

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA  
REGIÃO CENTRO-OESTE**

**WALTER PERES DA SILVA JUNIOR**

**TRANSCRIÇÃO REVERSA-qPCR PARA A AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE  
MICROORGANISMOS DA SEPSE NEONATAL PRECOCE**

**CAMPO GRANDE**

**2020**

**WALTER PERES DA SILVA JUNIOR**

**TRANSCRIÇÃO REVERSA-qPCR PARA A AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE  
MICROORGANISMOS DA SEPSE NEONATAL PRECOCE**

Tese de Doutorado requisito para obtenção do Título de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Almir de Sousa Martins.

**CAMPO GRANDE**

**2020**



**Ata de Defesa de Tese**  
**Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**  
**Doutorado**

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte, às oito horas, no Anfiteatro I da FAMED, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Almir de Sousa Martins (UFMG), Anna Maria Duarte Miglioli (UFMS), Carmen Silvia Martimbiano de Figueiredo (UFMS), Durval Batista Palhares (UFMS) e Lucylea Pompeu Muller Braga (UNIDERP), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **WALTER PERES DA SILVA JUNIOR**, CPF 95231013072, Área de concentração em Saúde e Sociedade, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Transcrição reversa-qPCR para a avaliação da viabilidade de microrganismos da sepse neonatal precoce**" e orientação de Almir de Sousa Martins. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

| EXAMINADOR   | ASSINATURA | AVALIAÇÃO |
|--|------------|-----------|
| Dr. Almir de Sousa Martins (Interno)                   |            | A         |
| Dra. Anna Maria Duarte Miglioli (Interno)              |            | A         |
| Dra. Carmen Silvia Martimbiano de Figueiredo (Interno) |            | A         |
| Dr. Durval Batista Palhares (Interno)                  |            | A         |
| Dra. Liane de Rosso Giuliani (Interno) (Suplente)      |            |           |
| Dra. Lucylea Pompeu Muller Braga (Externo)             |            | A         |

**RESULTADO FINAL:**

Aprovação

Aprovação com revisão

Reprovação

**OBSERVAÇÕES:**

---

---

---

---

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

**Assinaturas:**

Presidente da Banca Examinadora

Aluno

Dedico este trabalho

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

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

As minhas amadas filhas **Laís e Estela Peres Rodrigues**, por me inspirarem a cada dia e por me fazerem acreditar que tudo é possível.

## AGRADECIMENTOS

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

Agradeço ao **Prof. Dr. Almir de Sousa Martins** pela paciência, inspiração, conselhos e por ter acreditado em mim e aceitado realizar minha orientação. Pessoas como o senhor são únicas e raras. Para mim ser seu orientado é um enorme privilégio e será para sempre motivo de orgulho.

Agradeço ao **Prof. Dr. Durval Batista Palhares** por ter acreditado no meu potencial como pesquisador e me iniciado no campo da pesquisa desde o projeto de mestrado. Cada conversa e cada precioso ensinamento ficarão guardados na minha memória.

A **Dr<sup>a</sup> Paula Cristhina Niz Xavier**, por todo o auxílio desde o início do projeto.

As enfermeiras **Patrícia Guenka Scarcelli, Rosa e Janete Américo da Silva** por terem realizado as coletas das amostras com tanta presteza e carinho. Este trabalho não seria possível sem vocês.

Ao **Dr. Flavio Shinzato**, pelo grande apoio e doação das cepas bacterianas, imprescindíveis para realização deste trabalho.

Ao **Hospital Santa Casa de Campo Grande** pelo uso de suas unidades neonatais, fundamentais para realização desta pesquisa.

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

Fernando Pessoa

## RESUMO

**Introdução:** A sepse neonatal permanece uma doença séria e potencialmente fatal. Um dos mais desafiadores aspectos no manejo dos neonatos com sepse é fazer seu diagnóstico. As culturas sanguíneas podem falhar em revelar o microrganismo nos pacientes sintomáticos. Surge a importância de um método acurado e rápido, com sensibilidade efetiva para detectar e prevenir o uso indiscriminado de antibióticos. O enfoque final é a redução de morbimortalidade de recém-nascidos com Sepse Neonatal Precoce (SNP). **Objetivo:** Avaliação dos cDNAs dos principais microrganismos envolvidos na SNP a partir de RNA total de amostras de sangue e de *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae* de cultivo, utilizando a transcrição reversa (RT) seguida de PCR em tempo real (qPCR). **Métodos:** No presente trabalho foram avaliados recém-nascidos (n=20) com diagnóstico inicial de sepse clínica, de ambos os sexos. *Primers* de oligonucleotídeos específicos foram desenhados e sintetizados para amplificação de amplicons alvos de genes selecionados para detecção dos microrganismos; a obtenção dos cDNAs bacterianos possibilitou construção de curvas padrões por RT-qPCR de amostras de coleção; RNA total foi extraído de cada microrganismo e de 500 µl de sangue de cada paciente, conservados em RNA later. Curvas de calibração e detecção de cDNA de bactérias viáveis foram determinadas. Como normalizador foi utilizado o gene S26. A análise do CT foi baseada nos valores de *threshold* de 0,024 para S26 e 0,04 para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*. **Resultados:** 60% (n=12) dos pacientes eram do sexo masculino; o peso médio de 2130 g e Idade Gestacional média de 33.3 semanas (n=20). A quantidade de RNA total dos extratos de bactérias variou de 10-50 ng/µL e amostras clínicas de 10-300 ng/µL, para um volume final de 100 µl; O RT-qPCR para as amostras dos pacientes demonstrou positividade para as bactérias pesquisadas em 10 dentre as amostras suspeitas (*S. aureus* = 6; *S. agalactiae* = 5; *E. coli* = 5). Os índices de concordância foram: 97,3% para RT-qPCR/evolução clínica, 94,7% RT-qPCR/evolução clínica de infecção e 100% RT-qPCR negativo /evolução clínica sem infecção. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo apresentam uma ferramenta molecular específica por RT do RNA bacteriano seguido de qPCR, potencialmente eficiente e importante para detecção de bacteremias em que o microrganismo se encontra vivo, devendo este método ser considerado futuramente como importante ferramenta de diagnóstico específico em pequenas quantidades de sangue de pacientes com sepse neonatal precoce. O método de RT pode ajudar a evitar o uso indiscriminado de antibióticos.

**Palavras chave:** Sepse Neonatal. Transcrição Reversa. PCR.

## ABSTRACT

**Introduction:** Neonatal sepsis remains a serious and potentially fatal disease. One of the most challenging aspects in the management of neonates with sepsis is making their diagnosis. Blood cultures may fail to reveal the microorganism in symptomatic patients. The importance of an accurate and fast method, with effective sensitivity to detect and prevent the indiscriminate use of antibiotics, appears. The final focus is the reduction of morbidity and mortality in newborns with Early Neonatal Sepsis (PNS). **Objective:** Evaluation of the cDNAs of the main microorganisms involved in SNP using total RNA from blood samples and *E. coli*, *S. aureus* and *S. agalactiae* from culture, using reverse transcription (RT) followed by real-time PCR (qPCR). **Methods:** In the present study, newborns (n = 20) with an initial diagnosis of clinical sepsis, of both sexes, were evaluated. Specific oligonucleotide primers were designed and synthesized to amplify amplicons targeted by selected genes to detect microorganisms; obtaining bacterial cDNAs enabled the construction of standard curves by RT-qPCR of collection samples; Total RNA was extracted from each microorganism and from 500 µl of blood from each patient, preserved in RNAlater. Calibration curves and cDNA detection of viable bacteria were determined. The S26 gene was used as a normalizer. CT analysis was based on threshold values of 0.024 for S26 and 0.04 for *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli*. **Results:** 60% (n = 12) of the patients were male; the average weight of 2130 g and the average gestational age of 33.3 weeks (n = 20). The amount of total RNA in the bacterial extracts varied from 10-50 ng / µL and clinical samples from 10-300 ng / µL, for a final volume of 100 µl; The RT-qPCR for patient samples demonstrated positivity for the surveyed bacteria in 10 of the suspected samples (*S. aureus* = 6; *S. agalactiae* = 5; *E. coli* = 5). The agreement rates were: 97.3% for RT-qPCR / clinical course, 94.7% RT-qPCR / clinical course of infection and 100% negative RT-qPCR / clinical course without infection. **Conclusion:** The results of the present study present a specific molecular tool by RT of bacterial RNA followed by qPCR, potentially efficient and important for the detection of bacteremias in which the microorganism is alive, and this method should be considered in the future as an important specific diagnostic tool in small amounts of blood from patients with early neonatal sepsis. The RT method can help prevent the indiscriminate use of antibiotics.

**Keywords:** Neonatal sepsis. Reverse Transcription. PCR.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Características dos Oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) selecionados e tamanho do produto (pb) para a detecção da <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> através de RT- qPCR, Campo Grande –MS, 2020..... | 54 |
| Tabela 2 – Características demográficas da população estudada, em Campo Grande – MS, 2020.....  | 58 |
| Tabela 3 – Tabela 3 – Uso de Antibióticos Materno Anteparto, Fatores de Risco Materno e Sinais e Sintomas na população estudada, em Campo Grande – MS, 2020.....  | 59 |
| Tabela 4 – Evolução clínica, diagnóstico neonatal final, resultado das hemoculturas e do RT-qPCR na população estudada, em Campo Grande – MS, 2020.....   | 66 |
| Tabela 5 – Comparação dos resultados entre RT-qPCR e evolução clínica na população estudada e Índice de Concordância, em Campo Grande – MS, 2020.....   | 73 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Curvas de amplificação para o *amplicom* alvo do gene *peptide chain release factor 1* do *Streptococcus agalactiae* obtidos pela RT-qPCR. A figura superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e a inferior as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primer* selecionado..... 61
- Figura 2 – Curvas de amplificação para o *amplicom* alvo do gene RpoB (RNA polymerase beta subunit) da *Escherichia coli*, obtidos pela RT-qPCR. A figura superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e a inferior as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primer* selecionado..... 62
- Figura 3 – Curvas de amplificação para o *amplicom* alvo do gene *MHC class II analog protein* do *Staphylococcus aureus*, obtidos pela RT-qPCR. A figura superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e a inferior as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primer* selecionado. do *S. aureus*..... 63
- Figura 4 – Curvas de Dissociação para os *amplicons específicos* alvos dos mRNAs das três bactérias pesquisadas, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, obtidos pela RT-qPCR..... 64
- Figura 5 – Curvas de amplificação das amostras clínicas que apresentaram positividade para *Streptococcus agalactiae* obtidas pela RT-qPCR. O gráfico superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e o inferior as respectivas curvas de dissociação..... 67
- Figura 6 – Curvas de amplificação das amostras clínicas que apresentaram positividade para *Escherichia coli* obtidas pela RT-qPCR. O gráfico superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e o inferior as respectivas curvas de dissociação..... 68
- Figura 7 – Curvas de amplificação das amostras clínicas que apresentaram positividade para *Staphylococcus aureus* obtidas pela RT-qPCR. O gráfico superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e o inferior as respectivas curvas de dissociação..... 69
- Figura 8 – Resultados da quantificação relativa das amostras clínicas positivas para *Streptococcus agalactiae* obtidos pela RT-qPCR..... 70
- Figura 9 – Resultados da quantificação relativa das amostras clínicas positivas para *Escherichia coli* obtidos pela RT-qPCR. .... 70

Figura 10 – Resultados da quantificação relativa das amostras clínicas positivas para *Staphylococcus aureus* obtidos pela RT-qPCR..... **71**

Figura 11 – Curvas de amplificação para o amplicon de 75 pb do gene humano S26 padrão, utilizado como normalizador da RT-qPCR para as amostras de sangue humano. As respectivas curvas de amplificação (gráfico superior) e dissociação (gráfico inferior) são mostradas abaixo..... **72**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| ABCG          | Associação Beneficente Santa Casa de Campo Grande |
| AIG           | Adequado para a idade gestacional                 |
| %             | Porcento  |
| CPAP          | <i>Continuous Positive Airway Pressure</i>        |
| CRP           | Proteína C Reativa                                |
| CT            | <i>Cycle Threshold</i>                            |
| DEPC          | Dietil Pirocarbonato                              |
| dl            | Decilitro   |
| DNA           | Ácido desoxirribonucleico                         |
| EDTA          | Ácido etileno diaminotetracético                  |
| ESBL          | Beta-lactamase de espectro extendido              |
| <i>et al.</i> | Colaboradores                                     |
| GIG           | Grande para a idade gestacional                   |
| g             | Gramma  |
| HMC           | Hemocultura                                       |
| HR            | Hospital Regional                                 |
| ICB           | Instituto de Ciências Biológicas                  |
| ID            | Identificação                                     |
| IFN           | Interferon  |
| IG            | Idade Gestacional                                 |
| IL            | Interleucina                                      |
| Kg            | Kilograma   |
| LCR           | Líquido Cefalo-Raquidiano                         |
| M             | Marcador de peso molecular ( <i>Ladder</i> )      |
| ml            | Mililitro   |
| Mm            | Milimolar   |
| MSSA          | <i>Staphylococcus aureus</i> metilino-suscetível  |
| MRSA          | <i>Staphylococcus aureus</i> metilino-resistente  |
| NA            | Não aferido                                       |

|           |  |
|-----------|--|
| NUFIGEN   | Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica Funcional   |
| nm        | Nanômetros   |
| ng        | Nanograma  |
| °C        | Graus Celsius  |
| pb        | Pares de base  |
| PCR       | Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase) |
| qPCR      | Reação em cadeia da polimerase em tempo real               |
| PCT       | Procalcitonina   |
| PIG       | Pequeno para a Idade Gestacional                           |
| pb        | Pares de base  |
| pmol      | picomol  |
| PL        | Punção Lombar  |
| RN        | Recém-nascido  |
| RNA       | Ácido ribonucleico   |
| RNAm      | Ácido ribonucleico mensageiro                              |
| RT - qPCR | Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa       |
| rpm       | Rotações por minuto  |
| SCN       | Estafilococo coagulase-negativo                            |
| SDR       | Síndrome do Desconforto Respiratório                       |
| SGB       | Estreptococo do grupo B                                    |
| SNC       | Sistema Nervoso Central                                    |
| SNP       | Sepse Neonatal Precoce                                     |
| sscDNA    | DNA complementar de fita simples                           |
| TNF       | Fator de Necrose Tumoral                                   |
| TTRN      | Taquipneia Transitória do Recém-Nascido                    |
| UFC       | Unidade Formadora de Colônia                               |
| UFMG      | Universidade Federal de Minas Gerais                       |
| UFMS      | Universidade Federal de Mato Grosso do Sul                 |
| UTI       | Unidade de Terapia Intensiva                               |
| µg        | Micrograma   |
| µl        | Microlitro   |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | <b>25</b> |
| 2.1 SEPSE NEONATAL PRECOCE.....   | 25        |
| 2.2 EPIDEMIOLOGIA.....  | 25        |
| 2.3 FISIOPATOLOGIA.....   | 26        |
| 2.4 FATORES DE RISCO.....   | 27        |
| 2.5 PATÓGENOS.....  | 29        |
| <u>2.5.1 Estreptococo do grupo B (<i>Streptococcus agalactiae</i>)</u> .....            | 30        |
| <u>2.5.2 <i>Escherichia coli</i></u> .....  | 31        |
| <u>2.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i> e Estafilococo Coagulase Negativo (SCN)</u> ..... | 32        |
| <u>2.5.4 Outras bactérias Gram-negativas</u> .....                                      | 32        |
| <b>2.6 DIAGNÓSTICO</b> .....  | <b>33</b> |
| <u>2.6.1 Clínico</u> .....  | 33        |
| <u>2.6.2 Laboratorial</u> .....   | 34        |
| 2.6.2.1 Testes Hematológicos.....   | 34        |
| 2.6.2.2 Reações de Fase Aguda.....  | 36        |
| 2.6.2.3 Outros biomarcadores.....   | 37        |
| 2.6.2.4 Hemocultura.....  | 38        |
| 2.6.2.5 Métodos Moleculares.....  | 40        |
| <u>2.6.3 Análise Liquórica</u> .....  | 43        |
| 2.7 TRATAMENTO.....   | 44        |
| 2.8 MORBIMORTALIDADE.....   | 46        |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....  | <b>48</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....  | 48        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 48        |
| <b>4 METODOLOGIA.....</b>  | <b>49</b> |
| 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....  | 49        |
| 4.2 TIPO DE ESTUDO.....  | 49        |
| 4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....   | 49        |
| <u>4.3.1 Critérios de Inclusão.....</u>  | <u>50</u> |
| <u>4.3.2 Critérios de Exclusão.....</u>  | <u>51</u> |
| 4.4 COLETA, PROCESSAMENTO E DESCARTE DAS AMOSTRAS.....   | 51        |
| <u>4.4.1 Coleta de Amostras de Sangue e Processamento das Hemoculturas.....</u>                | <u>51</u> |
| <u>4.4.2 Coleta de Amostras de Sangue para RT-qPCR.....</u>                                    | <u>52</u> |
| <u>4.4.3 Coleta dos Isolados Bacterianos.....</u>  | <u>52</u> |
| <u>4.4.4 Extração do RNA total.....</u>  | <u>52</u> |
| <u>4.4.5 Seleção dos Oligonucleotídeos iniciadores (<i>Primers</i>) .....</u>                  | <u>54</u> |
| <u>4.4.6 Transcrição Reversa (RT) .....</u>  | <u>55</u> |
| <u>4.4.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real e quantificação relativa (qPCR).....</u> | <u>56</u> |
| 4.5 RECRUTAMENTO E COLETA DE DADOS.....  | 56        |
| 4.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....   | 57        |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>   | <b>58</b> |
| 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, DEMOGRÁFICAS E ANTROPOMÉTRICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....        | 58        |
| 5.2 RESULTADOS DA RT-QPCR PARA AS AMOSTRAS PADRÕES.....  | 59        |
| 5.3 RESULTADOS DA RT-qPCR PARA AS AMOSTRAS DOS PACIENTES.....                                  | 65        |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>   | <b>80</b> |
| <b>8 CONCLUSÃO.....</b>  | <b>82</b> |

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>       | <b>83</b> |
| <b>APÊNDICES E ANEXO.....</b> | <b>95</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

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

O termo sepse neonatal é usado para descrever qualquer infecção bacteriana sistêmica documentada por uma cultura sanguínea ou de líquido cefalorraquidiano positiva para uma espécie bacteriana patogênica em crianças com até 28 dias de vida (MARTIN; FANAROFF; WALSH, 2011). A sepse no RN é classificada em precoce ou tardia com base na idade em que o paciente apresenta o início dos sinais e sintomas. Apesar de existir na literatura uma grande variação com relação a definição desta idade, a que parece mais consistente é a adotada pela Rede Vermont Oxford e Academia Americana de Pediatria, que consideram Sepse Neonatal Precoce (SNP) aquela que ocorre nos primeiros três dias de vida (SHANE; STOLL, 2014; PUOPOLO *et al.*, 2018; STOLL *et al.*, 2011).

A incidência de sepse comprovada por cultura varia de um a oito casos por mil nascidos vivos, sendo que em recém-nascidos de muito baixo peso, pode atingir até 300 por mil nascidos vivos (LEVENE; TUDEHOPE; SINHA, 2010). A incidência de SNP varia bastante, sendo reportada incidência de 1 caso por 1000 nascidos vivos a termo em países desenvolvidos como os Estados Unidos, e de 4,8 a 20,7 casos por 1000 nascidos vivos em países em desenvolvimento como a Índia ou Egito (BHAT; BABY, 2011; SCHEEL; PERKINS, 2018; WESTON *et al.*, 2011). No Brasil, ainda existem poucos estudos de incidência de SNP, os quais demonstram uma grande variabilidade nos índices, como o observado no estudo de Goulart *et al.* (2006), realizado em Santa Catarina cuja incidência de SNP foi de 50,3 casos por 1000 nascidos vivos e no estudo realizado por Silva *et al.* (2009), no Pará que evidenciou uma incidência de 9.8 casos por 1000 nascidos vivos.

O mais importante fator predisponente de infecção que pode resultar em sepse é prematuridade ou baixo peso ao nascer. A imaturidade do sistema imune neonatal ajuda a explicar a maior incidência de infecção em recém-nascidos em comparação com crianças maiores (BORGHESI *et al.*, 2018). A incidência de SNP em prematuros de extremo baixo peso são superiores (3 a 10 vezes maiores que recém-nascidos à termo), em virtude da disfunção imune e ausência da passagem transplacentária de anticorpos maternos IgG adquiridos (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017); para recém-nascidos com peso de nascimento menor de 1500 gramas, nos Estados Unidos, a incidência está estimada em cerca de 11 casos por 1000 nascidos vivos (SCHEEL; PERKINS, 2018; WESTON *et al.*, 2011).

Os organismos causadores da SNP são tipicamente colonizadores do trato genitourinário materno, levando a contaminação do líquido amniótico, placenta, cérvix ou canal vaginal (POLIN; ST GEME III, 1992). Os organismos mais frequentemente envolvidos na sepse precoce nos Estados Unidos são o Estreptococo do grupo B (SGB) e a *Escherichia coli*, que juntos perfazem aproximadamente 70% das infecções (SHANE; STOLL, 2013). Quando prematuros e neonatos com muito baixo peso são considerados separadamente, o número de casos atribuíveis a *E. coli* e outros Gram-negativos está aumentado, tornando a sepse por Gram-negativos a etiologia mais comum da SNP nesta população (FALCIGLIA *et al.* 2012; SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

A etiologia da SNP em países em desenvolvimento difere do encontrado nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, com predominância de infecções causadas por Gram-negativos (SELIEM; SULTAN, 2018; ZAIDI *et al.*, 2009). É sugerido que após a introdução da antibioticoterapia profilática anteparto, as bactérias gram-negativas, especialmente *E. coli*, tenham tornado-se mais comuns, principalmente entre a população de prematuros (FALCIGLIA *et al.*, 2012). O aumento da incidência de sepse por organismos gram-negativos pode estar ocorrendo em parte devido ao aumento da frequência do uso de profilaxia antibiótica para SGB na mãe (SIMONSEN *et al.*, 2014). Estudo recente em recém-nascidos de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, encontrou um predomínio de *E. coli* (76% dos casos) entre as bactérias causadoras de SNP, seguida pelo *S. aureus* (54% dos casos) e *S. agalactiae* (13% dos casos) (SILVA JUNIOR, 2015). Embora com relativamente baixo número de casos, a SNP permanece como uma das principais

causas de morbimortalidade na população neonatal, principalmente em prematuros, podendo causar impacto na saúde dos sobreviventes à longo prazo (KHAN; MORRIS; BUTTA, 2017).

Um dos mais desafiadores aspectos no manejo dos neonatos com sepse é fazer seu diagnóstico. Os sinais mais precoces de sepse costumam ser súbitos e inespecíficos. A maioria das complicações da prematuridade, incluindo síndrome do desconforto respiratório e cardiopatias congênitas, tem manifestações similares àquelas relacionadas a sepse, tornando o diagnóstico clínico da sepse bastante difícil (RUBARTH; CHRISTENSEN; RILEY, 2017; SHANE; STOLL, 2013).

O diagnóstico da SNP deve ser o mais precoce possível em função da sua elevada morbimortalidade. O diagnóstico precoce da sepse é crítico para o uso eficiente das modalidades terapêuticas, entretanto não há até o momento nenhum biomarcador que possa guiar o diagnóstico de maneira específica, precisa e confiável (INAN; TANRIÖVER; DAYAGAÇERDEN, 2015). Desta forma, e em função disto, atualmente ele baseia-se em fatores de risco maternos e neonatais; manifestações clínicas do recém-nascido e exames laboratoriais. Segundo Silveira e Procianoy (2012), a presença de três ou mais sinais clínicos no recém-nascido ou no mínimo dois destes sinais, associados a fatores de risco maternos permite diagnóstico de sepse clínica ou síndrome séptica. Os exames tipicamente a serem solicitados em um neonato com suspeita de sepse incluem um hemograma completo, hemocultura simples e punção lombar para análise celular e cultura. Em adição, podem ser solicitados as reações de fase aguda como a dosagem da proteína C reativa (CRP) e procalcitonina (PCT) (GERDES, 2004; POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012). No entanto, nenhum destes testes tem sido particularmente útil na identificação dos pacientes sépticos devido sua baixas sensibilidades e valor preditivos positivos (KLINGENBERG *et al.*, 2018). A contagem absoluta de neutrófilos e o número absoluto de neutrófilos imaturos, por exemplo, tem uma sensibilidade subótima e baixo valor preditivo positivo para SNP pois sua elevação não distingue de forma consistente uma resposta inflamatória de uma etiologia não infecciosa (NG *et al.*, 2018; POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012; SHANE; STOLL, 2013).

O isolamento de um microrganismo patogênico no sangue (ou em outro fluido corporal) é atualmente o único método para estabelecer definitivamente o diagnóstico de sepse neonatal. Os métodos para detecção da presença de bacteremia são fundamentados no cultivo de sangue em meios de cultura propícios para o crescimento microbiano. Esses métodos são conhecidos como hemoculturas. A cultura sanguínea é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de sepse neonatal (JEFFERIES; CANADIAN PAEDIATRIC SOCIETY, FETURS AND NEWBORN COMMITTEE, 2017; SHAH; PADBURY, 2014).

O grande problema da cultura sanguínea em neonatos é que, em geral, ocorre uma demora de até 48 a 72 horas para ela torne-se positiva (NG *et al.*, 2018; PAMMI *et al.*, 2011). Além disso, mesmo com o uso de sistemas modernos automatizados, sua sensibilidade para identificar neonatos sépticos é somente 50 a 80% em condições ideais, principalmente com uso de volumes baixos de sangue (< 1ml) e se as concentrações de bactérias no sangue forem baixas (<4UFC/ml) (GERDES, 2004; SEALE, 2015). O crescente aumento no uso de antibióticos à mãe tem reduzido a taxa de positividade para níveis de até 3% (OTOLINNI *et al.*, 2002; KLINGENBERG, 2018). Desta forma, o achado de uma cultura sanguínea positiva com um organismo patogênico é diagnóstica de sepse neonatal, entretanto, o encontro de uma cultura negativa não descarta a possibilidade da doença. O que se deve em virtude da dificuldade no isolamento do microrganismo, mesmo quando presente na corrente sanguínea.

Como as culturas falham em revelar um organismo em muitos pacientes com sinais e sintomas consistentes com doenças infecciosas, as técnicas de biologia molecular tornam-se cada vez mais necessárias, por se tratarem de métodos mais rápidos e sensíveis na detecção da presença do microrganismo no sangue, tornando-se excelentes ferramentas no diagnóstico e tratamento desses pacientes (VIRA; BHAT; CHAVAN, 2016).

As técnicas associadas à biologia molecular progrediram muito desde a década de 50, quando o DNA teve sua estrutura descrita. Desde lá, tem havido um grande interesse no desenvolvimento de tecnologias moleculares para o diagnóstico de sepse bacteriana. A maioria destes testes promete uma detecção rápida do organismo, diretamente do sangue, sem realização de cultura prévia e com

especificidade e sensibilidade mais altas quando comparado às culturas, podendo detectar DNA ou RNA, mesmo em concentrações muito baixas (SIMONSEN *et al.*, 2014).

Métodos moleculares baseados na tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de infecção e identificação de patógenos. Estes métodos baseiam-se na detecção e reconhecimento do DNA do patógeno no sangue ou em outros espécimes clínicos, com o potencial de obter resultados em um tempo muito mais curto (horas) do que é possível com as culturas convencionais (VENKATESH *et al.*, 2010). Para patógenos bacterianos, o uso de *primers* específicos que detectam organismos particulares ou de *primers* universais que se ligam à sequências conservadas em bactérias (principalmente ligadas aos genes *16S rRNA* ou *23S rRNA*), tem capacidade de detectar virtualmente qualquer patógeno bacteriano existente (DARK; DEAN; WARHURST, 2009).

Considera-se hoje que técnicas moleculares como a PCR sejam métodos importantes para detectar agentes etiológicos de infecção, pois não requerem o cultivo do microrganismo causal, sendo dependentes apenas da habilidade para detectar sua assinatura genômica. Além disso, tais técnicas possuem uma maior sensibilidade quando comparados a ensaios imunológicos e métodos de coloração. A PCR pode amplificar quantidades diminutas de DNA (10 a 100 cópias em amostras clínicas) em poucas horas (NG, 2004).

Os métodos moleculares tornaram-se, desta forma, uma ferramenta valiosa para identificação de patógenos, possuindo um custo efetivo menor do que métodos convencionais, considerando o tempo de internação dos pacientes e também o grande uso de antibioticoterapia empírica (MAKHOUL *et al.*, 2005). A detecção através da amplificação de uma região específica do genoma bacteriano pode auxiliar no diagnóstico da sepse, bem como ampliar o leque de possibilidades etiológicas, hoje baseadas praticamente apenas no raciocínio clínico (NATARAJAN *et al.*, 2006).

Ultimamente, uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em tempo real ou quantitativo (qPCR), vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar

resultados quantitativos. Essa técnica permite, segundo Novais e Pires-Alves (2004), o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais rápida, com melhor sensibilidade, precisão, reprodutibilidade, acurácia, controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação em relação à PCR convencional. O uso da PCR em tempo real baseado no gene *16S rDNA*, por exemplo, é capaz de detectar uma grande quantidade de patógenos comuns encontrados na sepse neonatal, com uma sensibilidade e especificidade diagnóstica de 99 e 100%, respectivamente (DARK; DEAN; WARHURST, 2009; JORDAN; DURSO, 2005). Assim, o diagnóstico molecular tem o potencial de transformar a precisão, sensibilidade e especificidade da detecção do patógeno de uma maneira rápida e custo-efetiva (VIRA; BHAT; CHAVAN, 2016).

A grande limitação dos métodos da PCR no diagnóstico da sepse é a incapacidade de identificar se o microrganismo está ou não vivo no sangue, já que a presença de DNA bacteriano nem sempre tem significância fisiopatológica, não indicando necessariamente a presença de microrganismos viáveis (GALVES, 2013). A possibilidade de detectar contaminantes também é alta, tornando mandatória a correlação clínica (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017). Com base nas conhecidas limitações das hemoculturas, e devido a incidência de resultados falso positivos em métodos de detecção baseados em DNA, torna-se necessária e relevante a análise da viabilidade da bactéria. Neste contexto, considerando a baixa estabilidade do RNA fora da célula, o uso da Reação em Cadeia da Polimerase Transcrição Reversa (RT-qPCR), uma modificação do PCR, que implica na extração e detecção de RNA bacteriano, é considerada um marcador adequado para o rastreamento de células vivas (KLIMOV, 2019; MOLAEI *et al.*, 2015). Um estudo de Barros (2014) demonstrou, através de transcrição reversa de RNA total obtido de placenta de RN com suspeita de infecção prenatal, uma forte relação entre viabilidade bacteriana através da análise da expressão dos marcadores de virulência e proliferação por RT-qPCR e o material genético bacteriano observado na microscopia confocal, sugerindo que o estudo da viabilidade bacteriana através desta metodologia seja efetiva e viável.

A escolha correta inicial da terapia antibiótica tem salvado mais vidas do que qualquer outra intervenção médica e há uma janela diagnóstica de algumas horas para o reconhecimento do quadro séptico e início da terapia antimicrobiana a partir

do qual a taxa de mortalidade aumenta (SINHA *et al.*, 2018). Considera-se fundamental a identificação do microrganismo causador da infecção e o início de forma mais precoce possível do antibiótico adequado, já que uma antibioticoterapia inicial inadequada na sepse encontra-se associada ao aumento da morbidade e da mortalidade ao paciente (MURTHY *et al.*, 2019). Também, por outro lado, a antibioticoterapia indiscriminada é responsável pelo surgimento crescente de bactérias multirresistentes, infecções fúngicas e causa impacto negativo no desenvolvimento do microbioma intestinal com aumento do risco de enterocolite necrosante, asma, obesidade, doença inflamatória intestinal e desordens neurológicas futuras nos neonatos expostos (BALLOT *et al.*, 2012; GOOD; HOOVEN, 2019; SCHEEL; PERKINS, 2018; SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

Infelizmente ainda existem poucos estudos com uso de testes moleculares baseados em qPCR em amostras sanguíneas para o diagnóstico da sepse neonatal precoce. Nos laboratórios de Diagnóstico Molecular em Pediatria - UFMS e Genômica Funcional do Instituto de Ciências Biológicas – NUFIGEN/ICB/UFMG tem-se estudado, há algum tempo, o uso de biologia molecular para o diagnóstico bacteriano na SNP (SILVA JUNIOR *et al.*, 2016; BARROS, 2014). Conseqüentemente, surgiu a necessidade de uma nova metodologia para determinação do diagnóstico funcional da infecção bacteriana através da detecção de sua viabilidade.

Assim justifica-se o desenvolvimento desta pesquisa, que tem em seu principal objetivo a avaliação dos transcritos de mRNA dos microrganismos: *E.coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae* através de RT-qPCR, de maneira que o seu diagnóstico em recém-nascidos com SNP seja rápido (sem que haja necessidade de esperar por hemoculturas) e funcional (baseado na viabilidade da bactéria e não apenas na presença de seu DNA genômico) (KASPER *et al.*, 2013).

Haja vista, que atualmente há escassez na literatura de estudos utilizando tal metodologia e finalidade, este projeto torna-se um precursor no âmbito do uso da biologia molecular, com potenciais vantagens sobre os métodos microbiológicos, para o diagnóstico rápido e específico da infecção neonatal precoce, podendo impactar positivamente em todo o processo clinico-terapêutico que dependa do

diagnóstico funcional de uma infinidade de microrganismos de interesse clínico nas unidades neonatais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SEPSE NEONATAL PRECOCE

A SNP, definida como uma cultura de líquido ou sangue positiva nas primeiras 72h após o nascimento, permanece uma doença séria e potencialmente fatal, que está relacionada com fatores de risco maternos (principalmente ruptura prematura de membranas por mais de 18 horas, febre/corioamnionite materna, colonização materna por *Estreptococo* do grupo B e infecção do trato urinário) e tem como principais agentes bacterianos, os transmitidos verticalmente da mãe antes ou durante o parto (PUOPOLO *et al.*, 2018). Este tipo de sepse usualmente tem um início fulminante com comprometimento multissistêmico, apresentando uma alta taxa de mortalidade (CLOHERTY *et al.*, 2012), sendo que na era pré-antibiótico a sepse neonatal era praticamente fatal. As taxas de mortalidade diminuíram dramaticamente após a introdução de agentes microbianos e com os avanços tecnológicos nos cuidados neonatais. Nas últimas duas décadas, a taxa de mortalidade tem declinado para aproximadamente 5 a 10% nos países desenvolvidos podendo atingir taxas de até 50% em algumas séries, especialmente com patógenos gram-negativos (REMINGTON *et al.*, 2011).

### 2.2 EPIDEMIOLOGIA

A incidência de sepse comprovada por cultura varia de um a oito casos por mil nascidos vivos, sendo que em recém-nascidos de muito baixo peso, pode atingir

até 300 por mil nascidos vivos (LEVENE; TUDEHOPE; SINHA, 2010). A incidência de SNP varia bastante, sendo reportada incidência de 0,77 a 8 casos por 1000 nascidos vivos em países desenvolvidos como os Estados Unidos ou Canadá e de 4,8 a 20,7 casos por 1000 nascidos vivos em países em desenvolvimento como a Índia ou Egito (BHAT; BABY, 2011; WESTON *et al.*, 2011).

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

### 2.3 FISIOPATOLOGIA

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

Sabe-se que a infecção ascendente intra-amniótica acompanhada por aspiração do líquido amniótico pode resultar em infecção neonatal sistêmica, especialmente se houver presença de ruptura prolongada de membranas ou algum procedimento que atinja a integridade do conteúdo uterino, como amniocentese, cerclagem cervical ou cordocentese. Aproximadamente 1 a 4% dos recém-nascidos

de mãe com infecção intra-amniótica desenvolvem infecção sistêmica, sendo que a infecção neonatal pode também ser adquirida durante o parto vaginal por bactérias colonizadoras do trato genital baixo materno (LEVENE; TUDEHOPE; SINHA, 2010).

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

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

O grau de imaturidade do sistema imune do prematuro, incluindo baixos níveis de imunoglobulinas relacionados a transferência materna reduzida de IgG, aumenta o risco de sepse no neonato pré-termo. Já, a função de barreira da pele e das membranas mucosas está diminuída em prematuros e está adicionalmente comprometida em prematuros doentes devido aos múltiplos procedimentos invasivos, como acessos venosos e intubação (GHAZAL; DICKINSON; SMITH, 2013).

## 2.4 FATORES DE RISCO

Fatores de risco para SNP contribuem para o diagnóstico clínico mas são insuficientes para sozinhos determinarem o diagnóstico da SNP (RUSSEL; KUMAR, 2015), incluem os maternos e os relacionados ao recém-nascido. Riscos maternos,

como ingestão de alimentos contaminados, podem ocorrer antes do trabalho de parto e do parto propriamente, sendo a contaminação por *Listeria monocytogenes* em alimentos refrigerados o mais importante exemplo.

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

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

Também são fatores de risco maternos: doença periodontal, pré-natal pobre ou tardio, infecção do trato urinário, baixo nível sócio-econômico, nutrição pobre e uso de drogas ilícitas (BARROS, 2018; PUOPOLO; ESCOBAR, 2013).

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

## 2.5 PATÓGENOS

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

A etiologia da SNP em países em desenvolvimento difere do encontrado nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, com predominância de infecções causadas por Gram-negativos. Em uma revisão combinada de SNP na América Latina, Caribe, Ásia e África, o patógeno mais comum causador de sepse nos primeiros 3 dias de vida foi a *Klebsiella pneumoniae*, responsável por 26% casos, seguida do *Staphylococcus aureus*, SGB e *Escherichia coli*, como os mais frequentes patógenos isolados, causando entre 13 a 17% das infecções (ZAIDI *et al.*, 2009).

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

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

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

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

Na gestação o SGB é carregado assintomaticamente na membrana mucosa genital, retal e faríngea. As taxas de colonização variam conforme o local, sendo que nos Estados Unidos, a taxa de colonização materna está estimada entre 20 e 30%. São fatores de risco para a colonização materna: raça negra, idade menor de 20 anos, baixa paridade e diabetes. A presença de colonização materna por SGB resulta em colonização do neonato intraparto ou intraútero em aproximadamente 50% dos casos. Bacteriúria por SGB durante a gestação está associada com grande colonização do trato retovaginal e é considerado um fator de risco significativo para SNP. Estima-se que cerca de 85% dos casos de SNP são atualmente evitados através da correta profilaxia antibiótica anteparto (SIMONSEN *et al.*, 2014).

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

Como a infecção por SGB no neonato ocorre em somente 1% das mulheres colonizadas, duas estratégias para reduzir o risco tem sido descritas: a primeira

baseia-se na testagem de todas as mulheres com idade gestacional entre 35 e 37 semanas quanto a colonização para SGB; e a segunda baseia-se no tratamento daquelas positivas com penicilina intraparto, se houver indicação (Penicilina G Cristalina é administrada para mulheres colonizadas em trabalho de parto com dois ou mais fatores de risco incluindo gestação menor de 37 semanas, ruptura de membranas superior a 18 horas e febre materna superior a 38<sup>ª</sup>C) (CDC, 2010).

### 2.5.2 *Escherichia coli*

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

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

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

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

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

### 2.5.4 Outras bactérias gram-negativas

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

## 2.6 DIAGNÓSTICO

### 2.6.1 Clínico

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

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

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

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

### 2.6.2 Laboratorial

Os exames tipicamente a serem solicitados em um neonato com suspeita de sepse incluem um hemograma completo, hemocultura simples e punção lombar para análise celular e cultura. Em adição, podem ser solicitados as reações de fase aguda como proteína C reativa (CRP) e procalcitonina (PCT). A necessidade de uma radiografia de tórax é usualmente determinada pela presença de sintomas respiratórios (RUSSEL, 2011). A análise urinária não faz parte dos exames de triagem em paciente com suspeita de sepse neonatal precoce, com exceção dos neonatos com diagnóstico fetal de mal-formação do trato urinário (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012; GERDES, 2004).

#### 2.6.2.1 Testes hematológicos

Contagem de leucócitos, diferencial, contagem absoluta de neutrófilos e a relação entre neutrófilos imaturos e totais no sangue são largamente utilizados como testes de *screening* para sepse neonatal. Infelizmente, nenhum destes testes tem

sido particularmente útil na identificação da maioria dos pacientes sépticos. O número absoluto de neutrófilos imaturos e a contagem absoluta de neutrófilos tem uma sensibilidade subótima e baixo valor preditivo positivo para SNP pois sua elevação não distingue de forma consistente uma resposta inflamatória de uma etiologia não infecciosa (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012; SHANE; STOLL, 2013).

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

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

As contagens plaquetárias não costumam ser muito sensíveis ou específicas no diagnóstico de sepse neonatal e também não são úteis na monitorização da resposta ao tratamento. Trombocitopenia e trombocitose costumam ser achados

tardios em infecções fúngicas e bacterianas (SHANE; STOLL, 2013; SIMONSEN *et al.*, 2014).

### 2.6.2.2 Reações de Fase Aguda

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

Os níveis de CRP aumentam dentro de 6 a 8 horas da infecção e alcançam o pico em 24 horas, sendo estimulados pelo aumento de interleucina 6 (IL-6). A CRP tem seu melhor valor preditivo se mensurada dentro de 24 a 48 horas da infecção. Um aumento no valor do nível de CRP é um preditor melhor do que medidas isoladas. Duas determinações normais (entre 8 a 24 horas do nascimento e 24 horas após) tem demonstrado um valor preditivo negativo de 99,7% para sepse neonatal precoce comprovada, levando a CRP a ser rotineiramente utilizada de forma seriada para auxiliar na decisão quanto à suspensão da antibioticoterapia, no caso de ocorrer rápida redução de seus níveis (BENITZ, 2010). Assim, valores de CRP repetidamente normais são uma evidência bastante forte contra infecção bacteriana e podem auxiliar na suspensão segura dos antibióticos (SIMONSEN *et al.*, 2014). Pacientes prematuros tem menores valores de CRP de base e menor aumento em resposta à infecção.

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

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

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

Desta maneira, embora a PCT seja um marcador mais sensível de infecção do que a CRP, marcadores tais como PCT, CRP e índices leucocitários tem similar sensibilidade e especificidade quando analisados sozinhos. Já, uma combinação destes parâmetros fornece melhores resultados, sugerindo que a análise conjunta, associada ao mínimo de volume de sangue coletado, seja de mais valia para o diagnóstico da SNP (CELIK *et al.*, 2012).

### 2.6.2.3 Outros biomarcadores

Evidências recentes demonstram que neonatos reagem a sepse bacteriana com uma resposta inflamatória exagerada, que pode contribuir para a alta

mortalidade observada na SNP (SATAR, 2012). Citocinas são mediadores químicos endógenos que desempenham importante função na cascata inflamatória, as quais pode-se incluir a interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interferon gama (IFN- $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (PUSTERLA *et al.*, 2006; SRINIVASAN; HARRIS, 2012). A razão para a investigação deste grupo diverso de mensageiros intercelulares é que os índices leucocitários e CRP são marcadores tardios e não se mostram sensíveis o suficiente para o diagnóstico precoce da sepse neonatal (NG, 2004). A expressão dos antígenos de superfície celular dos leucócitos é conhecida por ser regulada para mais ou para menos, durante a infecção bacteriana. Com o avanço na tecnologia de citometria de fluxo foi possível identificar e quantificar os marcadores de superfície celular em células específicas com pouco volume de sangue. Dentre estes antígenos de superfície, os potenciais marcadores de infecção recentemente estudados são CD11B, CD64 e CD69 (SRINIVASAN; HARRIS, 2012).

O aumento dos níveis de citocinas e expressão dos antígenos de superfície celular ocorrem antes do neonato desenvolver sinais e sintomas de sepse e eventualmente antes dos testes laboratoriais tornarem-se positivos. No entanto, atualmente, nenhum deles tem sido utilizado na rotina clínica devido a muitos fatores como as dificuldades operacionais envolvidas na detecção, a falta de especificidade e o custo e necessidade de equipamento sofisticado para realização destes testes (SHAH; PADBURY, 2014).

#### 2.6.2.4 Hemocultura

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

Os métodos para detecção da presença de bacteremia são fundamentados no cultivo de sangue em meios de cultura propícios para o crescimento microbiano.

Esses métodos são conhecidos como hemoculturas. Na ausência de testes diagnósticos moleculares clinicamente disponíveis e validados, a cultura sanguínea permanece como o padrão ouro para o diagnóstico de sepse neonatal precoce (SHAH; PADBURY, 2014; PUOPOLO *et al.*, 2018).

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

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

O volume de sangue necessário para hemocultura de neonatos é substancialmente menor do que o necessário em adultos, pois neonatos tendem a ter concentração de bactérias no seu sangue maiores do que em adultos. Como resultado, 0.5ml foi tradicionalmente considerado o volume padrão de sangue adequado para detectar bacteremia em neonatos. Entretanto, cerca de 70% de todos os neonatos com sepse tem bacteremia envolvendo baixas contagens de colônias no sangue (menor de 10 UFC/ml). Uma amostra sanguínea com 0.5ml de volume tem se mostrado insuficiente para detectar a maioria dos neonatos com estes níveis de bacteremia, enquanto 1ml dobra a chance de positividade (ZEA-VERA; OCHOA, 2015). O sangue é frequentemente coletado de veia periférica, podendo também ser obtido de cateter arterial umbilical logo após inserção ou de veia umbilical duplamente clampeada e preparada adequadamente (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012; SHANE; STOLL, 2013).

O grande problema da cultura sanguínea em neonatos é que a sensibilidade para identificar sepse é de 50 a 80% em condições ideais (GERDES, 2004). O aumento atual do uso de antibióticos na mãe tem reduzido a taxa de positividade para níveis de até 3% (OTOLINNI *et al.*, 2002). Assim, uma cultura sanguínea

positiva com um organismo patogênico é diagnóstica de sepse neonatal, entretanto, uma cultura negativa não descarta a possibilidade da doença.

#### 2.6.2.5 Métodos Moleculares

Dentre as diversas técnicas de biologia molecular desenvolvidas, destaca-se a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Esta técnica foi proposta primeiramente como uma estratégia para desvendar o mecanismo envolvido na síntese química de genes e somente quinze anos mais tarde o método foi utilizado na prática através da amplificação de DNA de células de mamíferos. O aperfeiçoamento da técnica se deu com a substituição da enzima DNA polimerase I por uma enzima termoestável isolada do microrganismo *Thermus aquaticus*, possibilitando que o método da PCR pudesse ser utilizado de forma crescente e rotineira em pesquisa e nos laboratórios de biologia molecular (FERREIRA *et al.*, 2011).

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

Métodos moleculares baseados na tecnologia da reação em cadeia da polimerase têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de infecção e identificação de patógenos. Estes métodos baseiam-se na detecção e reconhecimento do DNA do patógeno no sangue, ou também em outros espécimes clínicos, com o potencial

para obter resultados em um tempo muito mais curto (horas) do que é possível com as culturas convencionais (VENKATESH *et al.*, 2010).

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

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

Os principais compostos fluorescentes, moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, são o *SYBR Green* e *TaqMan*. O *SYBR Green* se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. Suas vantagens são o baixo custo, a facilidade no uso e a sensibilidade. Já o *TaqMan* é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma das extremidades um fluoróforo (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

O grande desafio dos métodos individuais de PCR é que eles falham em detectar a maior parte das causas de infecções neonatais. Como resultado, vários

pesquisadores e laboratórios tem descrito o Sistema PCR Multiplex, em que os DNAs de vários patógenos bacterianos podem ser amplificados em conjunto, paralelamente. Por definição, a Reação em Cadeia pela Polimerase Múltipla (PCR Multiplex) é uma variante da PCR na qual dois ou mais *loci* são simultaneamente amplificados na mesma reação. Através deste método, busca-se amplificar distintas sequências em um único tubo, implicando na necessidade de que todos os oligonucleotídeos, os iniciadores previamente desenhados para corresponder ao DNA respectivo de cada bactéria a ser identificada, assim como os demais reagentes utilizados na PCR, estejam necessariamente misturados e o programa utilizado seja adequado para permitir a detecção de cada fragmento específico e não inibir as demais (YADAV *et al.*, 2005). Desta forma, o uso de PCR Multiplex pode diferenciar vários agentes etiológicos responsáveis pela sepse, baseados no peso molecular dos fragmentos amplificados (YADAV *et al.*, 2005), contribuindo para a detecção simultânea de um número cada vez maior de doenças, a partir de um número também crescente de tipos de amostras clínicas, com menores quantidades de amostra (FERREIRA *et al.*, 2011).

Uma grande limitação do uso do PCR é sua incapacidade de diferenciar se o microrganismo está vivo ou não (SILVA JUNIOR *et al.*, 2016). Assim, o diagnóstico através do uso da RT-qPCR, uma modificação da PCR que utiliza o RNA bacteriano, além de confirmar a presença ou ausência do patógeno, pode demonstrar que este encontra-se também viável, expressando normalmente transcritos e proteínas importantes para o processo de infecção e multiplicação no hospedeiro, bem como marcadores de virulência, de maneira que a identificação da espécie pode estar disponível para o clínico em poucas horas (KLIMOV, 2019).

Considera-se fundamental a identificação do microrganismo causador da infecção e o início mais precoce possível do antibiótico adequado. Uma antibioticoterapia inicial inadequada na sepse encontra-se associada a um aumento da mortalidade em até cinco vezes. Por outro lado, a antibioticoterapia indiscriminada é responsável pelo surgimento crescente de bactérias multirresistentes e infecções fúngicas (BALLOT *et al.*, 2012). Estudos comparando hemoculturas e testes moleculares para detecção de microrganismos associados à sepse têm destacado um diagnóstico significativamente mais rápido e sensível quando utilizadas técnicas baseadas na PCR. Neste contexto, uma extração rápida

de DNA com sistema PCR mostrou ser possível, com resultados disponíveis em menos de três horas e com boa sensibilidade, auxiliando médicos a realizar decisões mais ágeis no manejo efetivo do paciente com sepse evitando o uso abusivo de antibióticos (LOUIE *et al.*, 2002, MISHRA *et al.*, 2006), e mais modernamente o uso do RT-qPCR pode tornar o diagnóstico da infecção mais precisa e clinicamente útil.

### 2.6.3 Análise Liquórica

Enquanto a punção lombar (PL) é um importante meio de obter líquido cérebro-espinhal (LCR) para descartar a presença de meningite em crianças com sepse, sua rotina em neonatos é controversa. O risco de meningite concomitante em neonatos de alto risco que parecem bem ou naqueles em que os sinais clínicos parecem ser devido a condições não infecciosas tais como síndrome do desconforto respiratório são muito baixas, de 0,25/1000 nascidos vivos (WISWEL *et al.*, 1995). Porém, mais de 23% dos neonatos com bacteremia irão apresentar meningite concomitante, segundo Shane e Stoll (2014). Assim, um número significativo de neonatos com meningite não terá este diagnóstico a menos que a PL seja realizada. Por esta razão há indicação de obter LCR através de PL em neonatos que apresentem quadro clínico sugestivo de sepse neonatal (sintomáticos) ou que apresentem hemocultura positiva (POLIN; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012).

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

realização da PL para afastar sinais de hipertensão intracraniana), a presença de trombocitopenia severa ou infecção na região lombossacra (SIMONSEN *et al.* 2014).

## 2.7 TRATAMENTO

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

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

beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) (FALCIGLIA *et al.* 2012). Tratamento com piperacilina-tazobactam e ampicilina-sulbactam estão sendo utilizados cada vez mais frequentemente entre pacientes admitidos nas unidades de terapia intensiva neonatal; entretanto a penetração destes no Sistema Nervoso Central (SNC) não é confiável, não devendo ser usados em casos de meningite (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

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

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

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

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

*Escherichia coli* e outros bacilos Gram-negativos devem ser tratados com gentamicina ou amicacina por 14 dias na bacteremia não complicada, enquanto meningite deve ser tratada por um mínimo de 21 dias. Nos casos de infecções por *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), meropenem tem sido usado com sucesso em neonatos. Para outros organismos Gram-negativos, a duração do tratamento é similar ao da *Escherichia coli*, porém com uma maior incidência de algumas complicações nas infecções meníngeas, tais como abscesso cerebral associado com *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Serratia sp.*, que podem necessitar de tratamentos com duração mais prolongada. Bacteremia não complicada deve ser tratada por 10 a 14 dias. Para infecções invasivas associadas com meningite, o tempo de tratamento deve ser de 14 a 21 dias.

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

## 2.8 MORBIMORTALIDADE

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

significativamente o número de casos de sepse neonatal no mundo (SHANE; STOLL, 2013, SATAR; ÖZLÜ, 2012). Porém, apesar dos grandes avanços no cuidado neonatal e das pesquisas neste assunto, em países em desenvolvimento, quatro de cada dez pacientes com sepse morrem ou sobrevivem com sequela grave como déficit significativo permanente no neurodesenvolvimento (WYNN, 2016).

O risco de mortalidade na SNP aumenta com o grau de prematuridade e das morbidades associadas. Os sistemas imunes inato e adaptativo não estão funcionando em níveis ótimos no período perinatal, com significativo aumento do risco do neonato desenvolver doença invasiva (SIMONSEN *et al.*, 2014).

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

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a detecção da viabilidade de microrganismos através de transcrição reversa-qPCR do sangue total de recém-nascidos com sepse neonatal precoce.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Desenhar oligonucleotídeos iniciadores para a transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativo em tempo real para os genes alvos que expressam mRNAs funcionais dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*;

3.2.2 Desenvolver e aplicar um protocolo de transcrição reversa (RT) para detecção da viabilidade dos microrganismos pesquisados no sangue da população selecionada;

3.2.3 Analisar a concordância dos resultados do protocolo de transcrição reversa (RT) em relação aos resultados de hemocultura e evolução clínica, na população selecionada.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEP/UFMS) em 01/11/16 (Número do Parecer: 1.800.920). Os pais ou responsáveis pelas crianças foram informados e esclarecidos, no momento de solicitação do consentimento para a participação na pesquisa, quanto aos objetivos, riscos, benefícios e responsabilidade do pesquisador, e da liberdade de retirar seus filhos da pesquisa a qualquer momento que achassem conveniente (Apêndice A).

### 4.2 TIPO DE ESTUDO

Estudo Descritivo Observacional Transversal.

### 4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população do estudo foi composta por recém-nascidos (RN) com suspeita de Sepse Neonatal Precoce, admitidos na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da Associação Beneficente Santa Casa de Campo Grande (ABCG).

#### 4.3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo os recém-nascidos (pré-termo, a termo ou pós-termo) que apresentaram suspeita inicial de sepse neonatal no período compreendido do nascimento até 72 horas de vida.

A suspeita inicial de sepse foi definida segundo os critérios descritos por Silveira e Procianoy (1999) e Resch, Renolder e Hofer (2016), baseados na presença de três ou mais sinais clínicos do recém-nascido ou no mínimo dois destes sinais, associados a fatores de risco maternos, dentre os descritos a seguir: 1] fatores de risco maternos tais como febre (temperatura axilar superior a 38°C), corioamnionite, ruptura prematura de membranas por um período maior que 18 horas, colonização por *Estreptococo* do grupo B e infecção urinária; 2] achados clínicos tais como apnéia, dificuldade para respirar, cianose, taquicardia ou bradicardia, déficit de perfusão ou choque; hipo ou hiperglicemia; irritabilidade, letargia, hipotonia, convulsões; distensão abdominal, vômito, intolerância à dieta, resíduo gástrico, hepatomegalia; icterícia sem causa definida; temperatura instável; petéquias ou púrpura; e uma aparência de que “não parece bem”.

De acordo com a evolução clínica e laboratorial, os pacientes receberam os diagnósticos de sepse confirmada (pacientes sepse suspeita e hemocultura ou cultura de líquido demonstrando crescimento bacteriano), sepse clínica (pacientes com sepse suspeita que receberam 5 ou mais dias de antibióticos, sem evidência de foco de infecção e sem culturas positivas), choque séptico (presença de diagnóstico de sepse clínica ou sepse confirmada com disfunção cardiovascular sustentada, ou seja, hipotensão, que foi considerada como uma pressão arterial média menor do que o valor da Idade Gestacional do paciente, ou evidência de perfusão periférica diminuída mesmo após 40ml/kg de volume em 1 hora (SILVEIRA; GIACOMINI; PROCIANOY, 2010), pneumonia (pacientes com sepse suspeita ou confirmada que receberam 5 ou mais dias de antibióticos, com evidência de alteração radiológica) ou meningite (pacientes com sepse suspeita ou confirmada com evidência de anormalidade líquórica – mais de 25 células e/ou proteinorraquia superior a 150 mg/dl e/ou glicorraquia inferior a 80% da glicemia sérica e sem culturas positivas) (KLIGEMBERG, 2018). Os pacientes em que a sepse foi descartada pela equipe

médica de neonatologistas em até 72 horas do início dos sintomas receberam o devido diagnóstico neonatal.

#### 4.3.2 Critérios de Exclusão

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

### 4.4 COLETA, PROCESSAMENTO E DESCARTE DAS AMOSTRAS

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

As amostras de sangue para hemocultura foram colhidas pelo serviço de neonatologia nos casos de suspeita de infecção dos recém-nascidos de acordo o protocolo do serviço, após a autorização dos pais e assinatura do termo de consentimento informado. Foi colhido 1ml de sangue volume considerado suficiente para uma adequada taxa de sucesso na hemocultura, segundo Russel (2011).

O sangue foi coletado por venopunção periférica ou de cateter arterial umbilical, logo após sua passagem, após cuidadosa e exaustiva assepsia do sítio de coleta com Álcool 70%, além de uso de luvas estéreis e máscara, sendo então colocado em frasco pediátrico para hemocultura automatizada.

As amostras colhidas foram transportadas imediatamente ao setor de microbiologia do laboratório da ABCG, onde as mesmas foram processadas e

analisadas de acordo com o sistema automatizado BacT/ALERT (BioMérieux, Durham, NC, EUA).

#### 4.4.2 Coleta de Amostras de Sangue para RT-qPCR

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

Foram colhidos 500 µl de sangue e colocados imediatamente em microtubo contendo 500 µl de RNA later- RNA Stabilization Solution Soln. (Ambion) e posteriormente armazenadas em congelador a -20°C até a extração de RNA e posterior realização da técnica molecular.

#### 4.4.3 Coleta dos Isolados Bacterianos

Os isolados dos microrganismos: *E. coli*, *S. agalactiae* e *S. aureus* foram escolhidos de cultura isolada no Setor de Microbiologia do Laboratório Célula® Campo Grande, durante o ano de 2019. Os patógenos foram cultivados em meios específicos a 37°C por 24 horas e aproximadamente 1 a 3 colônias foram colocadas em 500 µl de RNA later antes da extração do seu RNA total.

#### 4.4.4 Extração do RNA total

A extração do RNA total das amostras foi realizada para verificar a presença ativa de *E. coli*, *S. agalactiae* e *S. aureus*, através da expressão de seus mRNAs.

Para cada extração do RNA total para padronização foram utilizadas colônias da respectiva bactéria suspensa em 500µl de RNA later coletados em temperatura ambiente e armazenados a 4°C em geladeira comum (para a construção das curvas padrão). No caso das amostras dos pacientes, foram utilizados tubos contendo 500µl sangue em 500µl de RNA later, conforme o descrito anteriormente.

Os tubos foram centrifugados a 7000rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado com pipetagem de 1ml com ponteiras com barreira. O precipitado então teve seu RNA total extraído utilizando-se o reagente Stat-60®, segundo protocolo descrito pelo fabricante (Anexo A), com pequenas modificações (BARROS, 2014). Resumidamente, os tubos contendo as amostras clínicas e 500µl de RNA later foram centrifugados a 7000rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 25 ou 50µl de água DEPC tratada (água ultra-pura, tratada com o inativador de RNases, dietilpirocarbonato). Foi acrescentado 80µl de RNA STAT-60 e 20µl de clorofórmio. A suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Transferido sobrenadante para microtubo de 1,5ml. Foi então acrescentado à solução 600µl de Isopropanol. A suspensão então foi centrifugada a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado, preservando o *pellet* de RNA ao qual foi inserido volume de 1ml de Ethanol 70%. Mantido a -80° C por 12 horas. Após foi centrifugado a velocidade de 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após descarte do etanol o *pellet* foi secado a vácuo por aproximadamente 60 minutos sendo então dissolvido em 60µl de água DEPC tratada.

Uma alíquota de 2µl utilizada para quantificação no espectrofotômetro da marca *GeneQuant* (GE Healthcare, Uk) em OD = 260 nm. Alíquotas de amostras de RNA total foram em seguida, tratadas com *Dnase I* (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, California, USA) para eliminação de traços de DNA genômico, extraídas com fenol, precipitadas com isopropanol e o *pellet* de RNA DNase tratado foi lavado com etanol e ressuspenso em água DEPC. Após o tratamento com *DNase*, as alíquotas foram quantificadas novamente a 260nm para posterior utilização na RT-qPCR.

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

Os *primers* (Tabela 1) foram desenhados e analisados no software BLAST-nt, exclusivamente para este estudo e selecionados para a detecção da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* através de RT-qPCR.

Tabela 1 – Características dos Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) selecionados e tamanho do produto (pb) para a detecção da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* através de RT- qPCR, Campo Grande –MS, 2020.

| <i>Primer</i>                                     | <b>Microorganismo</b>           | <b>Tamanho do produto (pb)</b> |
|---|---------------------------------|--------------------------------|
| ECOFOR = 5'- CAT CAG ATG GAG CCG GGC ATG CCA – 3' | <i>Escherichia coli</i>         | 98                             |
| ECOREV = 5'- GAG AAT TAC TCG TCT TCC AGT TCG – 3' |                                 |                                |
| SAGAFOR = 5'- TTG CAG CCA GTT GAA GAT CGT TAT-3'  | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 90                             |
| SAGAREV = 5'- TAA TTC CAT AAA TCG CTT TGT ATC-3'  |                                 |                                |
| SAUFOR = 5'- GAG GTA TTA GTG ATA TCG ATT TAA -3'  | <i>Staphylococcus aureus</i>    | 139                            |
| SAUREV2=5'-ATG CCT GCT TTC AAA TCG ACA ACT C-3'   |                                 |                                |

pb: pares de base

Resumidamente, iniciadores de oligonucleotídios foram selecionados para amplificação de um fragmento de 139 pb do *MHC class II analog protein* do *S. aureus* (SAUFOR: 5'- GAG GTA TTA GTG ATA TCG ATT TAA - 3'; SAUREV2: 5'- ATG CCT GCT TTC AAA TCG ACA ACT C - 3'), 90 pb do *peptide chain release factor 1* do *S. agalactiae* (SAGAFOR: 5'- TTG CAG CCA GTT GAA GAT CGT TAT - 3'; SAGAREV: 5'- TAA TTC CAT AAA TCG CTT TGT ATC - 3') e 98 pb do gene *RpoB (RNA polymerase beta subunit)* de *E. coli* (ECOFOR: 5'- CAT CAG ATG GAG CCG GGC ATG CCA - 3' ; SAGAREV: 5'- GAG AAT TAC TCG TCT TCC AGT TCG - 3').

Sempre que necessário novos *primers* foram sintetizados e liofilizados pela *Integrated DNA Technologies (IDT)*.

Para utilização os *primers* foram dissolvidos em Água estéril-filtrada para uma concentração final de 10 pmol/ $\mu$ l (solução de uso). Como gene normalizador para o qPCR, utilizou-se o S26 padrão para amostras de sangue humano (NASCIMENTO, 2014).

#### 4.4.6 Transcrição Reversa (RT)

A RT para síntese de sscDNA (DNA complementar de fita simples) foi realizada a partir de ~250ng de RNA total em volume final de reação de 29 $\mu$ l por amostra, de acordo com protocolo descrito por Barros *et al.* (2014). Resumidamente, 250ng de RNA foram pré-incubados a 70°C por 10 minutos com 10 pmol de cada *primer* reverso, específico para os genes alvos em estudo, seguido de armazenamento em gelo por 10 minutos. Em seguida acrescentados 4 $\mu$ l de tampão de reação 5x e 2 $\mu$ l de dNTP mix (10 mM de cada). Incubada solução a 37°C por 2 minutos. Adicionado 2 $\mu$ l do mix de enzima transcriptase reversa (40 U) em tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) sendo incubado a 45°C por 1 hora. A solução foi finalizada e imediatamente utilizada na qPCR. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen® (SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR).

#### 4.4.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real e quantificação relativa (qPCR)

Para a reação de PCR em tempo real foram utilizados o kit *SYBR Green PCR core Reagents* (PE Biosystems) e o aparelho QuantStudio 6 Flex Real-Time System (Applied Biosystems). O protocolo utilizado para qPCR foi o desenvolvido pelo Núcleo de Fisiologia e Genômica Funcional (NUFIGEN) da Universidade Federal de

Minas Gerais (UFMG) e descrito por Reis (2013), para a realização das reações. Resumidamente, o primer mix (1,5pmol cada), 10ng de cDNA das amostras e 20µl de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) foram combinados e executados sob condições padrão no QuantStudio 6 Flex Real-Time System, como determinado pelo kit. Todas as amostras humanas foram analisadas em duplicada e as amostras para curva padrão analisadas em quadruplicatas.

Para a quantificação relativa foi realizada uma análise comparativa da expressão dos transcritos dos genes-alvo com o controle endógeno, utilizando-se o método CT comparativo, onde o controle endógeno foi utilizado para normalizar a expressão dos genes-alvo de cada bactéria, bem como o controle endógeno gene S26 ribossomal humano (média do CT gene-alvo – média do CT controle endógeno) gerando o  $\Delta$ CT. Utilizando-se o  $\Delta$ CT calculou-se o  $\Delta\Delta$ CT ( $\Delta$ CT amostra –  $\Delta$ CT do calibrador (amostra de referência)). Ao final, foi aplicada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta$ CT para chegarmos aos níveis relativos de expressão (*fold change in gene expression*) de cada gene-alvo (PFAFFL, 2001).

#### 4.5 RECRUTAMENTO E COLETA DOS DADOS

Após e durante a internação dos recém-nascidos elegíveis, as mães ou responsáveis foram esclarecidos como descrito anteriormente no item 4.1 (Apêndice A). A coleta de dados do recém-nascido foi realizada através de preenchimento de formulário padronizado (Apêndice B), utilizando informações obtidas através de entrevista com a mãe e análise das informações contidas no prontuário do paciente durante sua internação na unidade.

## 4.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

As variáveis relativas às características maternas, assistenciais e clínico-epidemiológicas dos recém-nascidos, bem como os resultados das hemoculturas e do RT-qPCR foram apresentadas em figuras e tabelas, no formato descritivo.

Para o cálculo do Índice de Concordância foi utilizada a seguinte fórmula:  
$$\text{Concordâncias} / (\text{Concordâncias} + \text{Discordâncias}) \times 100$$

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, DEMOGRÁFICAS E ANTROPOMÉTRICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

No presente trabalho foram avaliados 20 recém-nascidos com diagnóstico inicial de sepse, de ambos os sexos. Na Tabela 2 encontram-se descritas de forma resumida, as principais características clínicas, demográficas e antropométricas dos pacientes. A maioria (12 pacientes) foi do sexo masculino, com uma mediana de peso de 1667g (695 a 3885g) e a mediana Idade Gestacional de 33 semanas (de 25 a 40 semanas).

Tabela 2 – Características demográficas da população estudada no Hospital Santa Casa, em Campo Grande – MS, 2020.

| ID Paciente | Sexo      | Idade Gestacional (semanas) | Peso de Nascimento (g) | Tipo de Parto | Apgar |
|-------------|-----------|-----------------------------|------------------------|---------------|-------|
| 01          | Feminino  | 33.3                        | 1500                   | Vaginal       | 7/8   |
| 02          | Feminino  | 35                          | 2540                   | Cesárea       | 7/8   |
| 03          | Feminino  | 40                          | 3720                   | Vaginal       | 9/10  |
| 04          | Feminino  | 32                          | 1440                   | Cesárea       | 5/8   |
| 05          | Masculino | 40                          | 3885                   | Vaginal       | 3/7   |
| 06          | Masculino | 36.1                        | 3250                   | Cesárea       | 8/9   |
| 07          | Feminino  | 27.3                        | 940                    | Cesárea       | 8/8   |
| 08          | Masculino | 33.6                        | 2107                   | Cesárea       | 7/8   |
| 09          | Masculino | 40                          | 3570                   | Cesárea       | 8/9   |
| 10          | Feminino  | 39                          | 3705                   | Cesárea       | 9/10  |
| 11          | Masculino | 39.8                        | 2930                   | Cesárea       | 8/9   |
| 12          | Masculino | 26                          | 980                    | Vaginal       | 6/7   |
| 13          | Masculino | 24.8                        | 780                    | Vaginal       | 6/9   |
| 14          | Feminino  | 30                          | 990                    | Vaginal       | 7/9   |
| 15          | Masculino | 32.8                        | 1700                   | Vaginal       | 7/9   |
| 16          | Masculino | 33                          | 1635                   | Cesárea       | 8/9   |
| 17          | Feminino  | 27                          | 695                    | Vaginal       | 9/9   |
| 18          | Masculino | 25                          | 820                    | Cesárea       | 6/9   |
| 19          | Masculino | 40.4                        | 3850                   | Cesárea       | 9/9   |
| 20          | Masculino | 31.4                        | 1590                   | Vaginal       | 8/9   |

(ID) Identificação; (g) gramas

Na Tabela 3 abaixo pode-se observar os fatores de risco materno, uso de antibiótico anteparto por parte das mães e os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes.

Tabela 3 – Uso de Antibióticos Materno Anteparto, Fatores de Risco Materno e Sinais e Sintomas na população estudada, em Campo Grande – MS, 2020.

| <b>ID Paciente</b> | <b>Uso de Antibióticos Anteparto</b> | <b>Fatores de Risco Maternos</b> | <b>Sinais/Sintomas</b>  |
|--------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---|
| 01                 | SIM                                  | BR, ITU                          | Apneia, Dificuldade Para Respirar, Cianose                      |
| 02                 | NÃO                                  | BR                               | Dificuldade Para Respirar, Cianose                              |
| 03                 | NÃO                                  | ITU                              | Dificuldade Para Respirar, Cianose, Vômito, Resíduo Gástrico    |
| 04                 | SIM                                  | BR, ITU                          | Dificuldade Para Respirar, Cianose                              |
| 05                 | NÃO                                  | ITU                              | Dificuldade Para Respirar, Cianose, Hipotonia                   |
| 06                 | SIM                                  | ITU                              | Dificuldade Para Respirar, Cianose, Hipoglicemia                |
| 07                 | SIM                                  | ITU                              | Dificuldade Para Respirar, Cianose                              |
| 08                 | SIM                                  | NÃO                              | Dificuldade Para Respirar, Cianose                              |
| 09                 | SIM                                  | ITU                              | Apneia, Dificuldade Para Respirar, Cianose                      |
| 10                 | NÃO                                  | NÃO                              | Dificuldade Para Respirar, Cianose, Resíduo Gástrico            |
| 11                 | SIM                                  | ITU                              | Apnéia, Dificuldade Para Respirar, Cianose                      |
| 12                 | SIM                                  | ITU                              | Dificuldade Para Respirar, Cianose                              |
| 13                 | SIM                                  | BR                               | Dificuldade Para Respirar, Cianose, Hopotonia                   |
| 14                 | SIM                                  | BR                               | Dificuldade Para Respirar, Cianose                              |
| 15                 | SIM                                  | BR                               | Dificuldade Para Respirar, Cianose                              |
| 16                 | SIM                                  | ITU                              | Dificuldade Para Respirar, Cianose                              |
| 17                 | SIM                                  | ITU                              | Apneia, Dificuldade Para Respirar, Cianose                      |
| 18                 | SIM                                  | CORIO                            | Apneia, Dificuldade Para Respirar, Cianose                      |
| 19                 | NÃO                                  | ITU                              | Dificuldade Para Respirar, Cianose, Letargia                    |
| 20                 | SIM                                  | BR                               | Apnéia, Dificuldade Para Respirar, Vômito, Intolerância À Dieta |

ID: Identificação; BR: Bolsa Rota; ITU: Infecção do Trato Urinário, CORIO: Corioamnionite

## 5.2 RESULTADOS DA RT-qPCR PARA AS AMOSTRAS PADRÕES

O RNA total obtido de cada amostra foi quantificado por espectrofotometria. As leituras de densidade óptica (OD) nos comprimentos de ondas de 260 nm para ácido nucleico e 280 nm para contaminantes proteicos, bem como sua relação,

demonstrando uma razão próxima ou maior do que 1,8 nas amostras, demonstrou que a qualidade do RNA obtido deu-se segundo as exigências vigentes para biologia molecular. A quantidade total de RNA por amostra dos extratos de bactérias variou de ~10 a 50 ng/ $\mu$ L e nas amostras clínicas de ~10 a 300 ng/ $\mu$ L (ver Anexo B). As amostras foram consideradas viáveis para a etapa seguinte de transcrição reversa e qPCR.

Foram testadas diferentes temperaturas para a RT, com o objetivo de desfazer as possíveis formações de alças de estruturas secundárias na região alvo escolhida, e, portanto, otimizar a reação. A reação de transcrição reversa foi otimizada a 45°C. Foi utilizado 1,0  $\mu$ g de RNA total para cada reação/amostra padrão.

Os resultados das curvas de amplificação da RT-qPCR, a partir de RNA dos microrganismos padrões, através de diluições seriadas são apresentadas nas Figuras 1, 2 e 3. Curvas padrões foram utilizadas para futuras quantificações e para verificação da faixa de amplificação na determinação da viabilidade das bactérias nas amostras testadas. As amostras padrões foram testadas em quadruplicatas para as curvas de calibração. Na Figura 4 observa-se as curvas de dissociação (*melting* – Tm) para os *amplicons* específicos de cada gene dos microrganismos alvos obtidos pela RT-qPCR.

Figura 1 – Curvas de amplificação para o *amplicom* alvo do gene *peptide chain release factor 1* do *Streptococcus agalactiae* obtidos pela RT-qPCR. A figura superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e a inferior as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primer* selecionado.

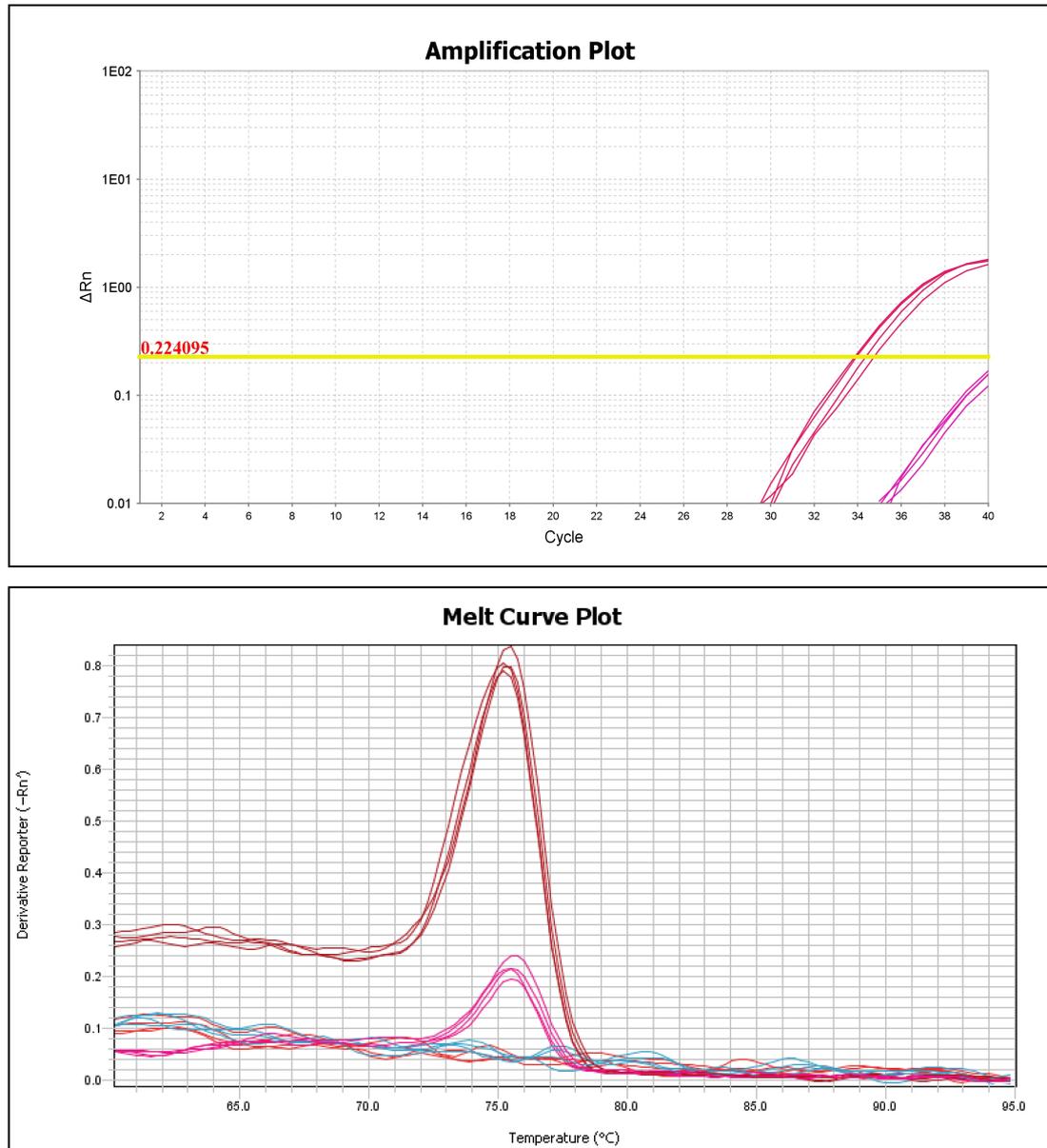


Figura 2 – Curvas de amplificação para o *amplicom* alvo do gene *RpoB* (*RNA polymerase beta subunit*) da *Escherichia coli*, obtidos pela RT-qPCR. A figura superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e a inferior as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primer* selecionado.

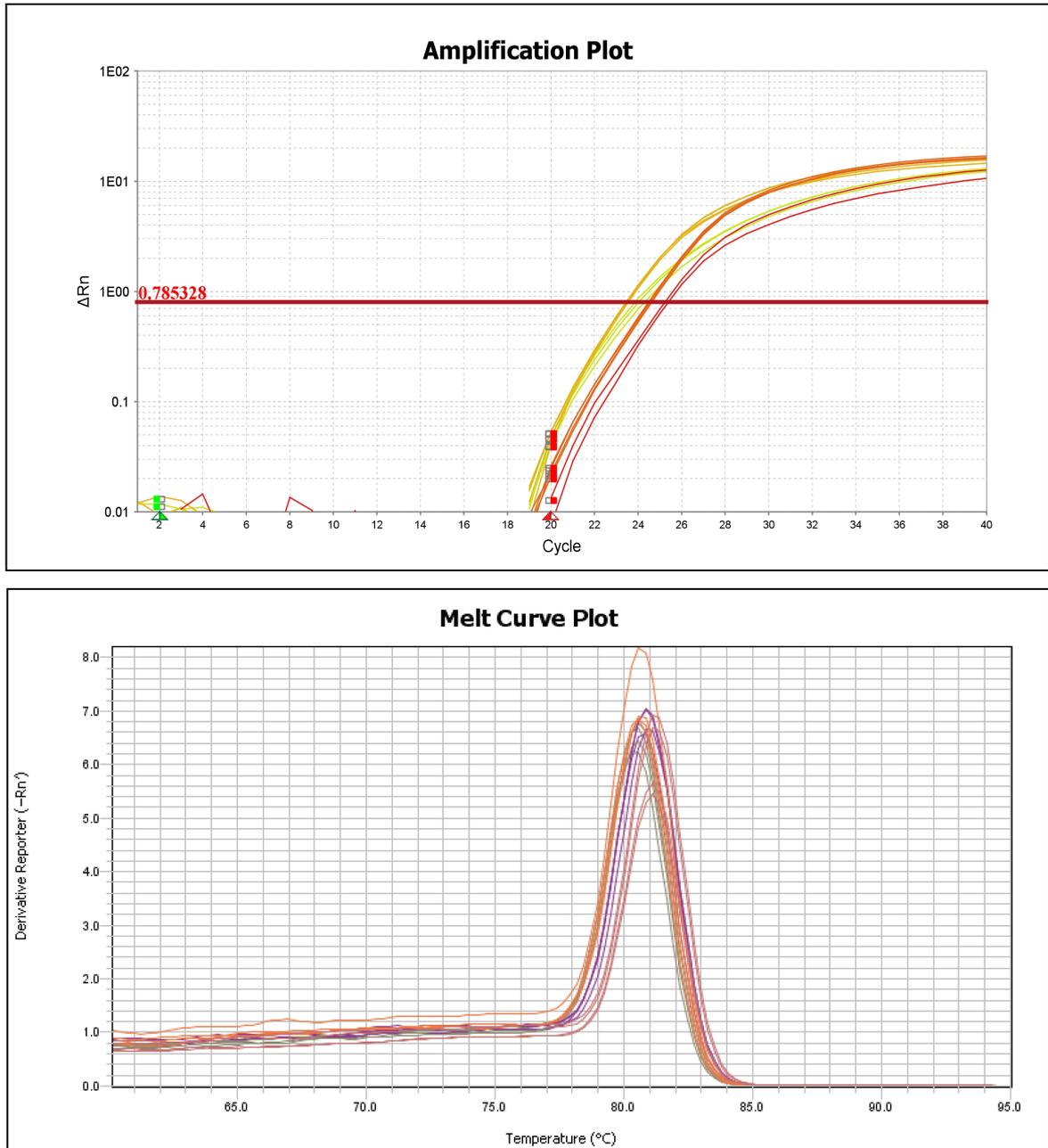


Figura 3 – Curvas de amplificação para o *amplicom* alvo do gene *MHC class II analog protein* do *Staphylococcus aureus*, obtidos pela RT-qPCR. A figura superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e a inferior as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade do *primer* selecionado. do *S. aureus*.

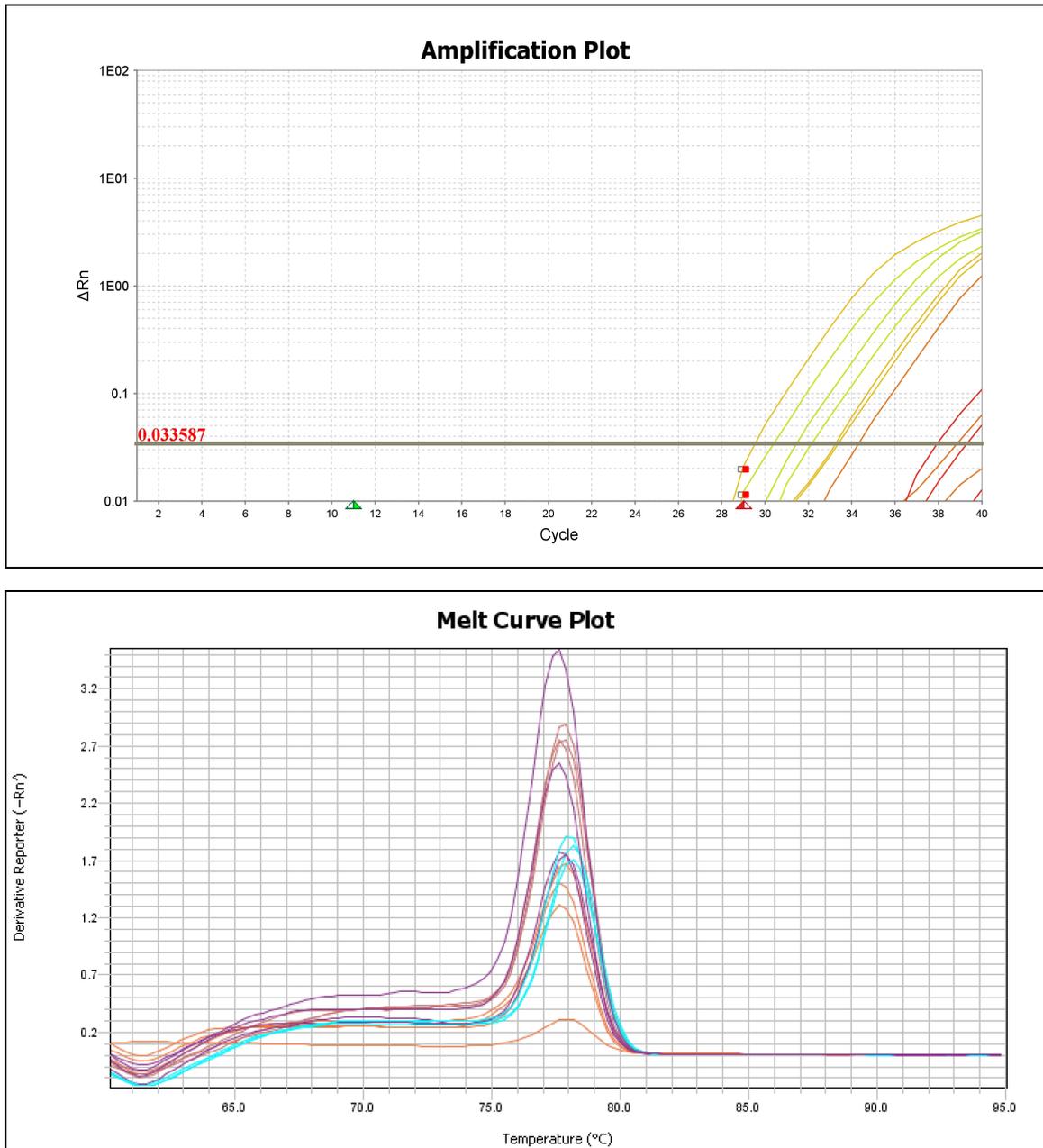
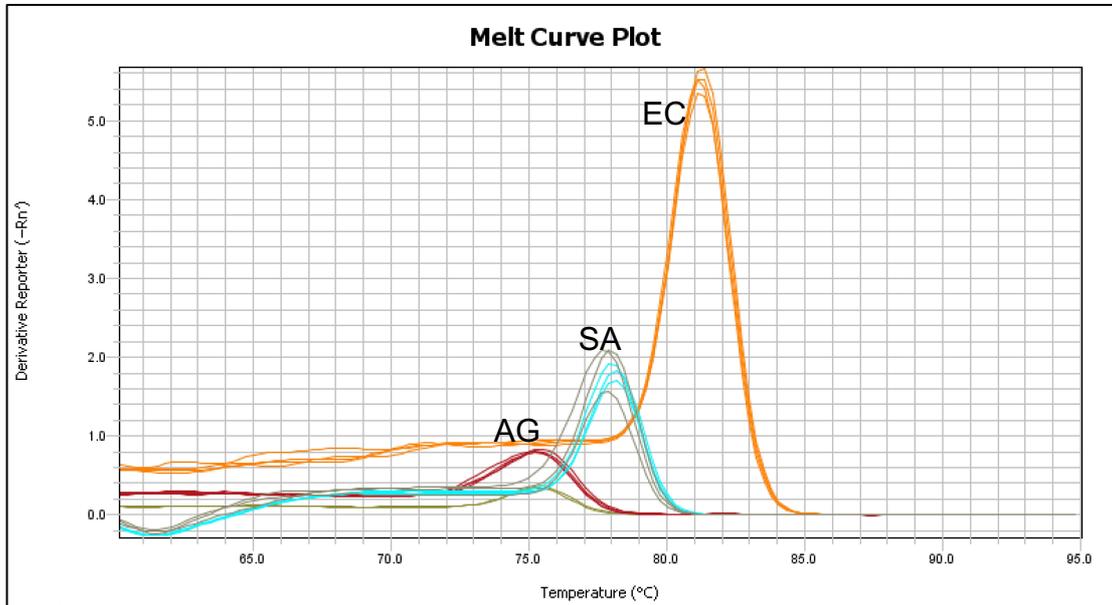


Figura 4 – Curvas de Dissociação para os amplicons específicos alvos dos mRNAs das três bactérias pesquisadas, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, obtidos pela RT-qPCR.



SA: 139 pb do *MHC class II analog protein* do *S. aureus*; AG: 90 pb do *peptide chain release factor 1* do *S. agalactiae*; EC: 98 pb do gene *RpoB* (*RNA polymerase beta subunit*) de *E. coli*.

### 5.3 RESULTADOS DA RT-qPCR PARA AS AMOSTRAS DOS PACIENTES

Na Tabela 4 são apresentados resumidamente a descrição da evolução clínica dos pacientes, resultados das hemoculturas e os resultados da quantificação relativa das expressões gênicas das bactérias pesquisadas, obtida por RT-qPCR.

As amostras de sangue dos pacientes foram testadas para a presença de RNA genômico dos microrganismos bacterianos selecionados através dos *primers* específicos, em um RT qPCR, sendo demonstrada positividade para as bactérias pesquisadas, em 50% das amostras (10 pacientes; a amostra 13 não apresentou material viável para ser analisada).

A amplificação dos fragmentos alvos nas amostras positivas demonstrando a especificidade dos *primers* selecionados, pelas curvas de amplificação e de dissociação podem ser observados nas Figuras 5, 6 e 7. Também pode-se observar os gráficos de quantificação relativa para cada bactéria pesquisada nas amostras positivas nas Figuras 8, 9 e 10.

Como normalizador foi utilizado o gene S26 (Figura 11).

A análise do CT foi baseada nos seguintes valores de *threshold*: para S26 o valor foi 0,024 e para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* o valor foi de 0,04.

Tabela 4 – Evolução clínica, diagnóstico neonatal final, resultado das hemoculturas e do RT-qPCR na população estudada, em Campo Grande – MS, 2020.

| ID Paciente | Diagnóstico      | HMC                | RT-qPCR <i>S. aureus</i> | RT-qPCR <i>S. agalactiae</i> | RT-qPCR <i>E. coli</i> |
|-------------|------------------|--------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|
| 01          | SDR              | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 02          | Pneumonia        | Negativa           | Negativo                 | Positivo                     | Negativo               |
| 03          | Pneumonia        | Negativa           | Positivo                 | Positivo                     | Positivo               |
| 04          | SDR              | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 05          | Sepse Clínica    | Negativa           | Positivo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 06          | Choque Séptico   | Negativa           | Positivo                 | Positivo                     | Positivo               |
| 07          | Sepse Clínica    | Negativa           | Positivo                 | Negativo                     | Positivo               |
| 08          | TTRN             | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 09          | Sepse Clínica    | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Positivo               |
| 10          | Meningite        | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Positivo               |
| 11          | TTRN             | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 12          | Choque Séptico   | <i>E. faecalis</i> | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 13          | SDR              | Negativa           | #                        | #                            | #                      |
| 14          | Sepse Confirmada | <i>S. aureus</i>   | Positivo                 | Positivo                     | Negativo               |
| 15          | SDR              | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 16          | SDR              | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 17          | SDR              | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 18          | SDR              | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 19          | TTRN             | Negativa           | Negativo                 | Negativo                     | Negativo               |
| 20          | Sepse Clínica    | Negativa           | Positivo                 | Positivo                     | Negativo               |

ID: Identificação; SDR: Síndrome do Desconforto Respiratório, TTRN: Taquipneia Transitória do Recém-Nascido, HMC: Hemocultura, #: Amostra insuficiente.

Figura 5 – Curvas de amplificação das amostras clínicas que apresentaram positividade para *Streptococcus agalactiae* obtidas pela RT-qPCR. O gráfico superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e o inferior as respectivas curvas de dissociação.

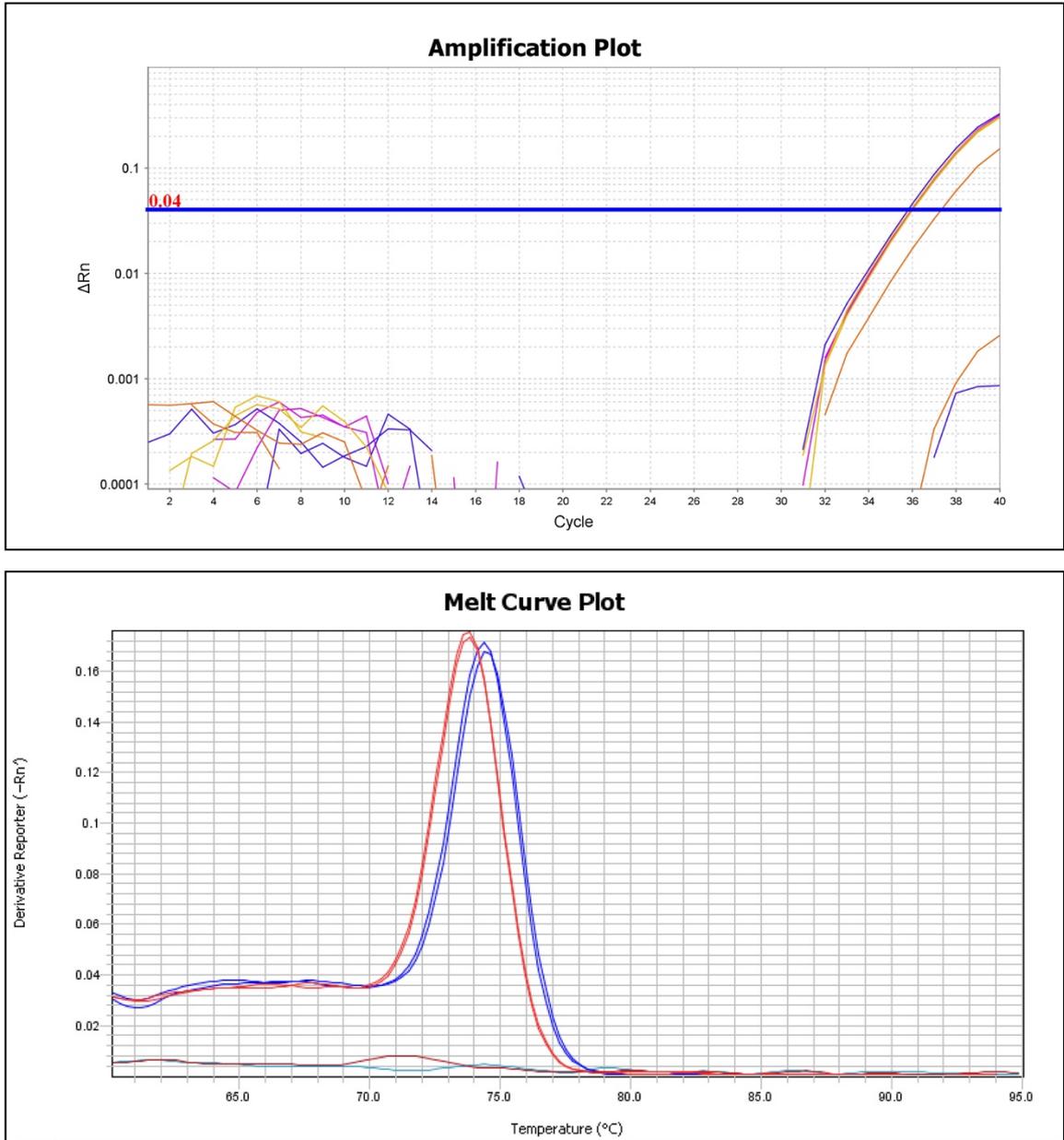


Figura 6 – Curvas de amplificação das amostras clínicas que apresentaram positividade para *Escherichia coli* obtidas pela RT-qPCR. O gráfico superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e o inferior as respectivas curvas de dissociação.

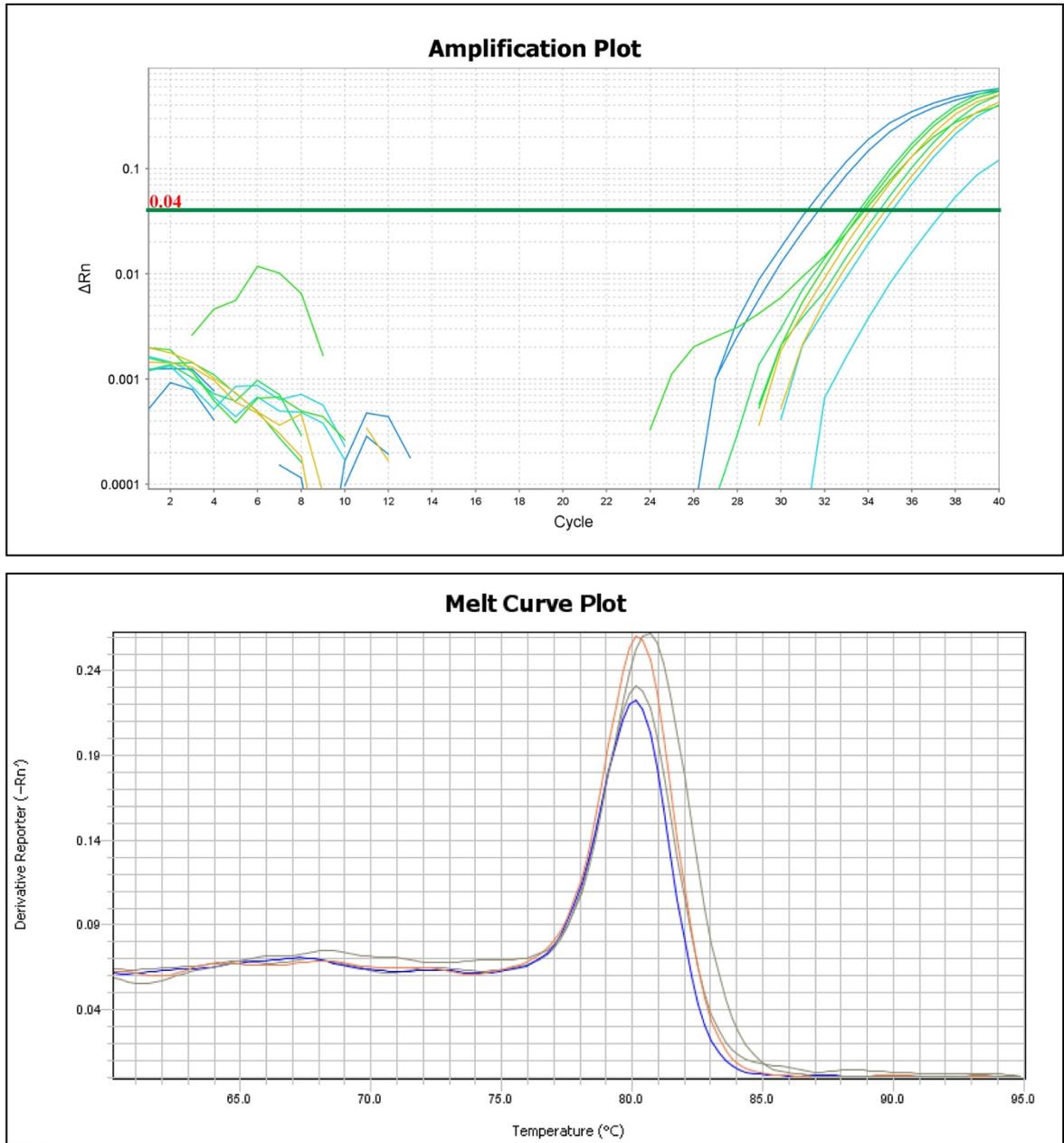


Figura 7 – Curvas de amplificação das amostras clínicas que apresentaram positividade para *Staphylococcus aureus* obtidas pela RT-qPCR. O gráfico superior representa as curvas de amplificação dos fragmentos alvo e o inferior as respectivas curvas de dissociação.

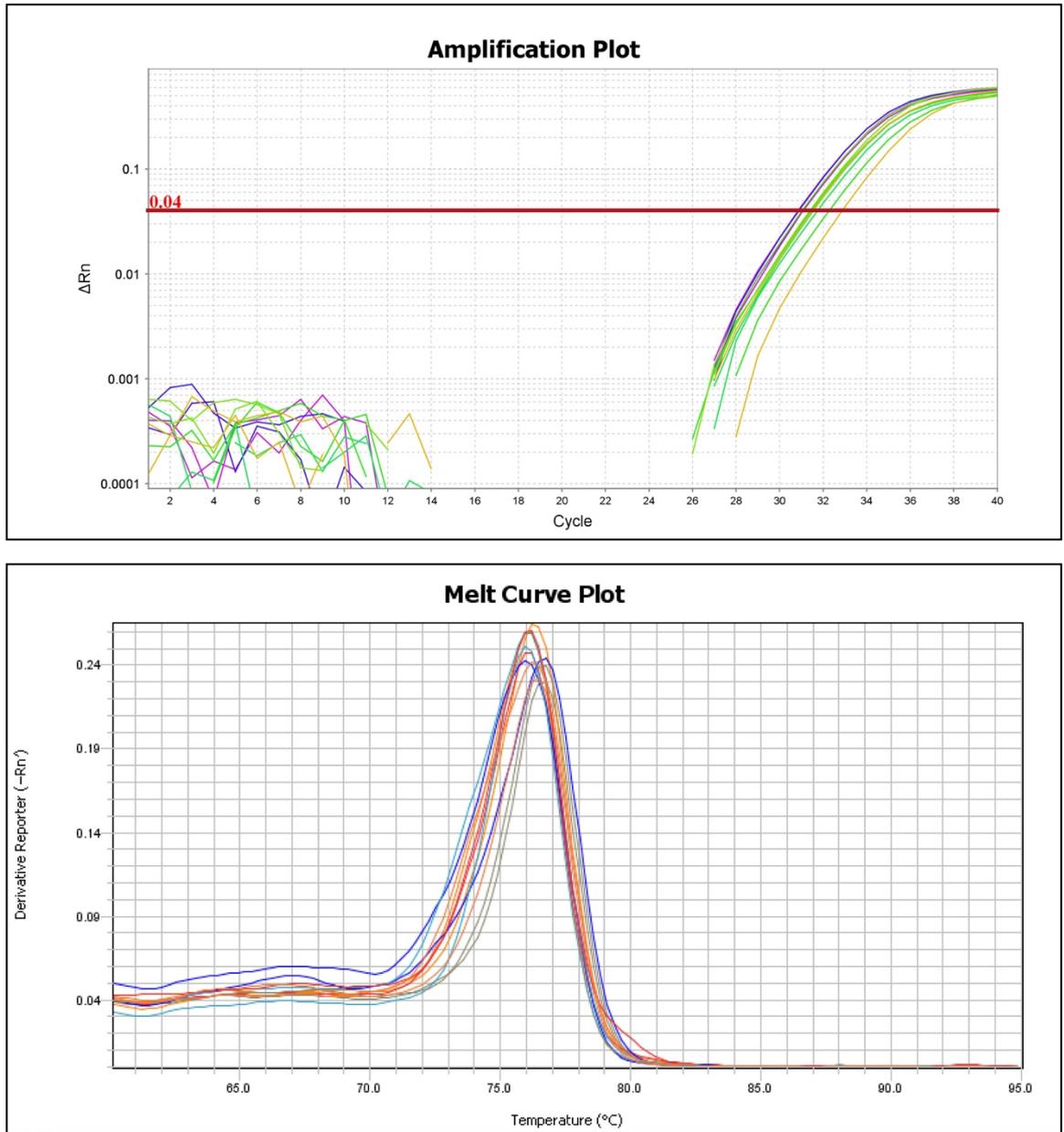


Figura 8 – Resultados da quantificação relativa das amostras clínicas positivas para *Streptococcus agalactiae* obtidos pela RT-qPCR.

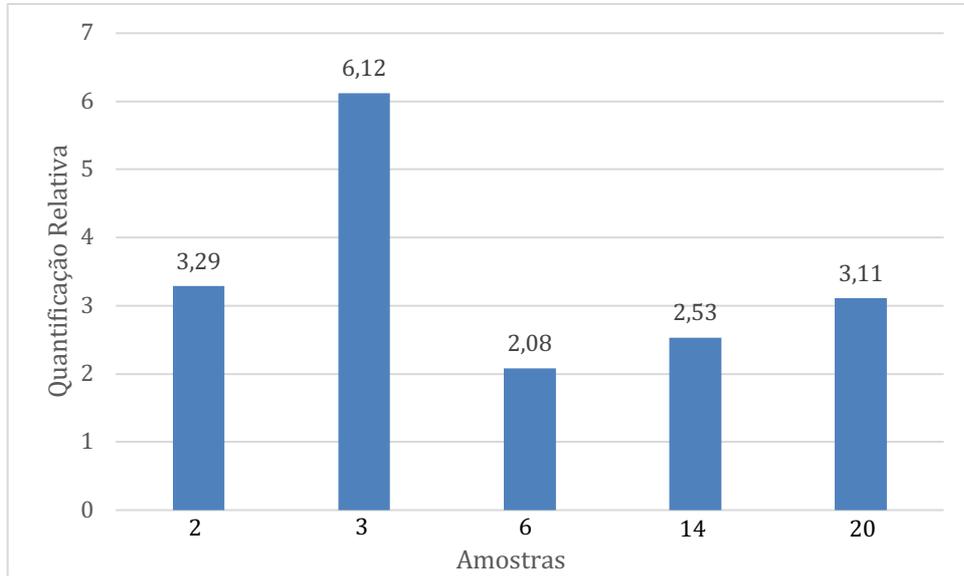


Figura 9 – Resultados da quantificação relativa das amostras clínicas positivas para *Escherichia coli* obtidos pela RT-qPCR.

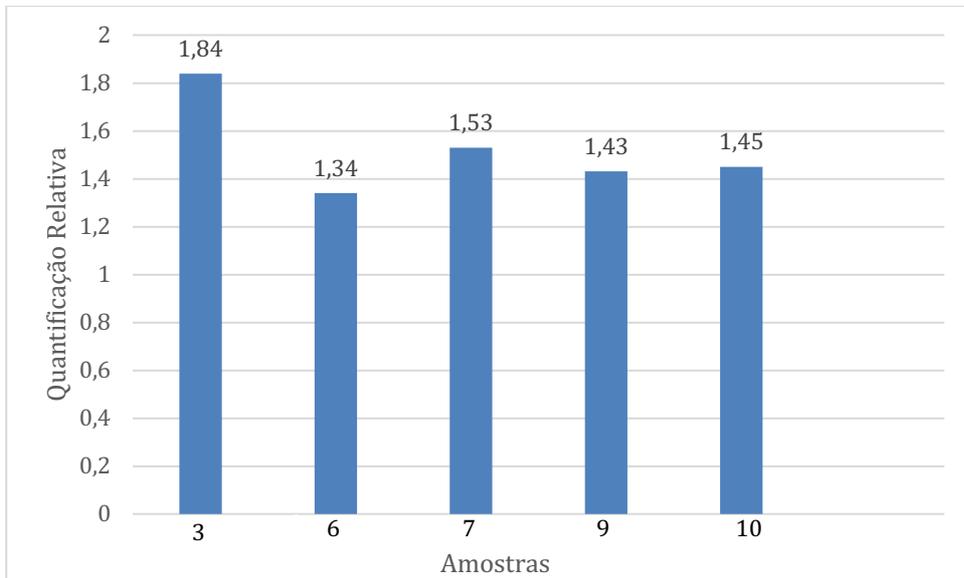


Figura 10 – Resultados da quantificação relativa das amostras clínicas positivas para *Staphylococcus aureus* obtidos pela RT-qPCR.

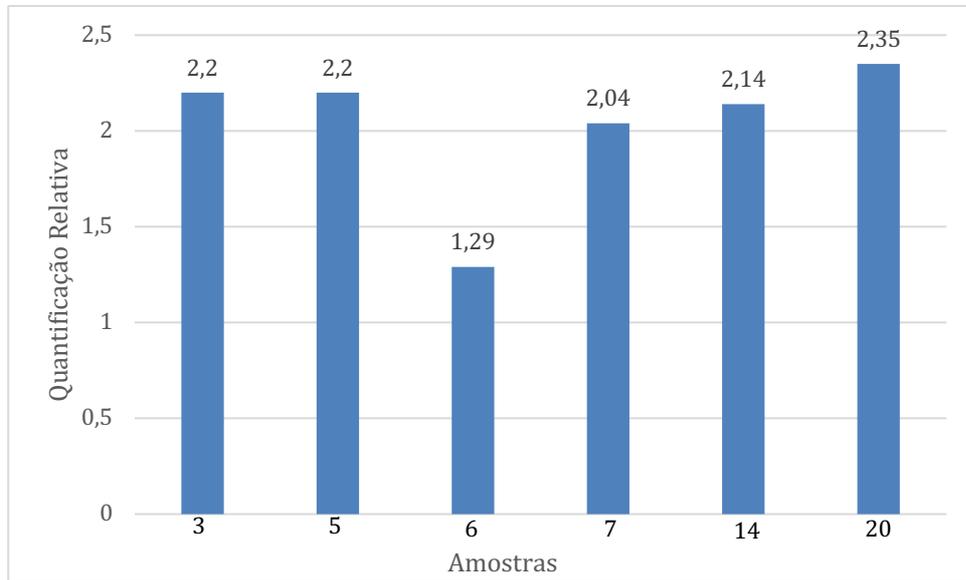
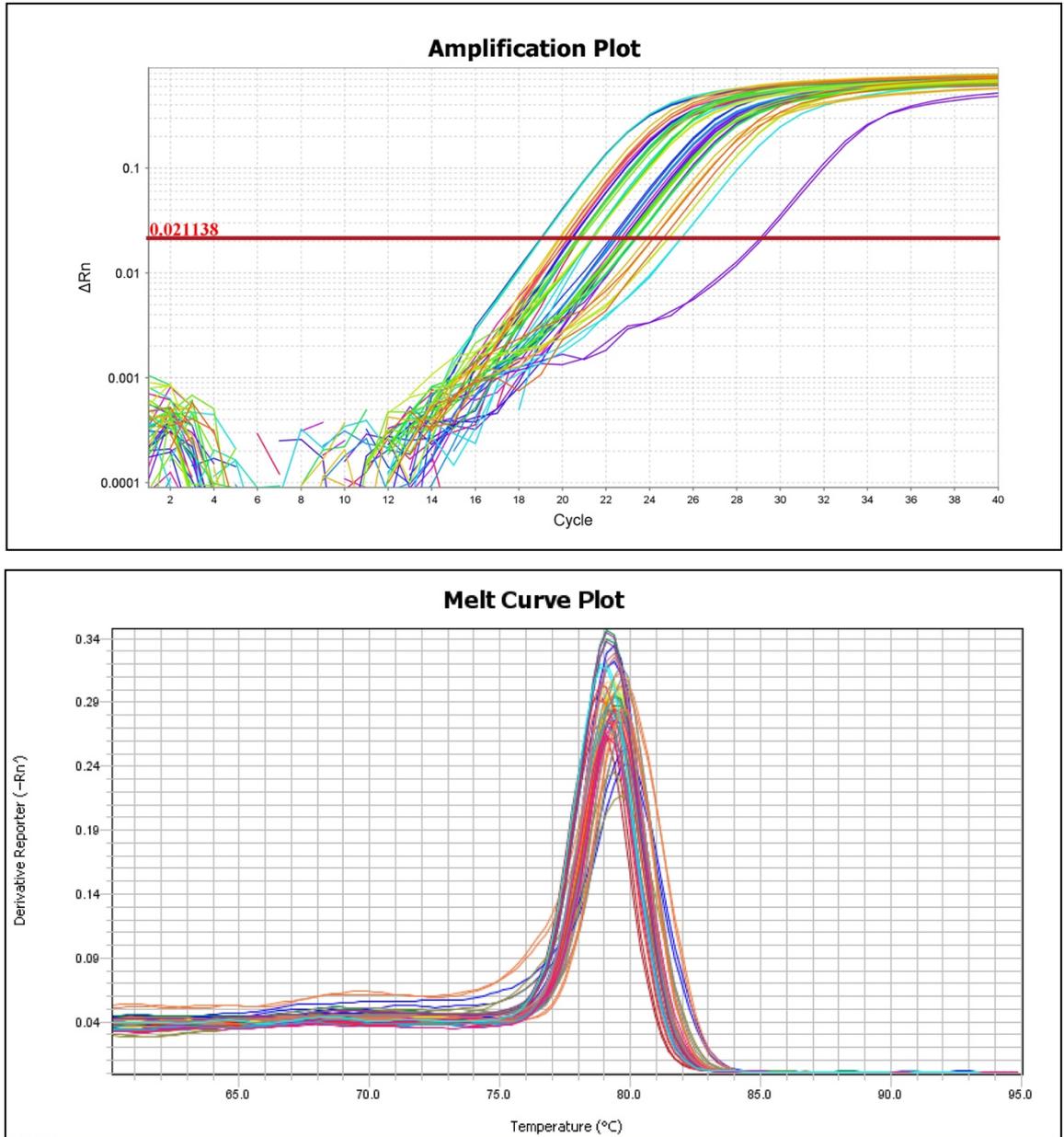


Figura 11 – Curvas de amplificação para o amplicon de 75 pb do gene humano S26 padrão, utilizado como normalizador da RT-qPCR para as amostras de sangue humano. As respectivas curvas de amplificação (gráfico superior) e dissociação (gráfico inferior) são mostradas abaixo.



A comparação dos resultados do RT-qPCR e a evolução clínica dos pacientes são apresentados na Tabela 5, bem como seus Índices de Concordância. Os dados mostram um índice de concordância geral de 97,3% entre evolução clínica e a técnica RT-qPCR, sendo um índice de 94,7% entre evolução clínica de infecção e o RT-qPCR positivo e de 100% entre evolução clínica sem infecção e RT-qPCR negativo.

Tabela 5 – Comparação dos resultados entre RT-qPCR e evolução clínica na população estudada e Índice de Concordância, em Campo Grande – MS, 2020.

| <b>Evolução Clínica</b> | <b>RT-qPCR Positivo</b> | <b>RT-qPCR Negativo</b> | <b>Índice de Concordância (%)</b> |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Infecção                | 9                       | 1                       | 94,7                              |
| Sem infecção            | 0                       | 9                       | 100                               |
| <b>Total</b>            | <b>9</b>                | <b>10</b>               | <b>97,3</b>                       |

Índice de Concordância:  $\text{Concordâncias} / (\text{Concordâncias} + \text{Discordâncias}) \times 100$

## 6 DISCUSSÃO

A avaliação e tratamento de um neonato por possível infecção é uma das práticas clínicas mais comuns nas unidades neonatais em todo mundo (GERDES, 2004). A sepse neonatal precoce é uma causa substancial de mortalidade e morbidade, principalmente em países em desenvolvimento, sendo difícil de ser diagnosticada devido a seus sinais e sintomas, que costumam ser inespecíficos e podem minimizar outras patologias neonatais (AL-ZAHRANI *et al.*, 2015; SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017; SHAH; PADBURY, 2014).

A hemocultura tem sido reconhecida, ainda atualmente, como padrão-ouro para diagnóstico de infecção e sepse (TAM; BENDEL, 2017), porém resultados positivos, com bactérias isoladas, ocorrem em apenas 4 a 12% das culturas sanguíneas processadas. Mais de 60% dos neonatos são avaliados laboratorialmente para a presença de sepse nos primeiros 3 dias de vida, sendo que menos de 1% das culturas sanguíneas solicitadas nestes pacientes são capazes de detectar um microrganismo. Além disso, fato de que as culturas sanguíneas levam até 5 dias para demonstrar o crescimento de um microrganismo em níveis detectáveis, com tempo adicional de 24 a 48h para determinar a suscetibilidade antibiótica, tornam sua utilidade no processo de racionalização terapêutica muito difícil (SINHA *et al.*, 2018).

Com relação a sintomatologia, observou-se que a totalidade dos recém-nascidos apresentou sinais clínicos como disfunção respiratória ou cianose. De acordo com Russel (2011) e Simonsen *et al.* (2014), os sintomas mais comuns como apresentação clínica da SNP são os relacionados ao sistema respiratório, incluindo apnéia, cianose, gemência, batimento de asa nasal e retrações intercostais.

Neste trabalho, dos vinte pacientes com suspeita inicial de sepse clínica, apenas dois daqueles que tiveram evolução clínica compatível com infecção apresentaram hemocultura positiva (uma para *Enterococcus faecalis* e outra para *Staphylococcus aureus*). As possíveis razões para a baixa sensibilidade da cultura sanguínea em neonatos estão relacionadas com o baixo número de bactérias na circulação (abaixo de 10 UFC/ml em cerca de 50% dos neonatos), com os baixos volumes de sangue obtidos nos neonatos para cultura e com a prática crescente de promover profilaxia antibiótica intraparto para gestantes e neonatos de alto risco,

que neste trabalho ocorreu em 75% das gestantes (ESPARCIA *et al.*, 2010; FUJIMORI *et al.*, 2010).

Embora as culturas sanguíneas sejam usualmente a base para o diagnóstico de sepse, os resultados usualmente são sabidos após vários dias e a sensibilidade é particularmente baixa em recém-nascidos, como já exposto e observado neste estudo (FUJIMORI *et al.*, 2010). Desta maneira, o uso empírico de agentes antimicrobianos de amplo espectro é extremamente comum e está associado com aumento das taxas de resistência bacteriana e distúrbios da microbiota intestinal do recém-nascido, além de aumento do risco de enterocolite necrosante e morte, principalmente entre os prematuros de extremo baixo peso (COTTEN *et al.*, 2009). Por estes motivos, o desenvolvimento de técnicas de detecção bacteriana que auxiliem as hemoculturas em oferecer resultados mais rápidos e sensíveis são bastante aguardados nas unidades neonatais com principal objetivo de otimizar o uso de agentes antimicrobianos (FUJIMORI *et al.*, 2010).

Dado que o diagnóstico clínico de infecção em um neonato não é seguro e que a terapia antimicrobiana empírica utilizada na suspeita de sepse pode promover a resistência bacteriana, há uma grande necessidade de um teste diagnóstico acurado e sensível para confirmar o diagnóstico da sepse neonatal precoce (TAM; BENDEL, 2017). A inabilidade de isolar o patógeno bacteriano não exclui sepse, e na maioria das publicações de países desenvolvidos, as informações relacionadas a sepse precoce somente incluem casos confirmados por cultura. Entretanto, a enorme maioria dos neonatos tratados com antibióticos por sepse clínica com hemocultura negativa são largamente ignorados nos estudos epidemiológicos, contribuindo assim também para as altas taxas de consumo de antibióticos nas unidades neonatais (KLINGENBERG *et al.*, 2018).

Vários estudos têm investigado diferentes métodos moleculares para o diagnóstico de sepse neonatal já que apresentam uma grande sensibilidade e a capacidade de detecção rápida de patógenos (TZIALLA *et al.*, 2018). As vantagens do diagnóstico molecular incluem o uso de baixo volume de sangue, a produção de resultados dentro de um curto período de tempo, a habilidade de detectar uma baixa concentração de bactérias (MIGLIOLI, 2009) e a menor probabilidade de que a terapia antimicrobiana prévia influencie o resultado, além de possuir caracteristicamente alta sensibilidade e especificidade, de 90 e 96%, respectivamente (FUJIMORI *et al.*, 2010; PAMMI *et al.*, 2011), o que pode ajudar a

otimizar o tratamento. Técnicas de PCR tem se tornado cada vez mais úteis na redução do tempo de diagnóstico, levando a resultados para o clínico em estágios mais precoces da doença.

Embora as técnicas de biologia molecular para detecção de patógenos sejam preferidas às culturas em termos de rapidez e acurácia e tenham apresentado excelentes resultados nos últimos anos, técnicas como o qPCR ainda tem algumas limitações, sendo a principal, o fato de que este método não é capaz de diferenciar bactérias vivas de mortas, ou infecções recentes de antigas, já que a presença de DNA bacteriano sozinho pode não estar correlacionado com viabilidade bacteriana, podendo carrear assim um resultado falso positivo (MOLAEE *et al.*, 2015).

Estudos prospectivos que utilizaram o PCR para o diagnóstico de sepse neonatal demonstraram que apesar da grande sensibilidade e rápida detecção de patógenos, persistiram incertezas acerca do fato daquela bactéria presente no estudo ser de fato a causa dos sintomas da sepse em pacientes específicos (TAM; BENDEL, 2017). Devido à relativa alta estabilidade do DNA em meio de cultura, a presença de debris celulares microbianos pode produzir resultados positivos. Devido a incidência de resultados falso-positivos em procedimentos baseados em metodologias que utilizam o DNA, outros métodos que avaliem a significância deste DNA genômico no sangue de pacientes com sepse clínica são recomendados e tornam-se de grande importância (SILVA JUNIOR *et al.*, 2016).

O ácido ribonucleico (RNA), por outro lado, diferentemente do DNA, tem uma meia-vida bastante curta, 2 a 3 minutos, ou pode se alterar rapidamente no organismo vivo, devido à baixa estabilidade e susceptibilidade aos ataques de enzimas RNases, dentro e fora da célula, além do seu rápido “*turnover*” (COOPER, 2000), motivos pelos quais o conteúdo de RNA pode reduzir-se rapidamente, principalmente após a morte celular. Desta maneira, a presença de moléculas de RNA detectada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Transcrição Reversa (RT-PCR) é considerada marcadora da existência de células vivas, como já demonstrado em vários estudos (MOLAEE *et al.*, 2015; SHERIDAN *et al.*, 1998).

O uso da técnica de reação em cadeia da polimerase transcrição reversa (RT-qPCR) desenvolvida no presente trabalho, visando o diagnóstico de bactérias viáveis, nos pacientes com Sepse Neonatal Precoce, demonstrou-ser factível e adequada já que os *primers* desenhados amplificaram os cDNAs alvos a partir de RNA total, e os protocolos laboratoriais desenvolvidos e melhorados em nosso

laboratório para este fim, mostraram-se efetivos. Sendo assim, houve uma concordância entre a RT-qPCR e a evolução clínica dos pacientes incluídos no estudo. Estas evidências mostraram que a detecção de moléculas de RNA provenientes de genes específicos para os microrganismos escolhidos neste estudo, através da RT-qPCR, pode ser usada como um importante indicador de viabilidade celular bacteriana, em complemento aos métodos de culturas ou diagnóstico molecular por detecção de DNA genômico bacteriano. A RT-qPCR possui um potencial no auxílio da tomada de decisão quanto ao uso de antibióticos nos recém-nascidos, reduzindo o risco de perigo para sua microbiota, para sua saúde futura e para sua comunidade (MATSUDA *et al.*, 2007).

Os organismos mais comuns associados a sepse neonatal precoce em países em desenvolvimento encontrados em uma série de estudos (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2018; SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017; SILVA-JUNIOR *et al.*, 2016; SIMONSEN *et al.*, 2014) são *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, motivo pelo qual estas bactérias foram testadas pela primeira vez com sucesso em sangue de neonatos suspeitos de sepse, através da metodologia RT-qPCR do presente trabalho.

A técnica de RT-PCR tem se mostrado sensível o suficiente para detectar concentrações de bactéria presentes no sangue tão baixas quanto 2 células/ml de sangue, demonstrando 10 a 100 vezes maior sensibilidade que os métodos de PCR convencional na sepse neonatal (FUJIMORI *et al.*, 2010; MATSUDA *et al.*, 2007). No presente estudo, após a análise das curvas de dissociação e amplificação, foi possível inferir que das 10 amostras, de apenas 500 µl de sangue, em que houve uma evolução clínica compatível com infecção, 9 apresentaram positividade pela RT-qPCR para pelo menos uma das bactérias estudadas, sendo 5 positivas para *Escherichia coli*, 6 para *Staphylococcus aureus* e 5 amostras para *Streptococcus agalactiae*. Tais resultados da amplificação dos fragmentos alvos demonstraram a sensibilidade e especificidade dos *primers* selecionados. A taxa de concordância entre o RT-qPCR e a evolução clínica do paciente foi excelente (94,7%). Observou-se que apenas um paciente com evolução clínica de sepse não apresentou RT-qPCR positivo para uma das três bactérias pesquisadas, sendo o paciente que apresentou positividade na hemocultura para *Enterococcus faecalis*, bactéria não incluída entre as pesquisadas neste estudo, o que demonstra a necessidade de se

ampliar a lista de bactérias a serem pesquisadas na montagem de um painel diagnóstico mais completo para SNP.

Das 9 amostras suspeitas analisadas que apresentaram positividade pela técnica de RT-qPCR, quatro apresentaram positividade para apenas uma bactéria. O restante das amostras apresentaram positividade para mais de uma bactéria, sendo que a associação mais comumente encontrada foi a de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, o que está de acordo com estudo prévio realizado por nosso grupo (SILVA JUNIOR *et al.*, 2016) realizado através de qPCR multiplex na SNP e que reafirma a hipótese formulada pelo nosso laboratório (APPEL, 2015; BARROS, 2018; MIGLIOLI, 2003, 2009) e também na literatura (FUGIMORI *et al.*, 2010) de que não é infrequente a coexistência de mais de um microrganismo nos pacientes com infecção neonatal. Apenas em um paciente não foi possível a análise da amostra através da técnica de RT-qPCR por esta amostra ter se mostrado insuficiente.

A realização da técnica de qPCR em tempo real associado à transcrição reversa tem facilitado bastante a análise do PCR, tornando possível amplificação, análise e principalmente a quantificação das moléculas alvo de ácido nucleico, o que foi realizado neste estudo. Não foi observada neste trabalho, entretanto a relação entre o nível de quantificação relativa com um padrão de gravidade na evolução clínica dos pacientes com SNP, havendo necessidade de uma população maior de pacientes para esta análise, que pode estar relacionada à resposta inflamatória do paciente.

Um diagnóstico rápido de sepse neonatal permite a administração precoce de agentes microbianos adequados, reduzindo a morbimortalidade (FUGIMORI *et al.*, 2010). Uma redução 5 vezes superior na sobrevivência tem sido reportada como consequência de terapia inapropriada antimicrobiana nas primeiras 6 horas após o reconhecimento da sepse. Infelizmente, os resultados dos testes diagnósticos atuais não estão disponíveis dentro deste tempo crítico para que se possa permitir intervenções médicas efetivas, focadas e potencialmente salvadoras de vida (SINHA *et al.*, 2018). O método de RT-qPCR realizado neste estudo, incluindo a etapa de extração do RNA, pôde ser completada em 5 horas.

Além disso, ressalta-se o fato de que as amostras clínicas e das colônias de bactérias utilizadas para as curvas padrão foram coletadas em frascos contendo RNA later, uma inovação tecnológica descrita pela primeira vez neste trabalho para

este fim. A coleta do sangue neste reagente foi realizada com objetivo de preservar o RNA para posterior extração, evitando sua degradação, já que as análises não seriam realizadas de imediato. Como foi possível observar, as concentrações de RNA extraído de um volume de 0,5 ml de sangue total heparinizados, após a conservação com RNA later, foram adequadas e suficientes para toda análise laboratorial, justificando o uso deste protocolo na prática clínica. Tem-se assim a descrição de uma metodologia nova e efetiva para a extração de RNA de amostras clínicas com vistas ao diagnóstico.

O presente estudo descreveu um método de reação em cadeia da polimerase a partir de cDNA obtido por reação de transcrição reversa do RNA total para a detecção de mRNA bacteriano, o qual foi adequada como um indicador de viabilidade celular microbiana, prometendo-se como uma importante e potencial ferramenta efetiva para o diagnóstico da infecção bacteriana específica nas populações. Assim, demonstrou-se que a extração de RNA total bacteriano foi viável pela metodologia descrita. Porém, existe a necessidade de que outros estudos clínicos sejam conduzidos utilizando uma população maior e representativa de pacientes recém-nascidos com suspeita de sepse neonatal precoce, para que se possa demonstrar a aplicabilidade deste método e seu impacto no julgamento clínico. Além disso, há necessidade de estudos com inclusão de um número maior de bactérias pesquisadas para que se possa testar com maior eficácia o índice de concordância, a sensibilidade e especificidade deste teste laboratorial, assim como são importantes no futuro o desenvolvimento de testes moleculares que avaliem a virulência e resistência antimicrobiana do patógeno.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, os testes moleculares ainda não dispõem de evidências suficientes, para que possam substituir as culturas no diagnóstico de sepse neonatal, podendo servir como testes adjuntos, provendo uma informação rápida e importante após os casos de suspeita de infecção. Entretanto, uma melhora na sensibilidade, pela otimização dos métodos existentes ou desenvolvimento de novos testes no futuro, pode levar a testes moleculares que poderão substituir futuramente as culturas microbianas (PAMMI *et al.*, 2011).

O uso do RT-qPCR pode reduzir o tempo necessário para melhor escolha antibiótica ou para seu descalonamento, além de, quando apresentar-se claramente negativo, poder servir para a suspensão do uso de antimicrobianos. Tais estratégias podem modificar a terapêutica antibiótica empírica, para restringir o número e o espectro dos antibióticos, minimizando o desenvolvimento de patógenos resistentes e reduzindo custos (BAUER; REINHART, 2010).

Como já discutido, a PCR tem uma grande vantagem de possibilitar maior sensibilidade e especificidade, além de ser capaz de ter seus resultados prontos em poucas horas. Entretanto, a amplificação de DNA genômico não caracteriza viabilidade do microrganismo. Embora isto possa ser uma vantagem quando compatível com o estado clínico do paciente, resultados positivos no PCR devem ser interpretados com cautela, devido ao fato de a detecção da presença de DNA microbiano apenas, mas o microrganismo já não é mais viável ou funcional, poder não contribuir ou trazer confusão no diagnóstico e na conduta clínica (DAS; SHIBIB; VERNON, 2017), favorecendo o uso excessivo de antibióticos, resistência antibiótica, sepse fúngica, enterocolite necrosante e mortalidade (TRÖGER *et al.*, 2016).

As novas fronteiras para a racionalização do uso de antibióticos no ambiente dos cuidados neonatais devem ser no sentido de desenvolver estratégias para reduzir a medicação empírica e minimizar consequências adversas. O aumento do

conhecimento do microbioma neonatal emerge e deve ser eminente, visando minimizar a exposição aos antibióticos, reduzindo a enterocolite necrosante e outras sequelas, como asma, obesidade, doença intestinal inflamatória, displasia broncopulmonar, desordens neurológicas e morte. Estas abordagens e metas são primordiais (MUKHOPADHYAY; PUOPOLO, 2018; STRANIERI *et al.*, 2018).

Os resultados do presente estudo mostraram a possibilidade do uso de abordagens moleculares clássicas e sua aplicação aprimorada para fins diagnósticos específicos de importantes microrganismos endêmicos na sepse neonatal. A transcrição reversa de mRNAs bacterianos específicos a partir de extração e purificação do RNA total, caracteriza a viabilidade e integridade do microrganismo, seguido de reação em cadeia da polimerase em tempo real normalizado por um gene endógeno, fornecendo valores de expressão relativos dos genes investigados. Os dados demonstraram que a RT-qPCR pode ser eficiente na detecção rápida e segura no diagnóstico específico e determinação das bactérias mais comumente envolvidas na gênese da sepse neonatal precoce.

## 8. CONCLUSÃO

Em conclusão:

- a) A transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativo em tempo real, dos genes alvos que expressam os mRNAs funcionais dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, foi eficiente para a detecção destes patógenos em amostras de sangue conservadas em *RNA later*.
- b) Os oligonucleotídeos iniciadores foram adequados para amplificar os fragmentos-alvo das bactérias selecionadas.
- c) A análise de concordância demonstrou alta correlação dos dados de detecção por RT-qPCR dos patógenos selecionados, quando correlacionados aos resultados de hemocultura e evolução clínica na população selecionada.
- d) O presente trabalho demonstrou pela primeira vez uma correlação de sintomas clínicos e presença viva de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* na sepse neonatal precoce através de transcrição reversa-qPCR, que demonstrou-se ser uma técnica adequada para a detecção da viabilidade dos microrganismos pesquisados.

## REFERÊNCIAS

AL-ZAHRANI, A.K.; GHONAIM, M.M.; HUSSEIN, Y.M.; EED, E.M.; KHALIFA, A.S.; DORGHAM, L.S. Evaluation of recente methods versus conventional methods dor diagnosis of early-onset neonatal sepsis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 4, p. 388-93, 2015.

APPEL, K.L. **Associação da presença de DNA genômico de diferentes bactérias em sangue de recém-nascidos pré-termo e termo com ruptura prematura de membrana**. 2015. 80 f. Tese (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

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

BANDYOPADHYAY, T.; KUMAR, A.; SAILI, A.; RANDHAWA, V.S. Distribution, antimicrobial resistance and predictors of mortality in neonatal sepsis. **Journal of Neonatal-Perinatal Medicine**, v. 11, n. 2018, p. 145-53, Jan. 2018.

BARROS, E.R.V. **Avaliação das Relações de Prematuridade e Doença Peridontal através da detecção de DNA Genômico de Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans em Biofilme Bucal Materno e Tecido Placentário**. 2014. 122 f. Tese (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.

BARROS, E.R.V.; PALHARES, D.B.; VIEIRA, F.O.; NASCIMENTO, D.R.; ALVES, F.; PALHARES, M.G.; DEL PUERTO, H.L.; MARTINS, A.S. Periodontopathogens, Porphyromonas Gingivalis And Aggregatibacter Actinomycetemcomitans In Placenta: A Functional Molecular Diagnosis. **NBC – Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 8, n. 15, p. 1-15, junho 2018.

BAUER, M.; REINHART, K. Molecular diagnostics of sepsis – Where are we today? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2010, p. 411-13, 2010.

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

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

BORGHESI, A.; STRONATI, M.; CASTAGNOLI, R.; LOIMO, I.; ACHILLE, C.; MANZONI, P.; TZIALLA, C. Novel Approaches to the Study of Neonatal Infections. **American Journal of Perinatology**, v. 35, n. 6, p. 570-74, 2018.

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

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

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

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

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

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

COOPER, GM. **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

COTTEN, C.M.; TAYLOR, S.; STOLL, B.; GOLDBERG, R.N.; HANSEN, N.I.; SANCHEZ, P.J.; AMBALAVANAN, N.; BENJAMIN, D.K. Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 58-66, 2009.

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

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

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

DAS, S.; SHIBIB, D.R.; VERNON, M.O. The new frontier of diagnostics: Molecular assays and their role in infection prevention and control. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 2017, p. 158-69, 2017.

EILAND III E.H.; BEYDA N.; HAN H.; LINDGREN W.; WARD R.; ENGLISH T.M.; HASSOUN A.; HATHCOCK K. The Utility of Rapid Microbiological and Molecular Techniques in Optimizing Antimicrobial Therapy. **SRX Pharmacology**, v. 2010, p. 1-6, Jan. 2010.

ESPARCIA, O.; MONTEMAYOR, M.; GINOVART, G.; POMAR, V.; SORIANO, G.; PERICAS, R.; GURGUI, M; SULLEIRO E; PRATS, G.; NAVARRO, F.; COLL, P. Diagnostic accuracy of a 16S ribosomal DNA gene-based molecular technique (RT-PCR, microarray, and sequencing) for bacterial meningitis, early-onset neonatal sepsis, and spontaneous bacterial peritonitis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 69, n. 2011, p. 153-60, Oct. 2010.

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

FERREIRA, L.E.; DALPOSSO, K.; HACKBARTH, B.B.; GONÇALVES, A.R.; WESTPHAL, E.A.; FRANÇA, P.H.C.; PINHO, M.S.L. Painel Molecular para detecção

de microrganismos associados à sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 36-40, Jan./Mar. 2011.

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

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

GERDES, J.S. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. **Pediatric Clinics of North America**, v. 51, n. 4, p. 939-959, Aug. 2004.

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

GOOD, P.I.; HOOVEN, T.A. Evaluating Newborns at Risk for Early-Onset Sepsis. **Pediatric Clinics of North America**, v. 66, n. 2, p. 321-31, Apr. 2019.

GOULART, A.P.; VALLE, C.F.; DAL-PIZZOL, F.; CANCELIER, A.C.L. Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Sepse Neonatal Precoce em Hospital da Rede Pública do Brasil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 2, p. 148-153, Abril/Junho 2006.

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

INAN, C.; TANRIÖVER, M.D.; DAYANGAÇERDEN, D. Novel Transcriptional Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Sepsis. **Acta Medica**, v. 2015, n. 4, Feb. 2015.

JEFFERIES, A.L.; CANADIAN PAEDIATRIC SOCIETY, FETUS AND NEWBORN COMMITTEE. Management of term infants at increased risk for early-onset bacterial sepsis. **Paediatrics & Child Health**, v. 22, n. 4, p. 223-228, Jul. 2017.

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

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

KHAN, A.M.; MORRIS, S.K. BHUTTA, K.A. Neonatal and Perinatal Infections. **Pediatric Clinics of North America**, v. 64, n. 4, p. 585-598, Aug. 2017.

KASPER, D.C.; ALTIOK, I.; MECHTLER, T.P.; BÖHM, J.; STRAUB, J.; LANGGARTNER, M.; POLLAK, A.; HERKNER, K.R.; BERGER, A. Molecular Detection of Late-Onset Neonatal Sepsis in Premature Infants Using Small Blood Volumes: Proof-of-Concept. **Neonatology**, v. 103, p. 268-73, Mar 2013.

KLIMOV, V.V. **From Basic to Clinical Immunology**. 1 st ed. Tomsk, Russia: Springer, 2019.

KLINGENBERG, C.; KORNELISSE, R.F.; BUONOCORE, G.; MAIER, R.F.; STOCKER, M. Culture-Negative Early-Onset Neonatal Sepsis – At the Crossroad Between Efficient Sepsis Care and Antimicrobial Stewardship. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, n. 285, p. 1-9, Oct. 2018.

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

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

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

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

MATSUDA, K.; TSUJI, H.; ASAHARA, T.; KADO, Y.; NOMOTO, K. Sensitive Quantitative Detection of Commensal Bacteria by rRNA-Tageted Reverse Transcription-PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 32-39, Jan. 2007.

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

MIGLIOLI, A.M.D. **DNA genômico de Estreptococos e Escherichia coli em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento**. 2009. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, UnB/UFG/UFMS, Campo Grande, 2009.

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

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

MOLAEI, N.; ABTAHI, H.; GHANNADZEDEH, M.J; KARINI, M.; GUAZNAVI-RAD, E. Application of Reverse Transcriptase – PCR (RT-PCR) for rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water samples. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 13, n. 24, p. 1-6, Mar. 2015.

MUKHOPADHYAY, S.; PUOPOLO, K.M. Risk Assessment in Neonatal Early Onset Onset Sepsis; Opportunities for Antibiotic Stewardship. **Pediatrics Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 5, p. 477-81, Jun. 2018.

MURTHY, S.; GODINHO, M.A.; GUDDATTU, V.; LEWIS, L.E.S.; NAIR, S.N. Risk factors of neonatal sepsis in India: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0215683, Apr. 2019.

NASCIMENTO, D.R. **Efeito do ácido ascórbico na expressão de ACVR1, BMP4, colágenos tipo 1 e 3, em leucócitos de portadores de fibrodisplasia ossificante progressiva**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.

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

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

NG, S.; STRUNK, T.; JIANG, P.; MUK, T.; SANGILD, P.; CURRIE, A. Precision Medicine for Neonatal Sepsis. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 26, n. 5, p. 70, July 2018.

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

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

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

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, May 2001.

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

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

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

PUOPOLO, K.M.; BENITZ, W.E.; ZAOUTIS, T.E.; AAP COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN; AAP COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Management of Neonates Born at < 34 6/7 Weeks' Gestation With Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis, **Pediatrics**, v. 142, n. 6, pii. e20182896, Dec. 2018.

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

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

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

RESCH, B.; RENOLDNER, B.; HOFER, N. Comparison Between Associated Laboratory and Clinical Parameters in Early-Onset Sepsis of the Newborn. **The Open Microbiology Journal**, v. 10, p. 133-139, 2016.

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

RUBARTH, L.B.; CHRISTENSEN, C.M.; RILEY, C. Bacterial sepsis in the neonate. **The Nurse Practitioner**, v. 42, n. 9, p. 25-32, Sep. 2017.

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

RUSSEL, A.R.B; KUMAR, R. Early onset neonatal sepsis: diagnostic dilemmas and practical management. **Archives of Diseases in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 100, n. 4, p. F350-4, Jul 2015.

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

SEALE, A.C.; OBIERO, C.W.; BERKLEY, J.A. Rational development of guidelines for management of neonatal sepsis in developing countries. **Current opinion in Infectious Disease**, v. 28, n. 3, p. 225-30, Dec. 2015.

SCHEEL, M.; PERKINS, S. Hit ou Miss? A Review of Early-Onset Sepsis in the Neonate. **Critical Care Nursing of Clinical North America**, v. 30, n. 3, p. 353-62, Sep. 2018.

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

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

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

SHANE, A.L.; SÁNCHEZ, P.J.; STOLL, B.J. Neonatal sepsis. **Lancet**, v. 390, n. 10104, p. 1770-1780, Apr. 2017.

SELIEM, W.A.; SULTAN, A.M. Etiology of early onset neonatal sepsis in neonatal intensive care unit – Mansoura, Egypt. **Journal of Neonatal-Perinatal Medicine**, v. 11, n. 3, p. 323-330, 2018.

SHERIDAN G.E.C.; MASTERS C.I.; SHALLCROSS J.A.; MACKEY B.M. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1313-18, 1998.

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

SILVA JUNIOR W.P. **Desenvolvimento e aplicação de um teste PCR multiplex para detecção rápida dos principais patógenos bacterianos na sepse neonatal precoce**. 2015. 98 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

SILVA JUNIOR, W.P.; MARTINS, A.S.; XAVIER, P.C.N.; APPEL, K.L.A.; OLIVEIRA JUNIOR, S.A.; PALHARES, D.B. Etiologic Profile of Early Neonatal Bacterial Sepsis by Multiplex qPCR. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 12, p. 1318-24, 2016.

SILVEIRA R.C.; GIACOMINI C.; PROCIANOY R.S. Sepse e choque séptico no período neonatal: atualização e revisão dos conceitos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 22, n. 3, p. 280-290, jul./set., 2010.

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

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

SINHA, M.; JUPE, J.; MACK, H.; COLEMAN, T.P.; LAWRENCE, S.M. FRALEY, S.I. Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 2, p. 01-26, Feb. 2018.

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

STOLL, B.J.; HANSEN, N.L.; SÁNCHEZ, P.J.; FAIX, R.G.; POINDEXTER, B.B.; VAN MEURS, K.P.; BIZZARRO, M.J.; GOLDBERG, R.N.; FRANTZ III, I.D.; HALE, E.C.; SHANKARAN, S.; KENNEDY, K.; CARLO, W.A.; WATTERBERG, K.L.; BELL, E.F.; WALSH, M.C.; SCHIBLER, K.; LAPTOOK, A.R.; SHANE, A.L.; SCHRAG, S.J.; DAS, A.; HIGGINS, R.D. Early Onset Neonatal Sepsis: The Burden of Group B Streptococcal and *E. coli* Disease Continues. **Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. 817-826, May 2011.

STRANIERI, I.; KANUNFRE, K.A.; RODRIGUES, J.C.; YAMAMOTO, L.; NADAF, M.I.V.; PALMEIRA, P.; OKAY, T.S. Assessment and comparison of bacterial load levels determined by quantitative amplifications in blood culture-positive and negative neonatal sepsis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 01-10, Oct. 2018.

TAM, P.I.; BENDEL, C.M. Diagnostics for neonatal sepsis: current approaches and future directions. **Pediatric Research**, v. 82, n. 4, p. 574-83, Oct. 2017.

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

TRÖGER, B.; HÄRTEL, C.; BAUER, J.; DÖRDELMANN, M.; FELDERHOFF-MÜSER, U.; HEPPING, N.; HILLEBRAND, G.; KRIBS, A.; MARISSSEN, J.; OLBERTZ, D.; RATH, P.; SCHMIDTKE, S.; SIEGEL, J.; HERTING, E.; GÖPEL, W.; STEINMANN, J.; STEIN, A. Clinical Relevance of Pathogens Detected by Multiplex PCR in Blood of Very-Low-Birth Weight Infants with Suspected Sepsis – Multicentre Study of the German Neonatal Network. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. 01-10, Jan. 2016.

TZIALLA, C.; MANZONI, P.; ACHILLE, C.; BOLLANI, L.; STRONATI, M.; BORGHESI, A. New Diagnostic Possibilities for Neonatal Sepsis. **American Journal of Perinatology**, v. 35, n. 6, p. 575-577, 2018.

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

VIRA, H.; BHAT, V.; CHAVAN, P. Diagnostic molecular microbiology and its applications: Current and future perspectives. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 20-31, July 2016.

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

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

WYNN, J.L. Defining Neonatal Sepsis. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 28, n. 2, p. 135-40, Apr. 2016.

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

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

ZEA-VERA, Z.; OCHOA, T.J. Challenges in the diagnosis and management of neonatal sepsis. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 61, p. 1-13, 2015.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa **TRANSCRIÇÃO REVERSA-qPCR MULTIPLEX PARA A AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS DA SEPSE NEONATAL PRECOCE**, de responsabilidade do pesquisador WALTER PERES DA SILVA JUNIOR com orientação do PROF. DR. ALMIR DE SOUSA MARTINS. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver.

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

Os riscos contidos neste estudo são próximos de zero, estando relacionados principalmente com o desconforto que é usual durante a coleta de amostras de sangue, devido a dor no local da picada da agulha. Se houver qualquer efeito adverso ou dano a integridade do paciente devido ao procedimento realizado, o paciente tem a garantia de atendimento médico-hospitalar pleno por conta do Hospital participante do estudo. Os benefícios esperados com este estudo são um tratamento mais rápido e mais adequado das infecções nos primeiros dias de vida, levando a uma melhora mais rápida e um tempo de internação menor do recém-nascido na UTI Neonatal.

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

Sua participação é voluntária e não tem fins lucrativos. Você poderá deixar de participar do estudo no momento em que desejar.

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

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

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

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

Sua participação no estudo é voluntária. Você pode escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento. Seu filho(a) ou representado não perderá qualquer benefício ao qual tem direito. Se você desistir do estudo, seu filho(a) ou representado pode receber o procedimento padrão para o diagnóstico de infecção neonatal (hemocultura) conforme já mencionado. Você não será proibido de participar de novos estudos.

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

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

Campo Grande (MS), \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

## APÊNDICE B – FORMULÁRIO PADRÃO DE COLETA DE DADOS

### IDENTIFICAÇÃO

|                    |                 |                              |
|--------------------|-----------------|------------------------------|
| Nome: _____        | Hospital: _____ | Registro nº: _____           |
| Procedência: _____ |                 |                              |
| Endereço: _____    |                 | Telefone: ( ) _____          |
| Sexo: ( ) M ( ) F  |                 | Cor: ( ) B ( ) P ( ) M ( ) A |

### DADOS MATERNOS

|   |                        |  |
|---|------------------------|--|
| Idade: _____  | Paridade: _____        | Pré-natal: ( ) Não ( ) Sim _____ consultas |
| Patologias na Gestação: ( ) Não ( ) Sim Qual(is): _____                       |                        |  |
| Uso antibiótico anteparto: ( ) Não ( ) Sim Qual (is): _____                   |                        |  |
| Corioamnionite: ( ) Sim ( ) Não   | Febre: ( ) Sim ( ) Não | Colonização SGB: ( ) Não ( ) Sim ( ) Ig    |
| Bolsa Rota: ( ) Ato ( ) <18hs ( ) >18hs LA: ( ) Claro ( ) Meconial ( ) Fétido |                        |  |
| Gestação Gemelar: ( ) Não ( ) Sim Ordem do Gêmeo: _____                       |                        |  |
| Corticosteróide anteparto: ( ) Não ( ) Sim Nº doses: _____                    |                        |  |

### DADOS DO PARTO

|  |  |                                       |  |
|--|--|---------------------------------------|--|
| Data de Nascimento: __/__/__ (Hora: __:__)             |  | Data de Internação: __/__/__          |  |
| Local: ( ) Hospitalar ( ) Domiciliar ( ) Outro _____   |  |                                       |  |
| Tipo de Parto: ( ) Vaginal ( ) Cesárea                 |  | Fórceps: ( ) Não ( ) Sim              |  |
| Necessidade de Reanimação: ( ) Não ( ) Sim Qual: _____ |  |                                       |  |
| Apgar 1º min.: _____                                   |  | 5º min.: _____                        |  |
| Peso nasc: _____ g                                     |  | IG: _____ sem ( ) AIG ( ) PIG ( ) GIG |  |

### LABORATÓRIO

|                 |
|-----------------|
| HMC/Anti: _____ |
| _____           |
| Cultura/Anti    |
| LCR: _____      |

### ANTIBIÓTICOS

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. Antibióticos: (Quais: _____) |
| 2. Tempo de Tratamento: _____   |

## ANEXO A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO RNA

RNA STAT

# RNA STAT-60™

## Total RNA/mRNA ISOLATION REAGENT

TEL-TEST "B"  
Bulletin No. 1

Patent Pending

For in vitro research use

**1. INTRODUCTION:**

Recent progress in RNA isolation technology has made it possible to replace lengthy and laborious methods of total RNA isolation<sup>1</sup> by a single-step method<sup>2,3</sup>. RNA STAT-60™ is a new and substantially improved version of the single-step method. It is a complete and ready to use reagent for isolation of total RNA from tissues and cells of human, animal, plant, yeast, bacterial, and viral origin. Extensive laboratory tests have shown that the RNA STAT-60™ is highly reliable and produces very consistent results.

The composition of RNA STAT-60™ (patent pending) includes phenol and guanidinium thiocyanate in a mono-phase solution. A biological sample is homogenized in the RNA STAT-60™ using a glass-Teflon or Polytron homogenizer. Upon addition of chloroform, the homogenate separates into two phases: aqueous phase and organic phase. The total RNA remains exclusively in the aqueous phase while DNA and proteins are extracted into an organic phase and interphase. The total RNA is precipitated from the aqueous phase by addition of isopropanol, washed with ethanol and solubilized in water.

The entire procedure for RNA isolation using the RNA STAT-60™ can be completed in 1 hour. This is the most effective method of RNA isolation. The recovery of undegraded mRNAs using the RNA STAT-60™ is 30–150% greater than with any other method of RNA isolation. RNA STAT-60™ offers:

- Total RNA/mRNA in under 60 minutes.
- Northern blot/PCR\*-ready mRNA in under 60 minutes.
- No further purification required for use in subsequent procedures including Northern blotting and PCR\*.
- Extracts 30–150% more total RNA/mRNA than any other method.
- Cost effective method requiring less reagent/sample.

**2. APPLICATION:**

The total RNA isolated by the RNA STAT-60™ is undegraded and free of protein and DNA contamination. It can be used for Northern analysis, dot blot hybridization, poly A+ selection, in vitro translation, RNase protection assay, molecular cloning, and for polymerase chain reaction (PCR\*) without additional treatment with DNase. The simplicity of the isolation using the RNA STAT-60™ makes it possible to process simultaneously a large number of samples, and the excellent recovery of RNA permits the use of this product for isolation of RNA from very small biological samples (biopsies, etc.).

**3. REAGENTS SUPPLIED:**

|              |   |
|--------------|---|
| RNA STAT-60™ | 100ml or 200ml bottle containing a red solution of RNA STAT-60™ |
|--------------|---|

**PREPARATION:** Ready to use.

**STORAGE:** Refrigerate at 2–8°C. Protect from exposure to light.

**STABILITY:** 2 years. Refer to expiration date stamped on label.

**4. REAGENTS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED:**

Chloroform (ACS grade)  
Isopropanol (ACS grade)  
Ethanol (ACS grade)

**5. PROTOCOL:**

RNA/mRNA isolation by the RNA STAT-60™ method includes the following steps:

|                      |   |
|----------------------|---|
| 1. Homogenization    | RNA STAT-60™ (1ml per 50–100mg tissue, or 5–10 x 10 <sup>6</sup> cells) |
| 2. RNA Extraction    | 1 vol. of homogenate + 0.2 vol. of chloroform                           |
| 3. RNA Precipitation | 0.5 vol. of isopropanol   |
| 4. RNA Wash          | 75% ethanol   |

Unless stated otherwise the procedure is carried out at room temperature.

**5.1 HOMOGENIZATION:**

**A. TISSUES:**

Homogenize tissues samples in the RNA STAT-60™ (1ml/50–100mg tissue) in a glass-Teflon or Polytron homogenizer. Sample volume should not exceed 10% of the volume of the RNA STAT-60™ used for homogenization.

**B. CELLS:**

Cells grown in monolayer are lysed directly in a culture dish by adding the RNA STAT-60™ (1ml/ 3.5cm petri dish) and passing the cell lysate several times through a pipette. Cells grown in suspension are sedimented then lysed in the RNA STAT-60™ (1ml per 5-10 x 10<sup>6</sup> cells) by repetitive pipetting. Washing cells before addition of the RNA STAT-60™ should be avoided as this increases the possibility of mRNA degradation.

*Continued on other side*

## 5.2 RNA EXTRACTION:

Following homogenization, store the homogenate for 5 minutes at room temperature to permit the complete dissociation of nucleoprotein complexes. Next, add 0.2ml of chloroform per 1ml of the RNA STAT-60™, cover the sample tightly, shake vigorously for 15 seconds and let it stay at room temperature for 2-3 minutes. Centrifuge the homogenate at 12,000g (max) for 15 minutes 4°C. Following centrifugation, the homogenate separates into two phases: a lower red phenol chloroform phase and the colorless upper aqueous phase. RNA remains exclusively in the aqueous phase whereas DNA and proteins are in the interphase and organic phase. The volume of the aqueous phase is about 60% of the volume of RNA STAT-60™ used for homogenization.

## 5.3 RNA PRECIPITATION:

Transfer the aqueous phase to a fresh tube and mix with isopropanol. Add 0.5ml of isopropanol per 1ml of the RNA STAT-60™ used for homogenization. Store samples at room temperature for 5-10 minutes and centrifuge at 12,000g (max.) for 10 minutes at 4°C. RNA precipitate (often visible before centrifugation) forms a white pellet at the bottom of the tube.

## 5.4 RNA WASH:

Remove supernatant and wash the RNA pellet once with 75% ethanol by vortexing and subsequent centrifugation at 7,500g (max.) for 5 minutes at 4°C. Add at least 1ml of 75% ethanol per 1ml of the RNA STAT-60™ used for the initial homogenization.

At the end of procedure, dry the RNA pellet briefly by air-drying or in a vacuum (5-10 min.). It is important not to let the RNA pellet dry completely as it will greatly decrease its solubility. Do not use the Speed-Vac for drying. Dissolve the RNA pellet in water or in 1 mM EDTA, pH 7, or 0.5% SDS solution. Vortex or pass the pellet a few times through a pipette tip. An incubation for 10-15 minutes at 55-60°C may be required to dissolve RNA samples. Diethylpyrocarbonate (DEPC) treated RNase-free solutions<sup>1</sup> should be used for solubilization of RNA.

## 6. EXPECTED YIELD AND PURITY:

Expected yield of total RNA:

- Tissues ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  tissue): liver, spleen, 7 - 10  $\mu\text{g}$ ; kidney, 3 - 4  $\mu\text{g}$ ; skeletal muscles, brain, 1 - 1.5  $\mu\text{g}$ ; placenta 1 - 4  $\mu\text{g}$ .
- Cultured cells ( $\mu\text{g}/10^6$  cells): epithelial cells, 10 - 15  $\mu\text{g}$ ; fibroblasts, 5 - 7  $\mu\text{g}$ .

The final preparation of total RNA is free of DNA and proteins and has a 260/280 ratio > 1.8.

## 7. NOTES AND COMMENTS:

- For isolation of RNA from a small amount of cells or tissue (1-10mg): homogenize samples in 0.8ml of the RNA STAT-60™, transfer the homogenate to the eppendorf tube and follow the isolation protocol with the exception of the RNA precipitation which should be carried out for 30 minutes at 4°C.
- Following homogenization (before addition of chloroform) samples can be stored at -70°C for at least 2 weeks.
- An additional precipitation may be necessary to use RNA isolated by the RNA STAT-60™ in enzymatic assays. Following solubilization, precipitate RNA in the presence of 0.2 M NaCl with two volumes of ethanol for 15 minutes at 4°C. The PCR and RNase protection assays do not require this traditional precipitation step.
- Hands and dust may be the major source of the RNase contamination. Use gloves and keep tubes closed. The use of sterile, disposable polypropylene tubes is recommended throughout the procedure.

## 8. SPECIAL HANDLING PRECAUTIONS:

The RNA STAT-60™ contains poison (phenol) and irritant (guanidinium thiocyanate). CAN BE FATAL. When working with the RNA STAT-60™ use gloves and eye protection (shield, safety goggles). Do not get on skin or clothing. Avoid breathing vapor. Read also the warning note on the bottle.

In case of contact immediately flush eyes or skin with a large amount of water for at least 15 minutes and seek immediate medical attention.

## 9. REFERENCES:

- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Kedzierski, W. and John Porter. 1991. *A Novel Non-enzymatic Procedure for Removing DNA Template from RNA Transcription Mixtures*. *BioTechniques* 10:210-214.

RNA STAT-60™ is a trademark of Tel-Test Inc.  
PCR is subject of patents granted to Cetus Corporation.

| CAT. No. | VOLUME |         |
|----------|--------|---------|
| CS-110   | 100 ml | Inquire |
| CS-111   | 200 ml | Inquire |

# TEL-TEST, INC.

P.O. Box 1421 • 1511 County Road 129 • Friendswood, TX 77546  
Phone (218) 482-2672 • Fax (281) 482-1070 • Fax (281) 482-3023 • Customer Service 800-631-0600  
E-mail: teltestinfo@aol.com • Website: www.tel-test.com

## ANEXO B – QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA DAS AMOSTRAS

| <b>Amostra</b> | <b>260/280</b> | <b>Concentração<br/>(µg/µl)</b> |
|----------------|----------------|---------------------------------|
| EC 01          | 1,95           | 26,8                            |
| EC 02          | 1,98           | 35,7                            |
| SAGA 01        | 1,9            | 9,1                             |
| SAGA 02        | 1,88           | 9,5                             |
| SAU 01         | 1,89           | 52,6                            |
| SAU 02         | 1,88           | 27,5                            |
| 01             | 2,96           | 24,5                            |
| 02             | 1,39           | 9,5                             |
| 03             | 2,56           | 39,8                            |
| 04             | 1,83           | 28,7                            |
| 05             | 1,51           | 12,1                            |
| 06             | 2,31           | 28,4                            |
| 07             | 1,89           | 53,2                            |
| 08             | 1,67           | 51,9                            |
| 09             | 1,52           | 61,0                            |
| 10             | 1,95           | 90,0                            |
| 11             | 1,69           | 20,0                            |
| 12             | 2,29           | 108,8                           |
| 13             | #              | #                               |
| 14             | 2,48           | 49,5                            |
| 15             | 1,90           | 111,4                           |
| 16             | 1,96           | 70,7                            |
| 17             | 1,81           | 125,9                           |
| 18             | 1,90           | 114,8                           |
| 19             | 1,99           | 227,4                           |
| 20             | 2,09           | 109,3                           |

#: Amostra insuficiente