇒ **Caixa de isopor.**

## ESTOQUE DISPONÍVEL

- ⇒ **Tubos para microcentrífuga** (1,7-2,0 ml de capacidade, em 4 cores): (vermelho, amarelo, azul e verde).
- ⇒ **Ponteiras para pipetas esterilizadas** (3 tamanhos: 1-20ul, 20-200ul e 200-1000ul).
- ⇒ **Etiquetas ou caneta para retroprojektor:** (tamanho apropriado para tubos de microcentrífuga).

## A-3 PROCEDIMENTO

### ADIANTANDO

Use os códigos de cor para os tubos de microcentrífuga como designado abaixo. Os códigos de cor permitem facilidade no manejo das amostras.

Mãe -----Tubos vermelhos  
 Filho(s)-----Tubos amarelos  
 Pai alegado-----Tubos azuis

**Etiquete todos os tubos cuidadosamente.**

## PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO DNA:

### PRECAUÇÕES

Todas as amostras de sangue devem ser tratadas como potencialmente infecciosas, manuseadas na Capela de Fluxo Laminar.

### PROCEDIMENTOS

1. Misture completamente cada amostra sanguínea antes, para ressuspender as células.
2. Remova uma alíquota de 0,3 ml (300ug) de sangue e guarde dentro de um tubo apropriado.
3. Acrescente 1ml (1000ug) em cada amostra de Tampão para Lise Celular (4°C) para iniciar a lise celular.
4. Agite os tubos por 10 a 15 segundos para ressuspender as células e completar a lise celular.
5. Centrifugue os tubos por 5 minutos a 4.000 rpm em uma microcentrífuga para precipitar leucócitos.
6. Cuidadosamente vire o fluido sobrenadante em um desprezador biológico em um único movimento. Vire os tubos com o fluido residual (borrão) em um papel ou tecido absorvente, depois descarte apropriadamente (o papel ou o tecido absorvente).
7. Repita os passos 3 a 6.
8. Preparar o MASTER MIX contendo Tampão de digestão de proteína w/SDS e proteinase K (20 mg/ml). Determine o número de amostras (N) total a serem processadas. Para ter certeza de um volume adequado, o MASTER MIX é avaliado por uso, um volume maior deve ser preparado. Para garantir isso, acrescente um volume para duas amostras extras, exemplo (N + 2). O volume do tampão para proteínas w/SDS é determinado pela multiplicação do número de amostras (N + 2) por 395 (395ug por amostra). O total do volume de proteinase K (20ug/ml) requerido é determinado pela multiplicação do número das amostras (N + 2) por 5 (5ug por amostra) Agite o Máster Mix.

### MASTER MIX VOLUME

Tampão para digestão de proteína w/SDS	(N + 2) x 395ul
Proteinase K	(N + 2) x 5ul

9. Acrescente 400ul de Máster Mix em cada amostra. Agite por 15 segundos para dissolver o pellet (precipitado), com a ponteira + 10 segundos no Vortex.
10. Coloque as amostras em Banho Maria a 55°C.
11. Incube as amostras a 55°C por, pelo menos, 2 horas. Agite cada tubo em 30 minutos por 15 segundos para ter certeza que o pellet está ressuspendido.
12. Após as 2 horas de incubação, centrifugue os tubos por 5 minutos a 13.000 rpm (na velocidade máxima), ou por 20 minutos a 10.000 rpm, para precipitar os fragmentos celulares.
13. Separar o sobrenadante com pipeta com barreira (sempre) na ponteira. Se necessário o procedimento pode ser interrompido nesse ponto e as amostras podem ser estocadas à 4°C.
14. Acrescente 200ul de Cloreto de Litium 7, 5 M em cada amostra (ou 187,5 ul de Cloreto de Litium 8M).
15. Agite as amostras por aproximadamente 5 segundos e coloque as amostras em gelo seco (1 kg) por 10 minutos (ou no freezer – 80°C por uma hora e meia).
16. Centrifugue a 4°C as amostras por 15 minutos a 13.000 rpm ( ou 25 minutos à 10.000 rpm) para precipitar proteínas e outras contaminações.
17. Em cada amostra, retire cuidadosamente o sobrenadante e o coloque em um novo tubo com a identificação apropriada. Evite transferir qualquer material que esteja precipitado. Descarte os tubos com o precipitado de proteínas.



18. Acrescente 1ml (1000ug) de Etanol 100% em cada tubo, e inverta os tubos aproximadamente 50 vezes, ou até o floco branco de DNA ser visível.
19. Centrifugue os tubos a 13.000 rpm por 10 minutos (ou a 10.000 rpm por 20 minutos) para precipitar o DNA.
20. Verta cuidadosamente o sobrenadante em um único movimento, e vire os tubos em um pedaço de papel absorvente.
21. Acrescente 1 ml (1000ug) de Etanol 70% em cada tubo e agite as amostras para dissolver o DNA precipitado.
22. Centrifugue as amostras a 13.000 rpm por 5 minutos (ou 10.000 rpm por 15 minutos) para precipitar o DNA.
23. Cuidadosamente verta o Etanol 70% em um único movimento e vire os tubos em um pedaço de papel absorvente.
24. Seque as amostras em um sistema de concentração de DNA (Vácuo Rápido) por aproximadamente 30 minutos. Se necessário o processo pode ser interrompido e as amostras estocadas a 4°C.

**OBS:** Se não houver meios de usar o procedimento acima para secar o DNA, pegue zaragatoas estéreis e cuidadosamente seque em volta do pellet (precipitado) de DNA em cada tubo, em seguida deixe secar com os tubos abertos por aproximadamente 30 minutos.

25. Acrescente 250ul de tampão TE-4 esterilizado em cada uma das amostras (ou o volume final desejado).
26. Agite as amostras por 10 segundos cada uma, incube as amostras em Banho Maria a 55°C por 5 a 10 minutos para acrescentar na ressuspensão do DNA.
27. Remova as amostras do Banho Maria e agite por 10 segundos cada amostra para ter certeza que o precipitado foi completamente ressuspendido.
28. Centrifugue as amostras por 5 a 10 segundos a 13.000 rpm para trazer o que está na parede dos tubos para o fundo do tubo.
29. Prossiga para a quantificação do DNA, ou estoque as amostras de DNA a 4°C. As amostras de DNA podem ser mantidas guardadas a 4°C. As amostras de DNA podem ser mantidas guardadas a 4°C por no mínimo de 1 ano.