



Ausência de infecção bacteriana em recém nascidos pré-termo ou a termo em diferentes tempos de ruptura precoce de membrana

Absence of bacterial infection in preterm or full-term newborns at different time points of early membrane rupture

Kelly Lopes de Araújo Appel¹, Almir de Sousa Martins², Anna Maria Duarte Miglioli³, Carmen Silvia Martimbiano de Figueiredo³, Paula Cristhina Niz Xavier⁴, Albert Schiaveto de Souza⁵, Walter Peres da Silva Júnior¹, Rodrigo Juliano Oliveira^{1,6}, Durval Batista Palhares^{3,4}.

¹Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-Oeste, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Laboratório de Diagnóstico Molecular em Pediatria, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁵Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁶Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica(CeTroGen) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

<http://www.seer.ufms.br/index.php/pecibes/index>

*Autor correspondente: Kelly Lopes de Araújo Appel, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. E-mail kelly.appel@ufms.br

Palavras-chave: recém-nascido; RPM; PCR

Key-words: Newborn; Early rupture of membranes; PCR

Resumo

A presente pesquisa investigou a presença de DNA genômico de três bactérias (*Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) em sangue de recém-nascidos pré-termo e a termo de mães com ruptura precoce de membrana (RPM). Amostras de sangue de 101 recém-nascidos foram avaliadas e os dados foram comparados com os resultados de hemocultura a partir de prontuários médicos. Os resultados da hemocultura foram negativos para as bactérias analisadas. Não houve associação estatística entre o tempo de RPM e a presença do DNA genômico bacteriano (93,1%). Porém, os sinais clínicos sugerem a associação. A bactéria *Escherichia coli* foi a mais prevalente (64,3%) seguida da *Streptococcus agalactiae* (19,8%) e *Klebsiella pneumoniae* (2,0%). Os achados clínicos e fisiológicos sugere a possível associação entre o tempo de ruptura das membranas, sinais clínicos de sepse e a presença do DNA genômico de bactérias patogênicas responsáveis pela ocorrência de infecção neonatal em recém-nascidos pré-termo e a termo.

Abstract

This research aimed to investigate the genomic DNA presence of three bacteria in the blood of preterm and full-term newborns. Blood samples from 101 newborns with RPM were analyzed by qRT-PCR to detect genomic DNA of *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and compared to previously hemoculture results, which were obtained from medical records. Data were analyzed by chi-square. The results of hemocultures were negative for analyzed bacteria. There was no statistical association between RPM time and the presence of bacterial DNA (93.1%). However, the clinical signs suggest an association. *E. coli* was the most prevalent (64.3%) followed by *S. agalactiae* (19.8%) and *K. pneumoniae* (2.0%). The clinical and physiological findings suggest a possible association between the time of rupture of membranes, clinical signs of sepsis and the genomic DNA of pathogenic bacteria responsible for the occurrence of neonatal infection in preterm and full-term newborn.

1. Introdução

As infecções no período neonatal constituem uma das grandes preocupações do setor de neonatologia, por serem comumente responsáveis por elevada morbimortalidade (Silveria e Procianoy, 2012; Moreira et al., 2013). Dentre as principais infecções neste período, a sepse é uma das doenças mais frequentes e é caracterizada por resposta inflamatória sistêmica decorrente da transmissão intraparto de microrganismos patogênicos (Camacho-Gonzales et al., 2013; Kacerovsky et al., 2014).

A ruptura precoce de membranas (RPM) também pode estar associada à sepse neonatal precoce e secundária a patógenos do canal de parto (Nomura et al., 2009; Camacho-Gonzales et al., 2013; Hackenhaar et al., 2014; Patriota et al., 2014). Estudos relatam que o risco de incidência de sepse fetal/neonatal aumenta em função do tempo de ruptura das membranas amnióticas. Logo, o prognóstico é dependente deste tempo e o risco aumenta nas primeiras 36 horas após a ruptura (Herbst e Källén, 2007).

Os microrganismos mais frequentemente relacionados à sepse neonatal são *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* e *Listeria monocytogenes*. Estes microrganismos podem chegar ao feto via hematogênica ou podem migrar do canal vaginal para a cavidade intra-amniótica e colonizar o feto desencadeando um processo infeccioso (Krupa et al., 2005; Ferreira et al., 2013; Kacerovsky et al., 2014).

Nas unidades de terapia intensivas neonatal e unidades intermediárias neonatal do município de Campo Grande - MS, a infecção neonatal tem sido uma das maiores preocupações dos profissionais atuantes desse setor. Nesse sentido, com o presente estudo teve por objetivo foi determinar a prevalência das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* no sangue de recém-nascidos de gestantes com ruptura prematura das membranas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

2. Casuística e Métodos

Trata-se de um estudo observacional, transversal, com recém-nascidos provenientes de mães com diagnóstico de RPM, independentemente da idade gestacional, internados nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) ou Unidade Intermediária Neonatal (UIN), da maternidade do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, da Maternidade Cândido Mariano e da maternidade do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS) no período de março a agosto de 2014.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.1. Amostra

A população consistiu-se de 101 parturientes e seus respectivos recém nascidos (RNs) pré-termo ou a termo em qualquer tempo de RPM. As avaliações das idades gestacionais dos RNs foram realizadas pelo método *New Ballard Score* (NBS) (Ballard et al., 1991).

Dentro das idades gestacionais os RNs foram alocados no grupo pré-termo (<38 semanas) ou a termo (≥ 38semanas), desde que não estivessem em franco trabalho de parto natural.

2.2.1. Delineamento

A hemocultura foi realizada por sistema automatizado BACTTEC TM FX (BD, New Jersey, USA) (Jordan e Durso, 2000), segundo a rotina hospitalar e seus resultados foram obtidos a partir de prontuários médicos. Na pesquisa foi utilizado um *primer* universal (5'-A A C T G G A G G A A G G T G G G G A T - 3' e (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') para β -actina que identifica apenas a presença de DNA genômico bacteriano não permitindo especificar de qual bactéria se trata (Galves, 2013; Silva Junior, 2015).

Para a detecção específica dos *amplicons* das regiões escolhidas das bactérias, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (PCRtr) utilizando o *kit SYBR Green PCR core Reagents* (PE Biosystems), processada no aparelho ABI Prism 700 (Applied Biosystems) e no aparelho AB Vii A7 (Applied Biosystems), baseado no protocolo para PCRtr desenvolvido pelo NUFIGEN (Reis, 2013). Em todos os ensaios foram incluídos controles positivo e negativo (no-template-PCR). Para cada amostra positiva foi determinado o valor de CT (*threshold cycle*). Como controle positivo foi utilizado ácido nucléico total purificado dos microrganismos pesquisados (Grimberg et al., 1989).

Para avaliar as possíveis associações entre RPM e a identificação de DNA genômico pelo primer universal, a presença de DNA genômico das diferentes bactérias, resultados de hemocultura dos RNs e dados maternos foram utilizados os testes de Qui-quadrado, Mann-Whitney e estatística descritiva. Todas as análises estatísticas foram realizadas no Software SPSS, versão 20.0, adotando-se nível de significância de 5%.

3. Resultados

Em relação aos dados maternos, a idade das gestantes variou de 14 a 43 anos, (23,71 ± 6,59 anos). A idade gestacional variou de 25 a 42 semanas, sendo que no grupo pré-termo a idade gestacional média foi de 32,71 ± 3,53 semanas e no grupo a termo foi de 39,34 ± 1,15 semanas.

Todos os RNs selecionados para o estudo (n=101) apresentavam clínica de infecção e receberam terapia antimicrobiana. Não houve associação (p>0,05) entre a idade gestacional e as variáveis escore de Apgar, sexo e tipo de parto.

Os resultados da PCR convencional utilizando o primer universal demonstra que entre as 101 amostras foi identificado que 93,1% foram positivas para a presença de DNA genômico de bactérias, enquanto que pela PCRtr foi identificada a presença de DNA genômico das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Tabela 1). Nenhuma das bactérias estudadas foram observadas na hemocultura. Porém, foram identificadas outras que não eram objetivos do estudo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp., *Staphylococcus*

Tabela 1. Classificação do tempo de ruptura prematura das membranas (horas) em relação à presença de bactérias nas gestações pré-termo e a termo.

	Número de bactérias				TOTAL	Valor de p
	por idade gestacional					
	0 a 23	24 a 47	48 a 71	≥ 72		
Pré termo (G1)						
(n=84)	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)		
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	36,8 (7)	31,6 (6)	10,5 (2)	21,1 (4)	22,6 (19)	0,34
<i>Escherichia coli</i>	29,8 (17)	22,8 (13)	7,0 (4)	40,4 (23)	67,8 (57)	0,39
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,2 (1)	0,57
DNA bacteriano	33,3 (26)	20,5 (16)	7,7 (6)	38,5 (30)	92,8 (78)	0,20
À termo (G2)						
(n=17)	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)		
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	5,9 (1)	0,69
<i>Escherichia coli</i>	62,5 (5)	12,5 (1)	0,0 (0)	25,0 (2)	47,0 (8)	0,87
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,0 (0)	100,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	5,9 (1)	0,16
DNA bacteriano	58,8 (10)	17,6 (3)	0,0 (0)	17,6 (3)	100,0 (17)	0,18

epidermidis e *Staphylococcus haemolyticus*.

4. Discussão

A média de idade materna da população deste estudo foi semelhante ao observado em outros estudos (Patriota et al., 2014). No entanto, não foi associado como fator de risco para o desenvolvimento da ruptura de membranas. Esse mesmo fato é corroborado por Hackenhaar et al. (2014).

Embora não tenha sido detectada associação estatística de infecção do trato urinário materno (ITU) e RPM, é importante ressaltar essa correlação como indicado pela literatura (Krupa et al., 2005) já que a ITU pode desencadear a atividade uterina ou ainda promover alterações na síntese e degradação de colágeno das membranas, portanto, a infecção pode preceder a RPM (Krupa et al., 2005).

Supostamente, problemas na técnica de isolamento e identificação dos microrganismos e uso de antibióticos maternos possam explicar os resultados negativos obtidos pela hemocultura.

Em pesquisas realizadas na mesma instituição hospitalar do presente estudo, foi observado que 97% das amostras de hemocultura apresentaram resultados negativos para presença de microrganismos associados à seps

neonatal (Silva Junior, 2015). Embora a hemocultura seja considerada como o padrão ouro para o diagnóstico da seps neonatal, a taxa de resultados positivos obtidos em outros estudos também foi baixa (Menezes et al., 2008; Camacho-Gonzales et al., 2013; Galves, 2013; Silva Junior, 2015). Assim sugere-se que a baixa taxa de positividade da hemocultura dificulta o diagnóstico e pode interferir no tratamento (Lajos et al., 2008; Polin, 2012).

Vários estudos têm demonstrado que a PCR é uma técnica sensível na identificação de DNA de agentes etiológicos da infecção neonatal utilizando menor quantidade de sangue (300 µL) e com resultados mais rápidos e precisos (Cezarino et al., 2008; Lucignato et al., 2011; Tejada et al., 2011; Labib et al., 2013).

O uso do *primer* universal na PCR convencional tem sido uma ferramenta precisa e bastante sensível na suspeita do diagnóstico de seps em RNs (Dutta et al., 2009; Galves, 2013).

A *Escherichia coli* foi a bactéria mais prevalente nos RNs independentemente da idade gestacional e do tempo de RPM, sendo, portanto, o principal microrganismo associado à infecção nesse estudo. Estes resultados corroboram com outros trabalhos semelhantes (Stoll et al., 2011; Barcaite et al., 2012; Tsai et al., 2012).

Atualmente, microrganismos gram-negativos têm

se destacado como agentes etiológicos da sepse neonatal, principalmente em RNs prematuros e com muito baixo peso ao nascer em países em desenvolvimento (Barcaite et al., 2012; Silva Junior, 2015).

Destaca-se ainda o desenvolvimento de diretrizes precocinando a profilaxia intraparto com a utilização de antibióticos, visando a redução dos casos de sepse neonatal causada pela bactéria *Streptococcus agalactiae*. Essa medida tem ocasionado a redução da incidência de sepse devido a esta bactéria nos últimos anos (Barcaite et al., 2012; Tsai et al., 2012).

No presente estudo ficou demonstrado que a prevalência da *Streptococcus agalactiae* foi alta, visto que 19,8% das amostras dos RNs, independentemente da idade gestacional e tempo de RPM, foram positivas para este microrganismo. De maneira semelhante, outra pesquisa recente na mesma região demonstrou alta prevalência para a *Streptococcus agalactiae*, sendo observado em 13,3% (n=20/150) das amostras provenientes de RNs com suspeita de sepse neonatal (Silva Junior, 2015).

A *Klebsiella pneumoniae* foi o patógeno com menor prevalência entre os RNs que compuseram o presente estudo. No mesmo estudo citado anteriormente utilizando a técnica de PCRtr heptaplex, foi constatada a baixa prevalência de *Klebsiella pneumoniae* (5,3% -n=8) em RNs com suspeita de sepse neonatal. No entanto, a incidência de *Klebsiella pneumoniae* em RNs com sepse neonatal relatada em outras pesquisas científicas variou de 10,1% a 26,9% (Lajos et al., 2008; Lopes et al., 2008; Menezes et al., 2008; Tragante et al., 2008; Labib et al., 2013), valores bastante superiores ao relatado no presente estudo.

Agradecimentos

Ao Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica funcional (NUFIGEN-ICB-UFMG) da Universidade Federal de Minas Gerais pelo apoio na realização das análises.

Declaração: Os autores declaram estar cientes e terem atendido integralmente às normas preconizadas para as pesquisas em seres humanos, conforme resolução 466/2012. Os autores declaram ainda ausência de conflito de interesse.

5. Referências

- Ballard JL, Khoury JC, Wedig L, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp, R. New Ballard score, expanded to include extremely premature infants. *Journal of Pediatrics*, 119, 417-423, 1991.
- Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Maleckiene L, Vitkauskiene A, Nadisauskiene R. Group B streptococcus and *Escherichia coli* colonization in pregnant women and neonates in Lithuania. *International journal of gynaecology and obstetrics*, 117, 69-73, 2012.
- Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal Infectious Diseases - Evaluation of Neonatal Sepsis. *Pediatric Clinics of North America*, 60, 367-389, 2013.
- Cezarino BN, Yamamoto L, Negro, GMBD, Rocha D, Okay TS. Diagnosis of neonatal group B Streptococcus sepsis by nested-PCR of residual urine samples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 21-24, 2008.
- Dutta S, Narang A, Chakraborty A, Ray P. Diagnosis of Neonatal Sepsis Using Universal Primer Polymerase Chain Reaction Before and After Starting Antibiotic Drug Therapy. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 163, 6-11, 2009.
- Ferreira J, Anchieta LM, Jesus LA, Pinto FS, Armond GA, Clemente WT, Bouzada MCF, Romanelli RMC. Notificação de Infecções em Unidade Neonatal com Critérios Nacionais. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 3, 75-81, 2013.
- Galves TCB. Determinação de DNA genômico de bactérias em neonatos com suspeita de sepse utilizando primer universal, 2013 [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS. Campo Grande/MS.
- Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Research Journal*, 17, 8390, 1989.
- Hackenhaar AA, Albernaz EP, da Fonseca TM. Preterm premature rupture of the fetal membranes: association with sociodemographic factors and maternal genitourinary infections. *Journal of Pediatrics*, 90, 197-202, 2014.
- Herbst A, Källén K. Time between membrane rupture and delivery and septicemia in term neonates. *Obstetrics & Gynecology*, 110, 612-168, 2007.
- Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2574-2578, 2000.
- Kacerovsky M, Musilova I, Andrys C, Hornychova H, Pliskova L, Kostal, M, Jacobsso B. Prelabor rupture of membranes between 34 and 37 weeks: the intraamniotic inflammatory response and neonatal outcomes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 210, 325-335, 2014.
- Krupa FG, Cecatti JG, Pires HMB, Surita F, Tedesco RP. Ruptura prematura de membranas em gestações a termo: revisão sobre condutas. *Revista de Ciências Médicas*, 14, 287-284, 2005.
- Labib AZ, Mahmoud AB, Eissa NAA, Gendy FME, Soliman MA, Aly AA. Early Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Molecular Approach and Detection of Diagnostic Markers Versus Conventional Blood Culture. *International Journal of Microbiological Research*, 4, 77-85, 2013.
- Lajos GJ, Passini Junior R, Nomura ML, Amaral E, Pereira BG, Milanez H, Parpinelli, MA. Colonização bacteriana do canal cervical em gestantes com trabalho de parto prematuro ou ruptura prematura de membranas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 30, 393-399, 2008.
- Lopes GK, Rossetto EG, Belei RA, Capobiango JD, Matsuo T. Estudo epidemiológico das infecções neonatais no Hospital Universitário de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Health Sciences*, 30,

- 55-63, 2008.
- Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, Menichella D. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 2252-2258, 2011.
- Menezes EA, Oliveria IRN, Salviano MNC, Ângelo MRF, Cunha FA, Alencar AM. Frequência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemoculturas no berçário de um hospital de Fortaleza. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 40, 7-11, 2008.
- Moreira M, Lemos S, Neto S, Oliveira M. Prevention of early-onset group B Streptococcal disease in newborns in the 21st century: from past to future. *Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa*, 7, 180-189, 2013.
- Nomura ML, Passini Júnior R, Oliveira UM, Calil R. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 31, 397-403, 2009.
- Patriota AF, Guerra GVQL, Souza ASR. Ruptura prematura das membranas antes da 35ª semana: resultados perinatais. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 36, 296-302, 2014.
- Polin RA, Committee on Fetus and Newborn. Management of neonates with suspect or proven early-onset bacterial sepsis. *Pediatrics*, 129, 1006-1015, 2012.
- Reis RBJ. Prevalência de DNA genômico para *Staphylococcus epidermidis* plasmô coagulase negativa em neonatos pré-termo maiores de três dias de vida e com quadro de piora de infecção, 2013 [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS. Campo Grande/MS.
- Silva Junior WP. Desenvolvimento e aplicação de um teste de PCR multiplex para a detecção rápida dos principais patógenos bacterianos na sepse neonatal precoce, 2015 [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS. Campo Grande/MS.
- Silveira RC, Procianny RS. Uma revisão atual sobre sepse neonatal. *Boletim Científico de Pediatria*, 1, 29-35, 2012.
- Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID 3rd, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Scharg SJ, Das A, Higgins RD, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Early Onset Neonatal Sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*, 127, 817-826, 2011.
- Tejada BM, Pfister RE, Renzi G, François P, Irion O, Boulvain M, Schrenzel J. Intrapartum group B streptococcus detection by rapid polymerase chain reaction assay for the prevention of neonatal sepsis. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1786-1791, 2011.
- Tragante CR, Ceccon MEJR, Falcão MC, Seiti M, Sakita N, Vieira RA. Prevalência de sepse por bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal. *Revista Paulista de Pediatria*, 26, 59-63, 2008.
- Tsai CH, Chen YY, Wang KG, Chen CY, Chen CP. Characteristics of early-onset neonatal sepsis caused by *Escherichia coli*. *Taiwan journal of obstetrics & gynecology*, 51, 26-30, 2012.

Editor Associado: Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva