

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**A MICROBIOTA DO MECÔNIO COMO UM PREDITOR
DE SEPSE NEONATAL PRECOCE CLÍNICA EM
RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LAURA VARGAS DORNELLES

Porto Alegre, Brasil 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**A MICROBIOTA DO MECÔNIO COMO UM PREDITOR
DE SEPSE NEONATAL PRECOCE CLÍNICA EM
RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS**

LAURA VARGAS DORNELLES

A apresentação desta Dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dra. Rita de Cássia dos Santos Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Soibelman Procianoy

Porto Alegre, Brasil 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Dornelles, Laura Vargas

A MICROBIOTA DO MECÔNIO COMO UM PREDITOR DE SEPSE
NEONATAL PRECOCE CLÍNICA EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS
/ Laura Vargas Dornelles. -- 2018.

85 f.

Orientadora: Rita de Cássia dos Santos Silveira.

Coorientador: Renato Soibelman Procianoy.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Sepsis neonatal. 2. Microbiota. 3. Microbioma.
4. Prematuridade. 5. Dissertação de mestrado. I.
Silveira, Rita de Cássia dos Santos, orient. II.
Procianoy, Renato Soibelman, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

28 / 03 / 2018

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr.ª Helena Ayako Sueno Goldani
Departamento de Pediatria e Puericultura/PPGSCA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Zubaran Goldani
Departamento de Pediatria e Puericultura/PPGSCA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Humberto Holmer Fiore
Departamento de Pediatria da PUCRS
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial ao meu marido, pelo amor incondicional em todos os momentos. Esta conquista também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Diego, pela fonte de carinho, paciência e companheirismo, essenciais para que eu conquistasse esta etapa.

Ao meus pais Rogério e Rejane, por acreditarem em mim e por me mostrarem a importância do esforço, do estudo e da dedicação para conquistar nossos objetivos.

À minha irmã Luísa, pela parceria e paciência durante a minha formação profissional.

À minha orientadora, Professora Rita de Cássia Silveira, pela orientação e pelo exemplo profissional como neonatologista e professora. És uma pessoa muito importante na minha formação e trajetória.

Ao Professor Renato Procianoy, pelos conhecimentos transmitidos, pela orientação e estímulo durante a minha formação.

À Professora Andréa Lúcia Corso, pelo apoio, companheirismo, carinho e exemplo profissional. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Ao Professor Luiz Fernando Roesch e sua equipe de pesquisa, pelas análises da microbiota e conhecimentos transmitidos.

A todos os professores e médicos contratados da UTI Neonatal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo aprendizado ao longo da minha formação e pela ajuda na coleta do material estudado.

Às médicas residentes em Neonatologia, pela ajuda na coleta do material estudado e pelo cuidado com os pacientes.

A toda a equipe multiprofissional da Unidade de Neonatologia e do Centro Obstétrico pelo auxílio e compromisso com a pesquisa e com os pacientes.

À secretária do Serviço de Neonatologia Eliane Cavalheiro, pelo apoio e carinho.

Ao FINE e CNPq, pelo financiamento da pesquisa.

Aos pacientes e suas famílias que contribuíram com sua participação, pelo interesse e boa vontade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, professores e funcionários, pelos ensinamentos e orientação.

RESUMO

Introdução: A sepse neonatal precoce continua sendo uma das principais causas de morbimortalidade relacionadas à prematuridade e o seu diagnóstico permanece de extrema dificuldade. O mecônio não é estéril, portanto, uma melhor compreensão do padrão inicial de colonização de microbiota intestinal em recém-nascidos (RN) prematuros pode ser uma ferramenta útil para melhorar o diagnóstico e o tratamento da sepse neonatal precoce.

Objetivo: Determinar a microbiota intestinal do primeiro mecônio de recém-nascidos prematuros com idade gestacional (IG) \leq 32 semanas e verificar sua associação com sepse neonatal precoce clínica.

Métodos: Foi obtido uma amostra da primeira eliminação de mecônio de prematuros com IG \leq 32 semanas nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em um estudo de coorte prospectiva controlado. A microbiota dos prematuros com o diagnóstico de sepse neonatal precoce clínica foi comparada ao grupo controle. Critérios de exclusão: malformações ou infecções congênitas; síndromes genéticas; mães portadoras do vírus HIV e não autorização de pais ou responsáveis legais. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até a extração do DNA. O DNA microbiano foi isolado a partir de amostras de mecônio usando o QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos). A qualidade do DNA foi determinada por espectrofotometria usando o espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare, Chicago, IL, Estados Unidos). A região V4 do gene rRNA 16S foi amplificada e sequenciada usando o ION PGM™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) com os iniciadores 515F e 806R, permANOVA foi utilizada para detectar variáveis de confusão.

Resultados: 84 prematuros foram incluídos; 40 (48%) com sepse neonatal precoce clínica e 44 (52%) sem sepse neonatal precoce (grupo controle). IG, peso ao nascer, tipo de parto e

outros dados maternos e neonatais foram semelhantes, exceto as seguintes características: tempo de bolsa rota (BR) e síndrome do desconforto respiratório (SDR). O tempo de BR > 18h (15, 37,5% e 5, 11,4%, $p = 0,03$) e SDR (21, 52,5% e 11, 25%, $p = 0,03$) foram mais frequente nos sépticos quando comparados ao grupo controle. O uso materno de antibiótico (ATB) e pelo RN no momento da coleta não influenciaram a comunidade microbiana do primeiro mecônio. O filo mais abundante encontrado nos dois grupos foi *Proteobacteria*, porém mais prevalente no grupo sepse ($p = 0,034$). Presença de sepse neonatal precoce clínica explicou 14% da variação entre as comunidades bacterianas ($p = 0,001$). Os gêneros mais associados ao grupo sepse foram: *Paenibacillus*, *Caulobacter*, *Dialister*, *Akkermansia*, *Phenylobacterium*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Bradyrhizobium*, *Alloprevotella* e no grupo controle: *Flavobacterium*.

Conclusão: Estes achados suportam a hipótese de que a microbiota do primeiro mecônio de RNs prematuros é diferente naqueles pacientes com e sem o diagnóstico de sepse neonatal precoce clínica. A identificação de comunidades bacterianas específicas de risco pode levar ao desenvolvimento de biomarcadores alternativos para o diagnóstico precoce da sepse neonatal.

Palavras-chave: prematuro, sepse neonatal precoce, microbiota intestinal, microbioma intestinal e mecônio.

Estudo financiado pelo CNPq e FIPE - Brasil e Fundação Bill e Melinda Gates.

ABSTRACT

Background: Early-onset neonatal sepsis (EONS) remains one of the main causes of morbidity and mortality related to prematurity, even with this clinical significance, its diagnosis remains extremely difficult. Meconium is not sterile, so a better understanding of initial gut microbiota colonization pattern in preterm infants may be a useful tool to improve the diagnosis and treatment of EONS.

Objective: To determine the intestinal microbiota of the first meconium of preterm infants with gestational age (GA) \leq 32 weeks and to verify its association with EONS.

Methods: First pass meconium sample of preterm infants with GI \leq 32 weeks born at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) was obtained in a prospective cohort study. The microbiota of the patients with the diagnosis of early neonatal sepsis was compared to the control group. Exclusion criteria: Malformations or congenital infections; Genetic syndromes; Mothers carrying the HIV virus and not authorization from parents or legal guardians. All samples were stored (-80°C) until DNA extraction. Microbial DNA was isolated from meconium samples using the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, United States). DNA quality was determined by spectrophotometry using NanoVue™ spectrophotometer (GE Healthcare, Chicago, IL, United States). The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced using the o ION PGM™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) with the primers 515F and 806R. perMANOVA was utilized to detect confounding variables.

Results: 84 premature were included; 40 (48%) with EONS and 44 (52%) without EONS (control group). GA, birth weight, type of delivery and other maternal and neonatal data were similar, except for the following characteristics: Premature Rupture of Membranes (PROM) $>$ 18h and respiratory distress syndrome (RDS), except infants with EONS had more PROM $>$

18h (15, 37.5% and 5, 11.4%, $p = 0.03$) and SDR (21.52.5% and 11.25%, $p = 0, 03$). The maternal use of antibiotic (ATB) and the use of ATB by the preterm at the time of meconium sampling did not influence the first meconium's microbial community. The most abundant phylum in both groups was *Proteobacteria*, being more common in the EONS group ($p = 0.034$). The main analysis showed that 14% of the variation among the communities can be explained by the presence of EONS ($p = 0.001$). The genera most found in the EONS group were: *Paenibacillus*, *Caulobacter*, *Dialister*, *Akkermansia*, *Phenylobacterium*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Bradyrhizobium*, *Alloprevotella* and in the control group: *Flavobacterium*.

Conclusion: These findings supports the hypothesis that first meconium microbiota from premature infants is different in those patients with and without EONS. Identifying microbial risk signatures might lead to the development of alternative biomarkers for early diagnosis of neonatal sepsis.

Key words: prematurity, early-onset neonatal sepsis, intestinal microbiome, intestinal microbiota and meconium.

Study supported by Grants from CNPq and FIPE - Brazil and Bill and Melinda Gates Foundation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Análise de coordenadas principais.....	72
FIGURA 2 – Alfa diversidade e índice de Shannon.....	73
FIGURA 3 – Abundância de filós.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características dos pacientes estudados.....	75
TABELA 1.A. Características maternas.....	75
TABELA 1.B. Características do recém-nascido.....	76
TABELA 2 – Análise de discriminância linear.....	77
TABELA 2.A. Gêneros mais associados com grupo sepse.....	77
TABELA 2.B. Gêneros mais associados com grupo não sepse.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AIG	Adequado para idade gestacional
ATB	Antibiótico
BMP	Projeto Microbioma Brasileiro
BR	Bolsa rota
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DBP	Displasia broncopulmonar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
ECN	Enterocolite necrosante
EONS	<i>Early-onset neonatal sepsis</i>
FDR	Chance de falso descobrimento
FIPE	Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas
GA	<i>Gestational age</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPIV	Hemorragia peri-intraventricular
IG	Idade gestacional
IL	Interleucina
LA	Líquido amniótico
LDA <i>score</i>	Escore de análise de discriminância linear
LPV	Leucomalácia periventricular
LVD	Laura Vargas Dornelles

MO	Microrganismo
OTU	<i>Operative taxonomic unit</i>
PASW	<i>Predictive Analytics Software</i>
PCA	Persistência do canal arterial
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
PCR	Proteína C reativa
<i>PCR</i>	Reação em cadeia da polimerase
PermANOVA	Análise de variância multivariada permutável não paramétrica
PIG	Pequeno para idade gestacional
PROM	<i>Premature rupture of membranes</i>
RDS	<i>Respiratory distress syndrome</i>
Relação I/T	Relação neutrófilos imaturos / neutrófilos totais
RN	Recém-nascido
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SDR	Síndrome do desconforto respiratório
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
UNIPAMPA	Universidade Federal do Pampa
UTIN	Unidade de terapia intensiva neonatal
UTO	Unidade taxonômica operacional
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

Algumas siglas foram mantidas em sua versão original em inglês, por serem assim internacionalmente conhecidas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. SEPSE NEONATAL PRECOCE	19
2.2. EXAMES LABORATORIAIS	20
2.2.1. Hemograma e proteína C reativa	20
2.2.2. Hemocultura de sangue periférico.....	22
2.2.3. Interleucinas	23
2.3. MICROBIOTA	24
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVOS.....	32
4.1. OBJETIVO GERAL	32
4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	32
5. HIPÓTESE	33
6. METODOLOGIA	34
6.1. POPULAÇÃO ESTUDADA	34
6.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	34
6.3. LOGÍSTICA.....	34
6.3.1. Análises laboratoriais da microbiota intestinal.....	35
6.3.1.1. Técnica para extração do DNA	35
6.3.1.2. Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento.....	35

6.3.1.3. Preparação dos dados para análise	37
6.4. VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	38
6.4.1. Variáveis dependentes	38
6.4.2. Variáveis independentes	39
6.5. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	40
6.6. DELINEAMENTO	41
6.7. CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8. ARTIGO.....	50
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
10. APÊNDICE	79
10.1. APÊNDICE A – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS	79
10.2. APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	83

1. INTRODUÇÃO

A sepse neonatal precoce continua sendo um problema frequente nas unidades de neonatologia mesmo após a melhora importante do manejo obstétrico, do cuidado pré-natal e do uso de antibiótico (ATB) intraparto quando indicado (POLIN, 2012). Esta doença atinge cerca de 1-20 recém-nascidos (RN) a cada 1000 nascidos vivos e é uma das principais responsáveis por um aumento significativo na morbimortalidade destes pacientes, (LACAZE-MASMONTEIL; ROSLYCHUCK; ROBINSON, 2014) sendo que para os prematuros a incidência, a gravidade e as complicações são ainda maiores e mais severas. Portanto, o diagnóstico e o tratamento precoce desta condição é de extrema importância (SILVEIRA; PROCIANOY, 1999).

Apesar desta significância no cotidiano dos neonatologistas, há uma grande dificuldade na identificação do RN efetivamente infectado, pois os testes diagnósticos laboratoriais disponíveis (hemograma, proteína C reativa, procalcitonina, citocinas), ainda tem um baixo valor preditivo positivo (VPP) e a hemocultura, que é o padrão ouro para o diagnóstico, apresenta sensibilidade relativamente baixa (MADAN *et al.*, 2012). Devido a esta dificuldade há um uso exagerado de ATB nas Unidades de tratamento intensivo neonatal (UTIN) para o tratamento de sepse precoce no recém-nascido, podendo chegar a 30 pacientes tratados empiricamente para cada caso de sepse confirmada (POLIN, 2012; LACAZE-MASMONTEIL; ROSLYCHUCK; ROBINSON, 2014). Contudo, além dos já conhecidos efeitos adversos, o uso de ATB no recém-nascido reduz a biodiversidade da microbiota intestinal (população de espécies microbianas que vive no intestino), o que pode estar relacionado à obesidade e à doença inflamatória intestinal (POLIN, 2012; LACAZE-MASMONTEIL; ROSLYCHUCK; ROBINSON, 2014).

Atualmente a comunidade científica está cada vez mais voltada para um melhor entendimento da microbiota intestinal neonatal. Em bebês saudáveis e a termo, o intestino e o sistema imune regulam esta comunidade microbiana, em contrapartida, a microbiota tem grande impacto na função imune e metabólica do intestino (WARDWELL; HUTTENHOVER; GARRETT, 2011). Sabe-se que o mecônio eliminado pelo recém-nascido não é estéril (JIMÉNEZ *et al.*, 2008; MADAN *et al.*, 2012) e cada vez mais evidências mostram que a microbiota do mecônio reflete a comunidade microbiana intrauterina (ARDISSONE *et al.*, 2014). O mecônio apresenta microbioma (material genético da população de espécies microbianas que vive no intestino) semelhante ao presente no cólon proximal e pode ser coletadas de uma forma não invasiva logo após o nascimento (MAI *et al.*, 2013).

Estudos mostram que o padrão do microbioma do prematuro já pode estar alterado desde o nascimento mostrando-se menos diversificado naqueles que desenvolverão sepse tardia (MADAN *et al.*, 2012).

Com a hipótese de que há uma diferença entre a microbiota intestinal do recém-nascido prematuro infectado e o não infectado ao nascer, o presente estudo tem como objetivo estudar a microbiota intestinal do mecônio do RN prematuro e avaliar sua associação ao desenvolvimento de sepse precoce clínica. Nós acreditamos que o entendimento deste microbioma possa sinalizar aqueles pacientes que estão em risco para sepse neonatal precoce.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. SEPSE NEONATAL PRECOCE

A sepse neonatal é uma síndrome clínica caracterizada por sinais sistêmicos de infecção acompanhada pela presença do microrganismo (MO) no primeiro mês de vida (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012). Esta infecção está associada a desfechos desfavoráveis e pode ser responsável por 16% de toda a mortalidade neonatal (BEDFORD; KUMAR, 2015). A incidência é elevada em recém-nascidos prematuros com menos de 1500g (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012) e o risco de desenvolver sepse e suas complicações aumenta com a redução da idade gestacional e do peso de nascimento do RN (VERGNANO *et al.*, 2011). Esta doença é dividida em sepse neonatal precoce, aquela que ocorre nas primeiras 72 horas de vida diretamente relacionada a fatores gestacionais e/ou periparto, e sepse neonatal tardia, aquela que ocorre após as 72 horas de vida.

O padrão-ouro para o diagnóstico de sepse é a hemocultura, porém temos a infecção confirmada por hemocultura positiva em menos de 1% de todas as admissões neonatais (VERGNANO *et al.*, 2011), dentre estes casos confirmados temos cerca de 10% de mortalidade (STOLL *et al.*, 2011). Mas sabemos que a sepse neonatal afeta muito mais do que do que isso, pois infecções com cultura negativa são bastante frequentes, e por isso, existe o receio de deixar de diagnosticar um paciente infectado com uma doença tratável (BEDFORD; KUMAR, 2015).

A apresentação clínica desta infecção é caracterizada por sintomas inespecíficos, como: apneia, taquipneia, esforço ventilatório, dificuldade de alimentação, alterações hemodinâmicas, entre outros, podendo ser encontrados em outros diagnósticos comuns do prematuro no período neonatal, como síndrome do desconforto respiratório (SDR), apneia da

prematuridade, dismotilidade intestinal do prematuro e persistência do canal arterial (PCA) por exemplo (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012).

O diagnóstico precoce é um grande desafio, principalmente no prematuro, tendo em vista a potencial gravidade desta doença associada a apresentação clínica inespecífica. Fatores de risco, como: bolsa rota por mais de 18h, trabalho de parto prematuro sem outra causa, febre materna ou diagnóstico confirmado de corioamnionite (BEDFORD; KUMAR, 2015), também contribuem para o diagnóstico clínico, mas não são suficientemente fortes para tal. Por isso necessitamos de exames complementares para o auxílio na confirmação diagnóstica.

Excluindo o raio-X de tórax, demais exames disponíveis da prática clínica diária são laboratoriais. Os principais são: hemograma completo, proteína C reativa, hemocultura periférica, procalcitonina e interleucinas. Estes dois últimos estão sendo cada vez mais estudados, mas ainda sem uso rotineiro nas UTIN.

2.2. EXAMES LABORATORIAIS

2.2.1. Hemograma e proteína C reativa

As mudanças hematológicas durante a infecção em prematuros podem ajudar como ferramentas diagnósticas e prognósticas, porém é importante lembrar que os valores de referências modificam de acordo com a idade gestacional, tem um amplo espectro de normalidade e estão muito associados a condições reacionais possivelmente presentes no período neonatal (MANZONI, 2015).

Tanto a proteína C reativa (PCR), como o hemograma e a procalcitonina não são suficientemente sensíveis nem específicas para justificar a decisão de iniciar, continuar ou

suspender um tratamento com ATB para sepse precoce em pacientes aparentemente doentes (BENITZ; WYNN; POLIN, 2015).

Em relação aos testes hematológicos, considera-se leucocitose no RN um total de leucócitos $> 25.000/\text{mm}^3$. Porém há inúmeras outras condições em que a leucocitose pode estar presente, como asfixia perinatal, febre materna, condições associadas ao estresse do trabalho de parto. Leucopenia (leucócitos $< 5.000/\text{mm}^3$) também pode estar associado à asfixia perinatal, hipertensão materna, hemorragia peri-intraventricular (HPIV) e hemólise. Isso mostra o valor limitado que o leucograma tem no diagnóstico de sepse neonatal. Todavia a neutropenia ($<1500/\text{mm}^3$) tem uma sensibilidade maior, chegando a 50%, além de ser preditora de gravidade. O mesmo acontece com a plaquetopenia ($<100.000/\text{mm}^3$) que está presente em 50% dos casos de sepse e pode estar associada a maior gravidade, porém também muito frequente em infecções congênicas e infecção fúngica invasiva (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012). A relação de neutrófilos imaturos e neutrófilos totais (relação I/T) tem melhor VPP para sepse quando $> 0,2$ (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012).

Os testes citados acima, leucograma e plaquetas, tem maior valor quando negativos, ou seja, apresentam um alto valor preditivo negativo (VPN). No entanto, o VPP destes testes para o diagnóstico de sepse neonatal precoce pode ser algo melhor quando obtido através de coletas seriadas o que permite visualizar se sua contagem está aumentado ou reduzindo (POLIN 2012). A partir destes dados, monitorar valores de leucócitos totais, neutrófilos e plaquetas pode fornecer uma informação importante a respeito da progressão da doença e da resposta ao tratamento (MADAN *et al.*, 2012; MANZONI, 2015). Porém esta abordagem necessita de punções venosas e retirada de sangue seriada, o que é sabido ser de grande risco para os pacientes prematuros.

Outro score que também tem alto VPN e baixo VPP é o Escore de Rodwell que leva em consideração: contagem de leucócitos, contagem de neutrófilos, aumento de

polimorfonucleares imaturos, aumento da relação I/T $> 0,3$, contagem de plaquetas $< 150.000/\text{mm}^3$ e presença de alterações degenerativas nos neutrófilos. Noventa por cento dos RN a termo e 66% dos prematuros com escore $>$ ou $=$ a 3 não apresentaram sepse comprovada (POLIN, 2012).

Lacaze-Masmonteil *et al.* dosaram uma única vez o valor da PCR com aproximadamente 18 horas de vida com o objetivo de excluir sepse precoce, como resultado chegaram a 93% de VPN e 14% de VPP. Logo, um valor de PCR elevado isolado não pode ser utilizado como razão para manter o uso de antibióticos (LACAZE-MASMONTEIL; ROSLYCHUCK; ROBINSON, 2014). O valor da PCR tende a estar normal nas primeiras horas de vida mesmo em RN infectados, por isso aumentamos a eficácia do teste ao fazermos uma coleta no momento da suspeita diagnóstica e outra com aproximadamente 18-24h, pois este marcador de fase aguda necessita de pelo menos 12h para ter seu níveis séricos aumentados (BEDFORD; KUMAR, 2015).

2.2.2. Hemocultura de sangue periférico

Nos casos em que há suspeita de sepse, está indicado o início de um esquema de antibiótico de amplo espectro após a coleta da hemocultura de sangue periférico (cerca de 1 mL de sangue). Esta coleta deve ser feita de forma asséptica através de punção de vaso periférico em um sistema fechado (BEDFORD; KUMAR, 2015). É sabido que 1/4 dos RN com sepse tem bacteremia com baixa contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) (DIETZMAN; FISCHER; SCHOENKNECHT, 1974; SCHELONKA *et al.*, 1996; KELLOG *et al.*, 1997), por este motivo um volume menor do que 1 mL mostrou-se insuficiente para detectar o MO em questão (CONNELL *et al.*, 2007).

Este exame continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico de sepse em recém-nascidos, porém sua sensibilidade é baixa nos casos de sepse neonatal, não ultrapassando cerca de 80%. A eficácia deste teste diagnóstico depende do meio de cultura e do MO. Em geral em 48-72h, se houver crescimento na hemocultura, já saberemos o patógeno responsável. Porém este exame não entrega o resultado de forma imediata e pode ser mascarado ou alterado devido ao uso de ATB intraparto na gestante de risco (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012; LACAZE-MASMONTEIL; ROSLYCHUCK; ROBINSON, 2014; ZHOU *et al.*, 2015). Os microrganismos normalmente encontrados na sepse neonatal precoce são: *Streptococcus* do Grupo B (18,2%) e *Escherichia coli* (33,4%) (HORNICK *et al.*, 2012).

2.2.3. Interleucinas

Na busca de novos métodos diagnósticos, interleucinas (IL) pró-inflamatórias e marcadores de fase aguda, estão sendo estudados. Citocinas são sintetizadas e liberadas em resposta ao estímulo inflamatório de forma precoce, podendo ser um marcador de sepse precoce. Silveira *et al.* estudaram o valor da dosagem das seguintes interleucinas para o diagnóstico de sepse neonatal precoce: interleucina-6 (IL-6), interleucina1 β (IL-1 β) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa), em todos os recém nascidos com suspeita de infecção nos primeiros 5 dias de vida. Obtiveram como resultado que valores mais elevados de IL-6 e TNF-alfa estão presentes em recém-nascidos com clínica de infecção em relação aos não infectados e sua combinação fornece uma sensibilidade de 98,5% para o diagnóstico de sepse precoce. E ainda que a IL-1 β não é um bom marcador para sepse neonatal precoce pois os monócitos dos recém-nascidos secretam esta interleucina em menor quantidade (SILVEIRA; PROCIANOY, 1999).

Chiesa *et al.* estudaram IL-6 e seu efeito na sepse precoce, já é sabido que esta interleucina é uma ótima candidata para o diagnóstico de inflamação intra-amniótica levando ao parto prematuro (dosagem no sangue de cordão), estando associada a chamada síndrome da resposta inflamatória fetal. Este diagnóstico reconhece os pacientes que estão em risco de ter um desfecho neonatal ruim, em particular a sepse neonatal precoce. Porém mais estudos são necessários para melhor esclarecer o comportamento da IL-6 *in útero* e pós-natal (CHIESA *et al.*, 2015).

Assim como a IL-6, a interleucina-8 (IL-8) também pode ser um marcador útil quando utilizada combinada com outros meios diagnósticos clínicos, laboratoriais e microbiológicos. IL-8 eleva-se com 1-2 horas de infecção e tem uma meia vida em torno de 4 horas, permitindo um diagnóstico mais precoce (ZHOU *et al.*, 2015).

2.3. MICROBIOTA

Com o mesmo objetivo de um melhor conhecimento e maior entendimento das doenças do período neonatal, atualmente existem estudos do microbioma intestinal dos RN e lactentes. O mecônio eliminado pelo recém-nascido não é estéril (MADAN *et al.*, 2012; JIMÉNEZ *et al.*, 2008), cada vez mais evidências mostram que o microbioma do mecônio reflete a comunidade microbiana intrauterina (ARDISSONE *et al.*, 2014). Em bebês saudáveis e a termo o intestino e o sistema imune regulam esta comunidade microbiana, em contra partida, a microbiota tem grande impacto na função imune e metabólica do intestino (WARDWELL; HUTTENHOVER; GARRETT, 2011).

A microbiota intestinal não é somente uma coleção de indivíduos conectados, ela representa um grande organismo complexo que evolui continuamente (LAYEGHIFARD; HWANG; GUTTMAN, 2017). O corpo humano é entendido com um superorganismo

comandado por um genoma humano e múltiplos genomas microbianos (LAYEGHIFARD; HWANG; GUTTMAN, 2017). Logo, devemos buscar o entendimento deste microbioma com um todo, buscando o momento do desequilíbrio, ou da mudança da composição do mesmo, e não apenas buscar um microrganismo responsável pelo desencadeamento da doença em questão (DOBBLER *et al.*, 2017).

A descoberta de um possível eixo cérebro-intestino-microbioma intestinal, onde células epiteliais intestinais interagem com circuitos nervosos, está ganhando cada vez mais destaque. Esta comunicação pode ter implicações na motilidade intestinal, na tolerância da dieta por RN e até mesmo na fisiopatologia de doenças intestinais agudas e crônicas (RHEE; POTHOUKAKIS; MARYER, 2009). A comunidade bacteriana comensal é responsável pelo desenvolvimento e manutenção das funções sensoriais e motoras do intestino, por liberação de substâncias bacterianas, fermentação e por interação com fatores neuroendócrinos, além de estar intimamente relacionado com o sistema imune (INDRIO; NEU, 2011). Para estudar a microbiota usamos as definições que levam em consideração a quantidade de espécies e a abundância nas comunidades: diversidade alfa avalia a diferença da microbiota dentro de cada amostra e a diversidade beta avalia a diferença da microbiota entre amostras diferentes.

Hansen *et al.* analisaram o mecônio de 15 RN saudáveis e a termo, nascidos de parto vaginal e amamentados exclusivamente ao seio materno. Em dois terços das amostras foram detectadas bactérias, sugerindo que a colonização bacteriana existe, porém ainda limitada a um número pequeno de espécies detectadas. Esta colonização progride rapidamente após o nascimento com o aumento na sua diversidade, permitindo que se inicie uma relação comensal ou simbiótica com o hospedeiro (MAI *et al.*, 2011; MAI *et al.*, 2013; HANSEN *et al.*, 2015). Todavia nenhum mecônio foi obtido antes de 200 minutos após a ruptura de membranas amnióticas, considerado um intervalo que permite mudanças no microbioma estudado (HANSEN *et al.*, 2015). Esta dificuldade torna-se ainda mais significativa quando

estamos estudando prematuros, pois a eliminação do mecônio pode levar mais de um dia para acontecer. Essa demora está associada a condições clínicas do bebê e ao trânsito intestinal lento e imaturo destes pacientes.

Os filos mais encontrados em bebês a termo saudáveis no mecônio foram: *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, e não foi encontrada associação da contagem bacteriana com o tempo de ruptura de membranas ou com o tempo até a eliminação do mecônio (HANSEN *et al.*, 2015). Da mesma forma, comunidades com predominância de *Bifidobacterium*, gênero pertencente ao filo *Actinobacteria*, foram específicas de pacientes saudáveis, quando comparados com RN com o diagnóstico de sepse tardia, estando mais associadas a um intestino maduro e saudável (STEWART *et al.*, 2017). Também foi descoberto que o atraso na colonização pelo filo *Proteobacteria*, o qual faz parte da colonização normal nas primeiras semanas de vida, pode levar a uma resposta imune excessiva comprometendo a barreira mucosa intestinal e facilitando a translocação bacteriana para a circulação sanguínea (MAI *et al.*, 2013). Em estudo longitudinal, foi observado um padrão caótico de mudanças na composição da microbiota ao longo de 5 semanas nos casos de enterocolite necrosante (ECN) quando comparados aos controles. Nos controles, houve um aumento progressivo e constante de *Firmicutes* e redução de *Proteobacteria*, alcançando um ambiente com composição mais balanceada na quinta semana de vida (DOBLER *et al.*, 2017).

Porém alguns estudos já mostraram um aumento de *Proteobacteria* antecedendo o diagnóstico de sepse tardia (MAI *et al.*, 2013) e o diagnóstico de ECN (MAI *et al.*, 2011). As espécies *Citrobacter koseri* e *Klebsiella pneumoniae*, ambos pertencentes ao filo *Proteobacteria*, mostraram-se dominantes na microbiota de casos que desenvolveram ECN e, por isso, provavelmente podem ser consideradas biomarcadores para o diagnóstico precoce de enterocolite (DOBLER *et al.*, 2017). Nestes mesmos pacientes, os casos de ECN mostram

uma microbiota menos diversificada e com menor abundância de *Lactobacillus* (DOBBLER *et al.*, 2017), além disso evidenciaram que os pacientes doentes apresentavam espécies mais interligadas e mais agrupadas em relação aos controles, mostrando uma comunidade mais densamente relacionada (DOBBLER *et al.*, 2017). O fato de haver uma redução da diversidade de bactérias prévio ao diagnóstico da doença, mostra que a bactéria patogênica em questão pode estar mais abundante e as protetoras, em menor número (DOBBLER *et al.*, 2017).

O mecônio é menos diversificado em recém-nascidos que irão desenvolver infecção (MADAN *et al.*, 2012), sugerindo que a falta de colonização por bactérias não patogênicas facilita a colonização por bactérias patogênicas, podendo aumentar o risco de doenças infecciosas (MAI *et al.*, 2013). Além disso, o uso empírico e prolongado de antibióticos, a demora em iniciar a dieta enteral e a instabilidade hemodinâmica nos recém-nascidos prematuros, provoca redução da diversidade microbiana, prejudica a integridade da barreira mucosa intestinal e aumenta o risco de infecções (MADAN *et al.*, 2012; MAI *et al.*, 2013).

O RN engole líquido amniótico (LA) durante a gestação, ingerindo MO presentes neste líquido, resultando na colonização bacteriana intestinal fetal (ARDISSONE *et al.*, 2014). Ardissonne *et al.* mostraram que o microbioma materno que mais se aproxima do meconial é o do LA, quando comparado ao oral e vaginal, e que microbioma fetal intestinal pode estar envolvido na resposta inflamatória que leva ao trabalho de parto prematuro. A idade gestacional foi a variável de maior importância na estrutura da comunidade bacteriana, logo há diferença na colonização microbiana nas diferentes idades gestacionais. Os filos *Firmicutes* e *Actinobacteria* estão correlacionados com menor idade gestacional. (ARDISSONE *et al.*, 2014).

Estudos de sequenciamento genético do microbioma intestinal e tecnologia molecular permitem gerar hipóteses do papel bacteriano em pacientes saudáveis ou doentes, além de

implicações na alteração da colonização intestinal do recém-nascido prematuro em relação ao RN a termo saudável (MAI *et al.*, 2013). É sabido que existe interação sinérgica entre o hospedeiro e os microrganismos, e que esta interação interfere no metabolismo, na nutrição, na resposta imune e na própria construção da comunidade bacteriana deste hospedeiro, mantendo e fortalecendo a barreira mucosa intestinal (KINROSS; DARZI; NICHOLSON, 2011; MAI *et al.*, 2013; BERRINGTON *et al.*, 2014). Este equilíbrio pode ser destruído rapidamente, principalmente em situações desencadeadas pela prematuridade, como instabilidade hemodinâmica e infecções. Esta ruptura no funcionamento do sistema é chamada disbiose.

Padrões de disbiose estão sendo estudados com objetivo de prevenir, monitorar e de encontrar alternativas terapêuticas em casos de enterocolite necrosante e sepse tardia em RN prematuros, pois já é sabido que este desequilíbrio está associado a estas duas patologias citadas acima (BERRINGTON *et al.*, 2014), mostrando que as comunidades bacterianas de pacientes doentes (com o diagnóstico de sepse tardia ou enterocolite) é diferente daqueles saudáveis (MAI *et al.*, 2011; STEWART *et al.*, 2012).

Além de tentar definir se esta disbiose pode ser a causa destas doenças, devemos nos perguntar se temos como manipular o microbioma de prematuros doentes ou não, a partir de engenharia genética, para este se assemelhar com o microbioma de RN a termo e saudáveis (BERRINGTON *et al.*, 2014).

Outra condição que pode desencadear a disbiose é o uso de antibióticos de amplo espectro, ainda não é sabido como exatamente isto acontece, porém a principal hipótese é que ocorra alteração da comunidade bacteriana comensal, ou seja, perda da proteção realizada por estas bactérias, permitindo que bactérias patogênicas entrem em contato com a mucosa intestinal, onde há células com propriedades imunológicas e inflamatórias (NEU, 2015). O uso de ATB nos primeiros dias de vida pelo RN, principalmente relacionado ao diagnóstico

de sepse precoce, aumenta o risco do aparecimento de sepse neonatal tardia (SHAH *et al.*, 2013). Todavia, apenas 2% dos pacientes tratados para sepse precoce presumida realmente têm cultura positivo (STOLL; HANSEN, 2003), gerando um uso indiscriminado de ATB nesta população (NEU, 2015).

O entendimento deste microbioma pode mostrar aqueles pacientes que estão em risco para sepse. Madan *et al.* estudaram 6 pacientes prematuros e viram que o mecônio não é estéril e que aqueles que desenvolveram sepse tardia já apresentavam uma menor biodiversidade nas fezes desde o nascimento, além da predominância de *Staphylococcus* neste mesmo grupo. Este estudo sugere que possa existir um microbioma saudável que possa reduzir o risco de sepse em prematuros (MADAN *et al.*, 2012). Apesar desta hipótese, ainda não está claro qual seria este padrão de colonização microbiana que diferenciaria um RN saudável daquele que apresentará uma piora clínica infecciosa (BERRINGTON *et al.*, 2014).

Taft *et al.* também estudaram as fezes de RN prematuros com o objetivo de ver a variação da microbiota naqueles com e sem sepse tardia. Identificaram concordância em 82% dos casos entre a bactéria causadora da sepse tardia e a identificada na amostra de fezes que antecedeu o diagnóstico da sepse (TAFT *et al.*, 2015). Estudos anteriores mostraram concordância de 64% a 95% (GRAHAM *et al.*, 2007; CARL *et al.*, 2014). Estes MO não são encontrados em RN saudáveis, o principal exemplo é o *Staphylococcus*. Stewart *et al.* mostraram achado semelhante, a espécie presente na hemocultura dos pacientes diagnosticados com sepse tardia corresponde a primeira ou segunda unidade taxonômica operacional (UTO) mais comum no microbioma intestinal próximo ao diagnóstico desta infecção (STEWART *et al.*, 2017), permitindo a sugestão de translocação bacteriana. Porém, neste mesmo estudo, não foi possível identificar um padrão de microbiota logo antes do desenvolvimento da sepse.

Mai *et al.* também estudaram a microbiota intestinal em bebês com diagnóstico de sepse tardia e compararam com aquela de controles saudáveis. Analisaram as amostras de 2 semanas antes, 1 semana antes e a mais próxima ao diagnóstico de sepse tardia. Os grupos não apresentaram diferença na alfa diversidade em nenhum dos momentos, porém a beta diversidade foi significativamente diferente com 1 e 2 semanas antes do diagnóstico, tendo aproximadamente 10% e 12% de variação explicada pelo sepse tardia, respectivamente (MAI *et al.*, 2013). Neste estudo não foi possível identificar diferença na abundância de *Staphylococcus* entre os grupos caso e controle, mas detectaram uma proporção maior do filo *Firmicutes* (*Staphylococcus* pertence a este filo) 2 semanas antes do diagnóstico nos casos de sepse tardia.

É evidente que o intestino serve como uma interface entre o meio interno e externo e que esta interação está associada aos estados de saúde e doença. Estudos recentes estão em busca daqueles casos em que a manipulação de microbioma pode resultar em benefício para o paciente em questão (INDRIO; NEU, 2011).

Diante disso, um melhor entendimento sobre a colonização microbiana do trato gastrointestinal do recém-nascido no período pós-natal imediato e a sua possível relação com a sepse precoce é essencial, principalmente para os recém-nascidos prematuro que estão mais expostos a infecção e seus critérios diagnósticos são ainda mais inespecíficos.

3. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos mostram a dificuldade de diagnosticar de forma confiável a sepse neonatal precoce clínica. O padrão ouro continua sendo a hemocultura positiva, porém seu resultado positivo é encontrado em apenas uma parcela dos casos, além de ter seu resultado alterado quando realizado em RN de mãe que recebeu antibiótico intraparto. Desta forma o diagnóstico de sepse clínica ou presumida é largamente empregado na UTIN, resultando no uso empírico de antimicrobianos.

Métodos diagnósticos complementares, como hemograma completo, PCR, citocinas, escore de Rodwell, além da apresentação clínica do paciente não tem valor preditivo positivo confiável para determinar com certeza se o paciente possui sepse neonatal precoce. Estes apresentam maior valor diagnóstico quando seus resultados são negativos (VPN elevado) ou quando realizados de forma seriada, na intenção de suspender um eventual tratamento iniciado previamente. A sepse neonatal precoce, por definição, é a infecção sistêmica do RN nas primeiras 72 horas de vida, logo, há uma urgência em ter um diagnóstico precoce e confiável para tal, devido a sua rapidez de instalação e alta morbimortalidade.

O papel da microbiota intestinal comensal na manutenção da vida saudável vem ganhando cada vez mais importância nas comunidades científica e clínica. As fezes apresentam microbiota semelhante a presente no cólon proximal e podem ser coletadas de uma forma não invasiva.

Visto que neste cenário não existem estudos avaliando a microbiota do RN com sepse neonatal precoce, nosso estudo é inovador ao buscar descobrir se há alguma associação na microbiota do RN que possa prever sepse precoce melhor do que os exames disponíveis na nossa prática diária, possibilitando um maior entendimento desta doença tão comum em nosso dia-a-dia, além de uma definição diagnóstica com maior agilidade e confiabilidade.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a associação entre sepse clínica neonatal precoce e a microbiota do mecônio no prematuro com idade gestacional menor ou igual a 32 semanas.

4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar a diversidade da microbiota do mecônio do RN prematuro com idade gestacional menor ou igual a 32 semanas com sepse clínica neonatal precoce e sem sepse clínica neonatal precoce.

5. HIPÓTESE

É possível determinar diferença entre a microbiota do mecônio do recém-nascido prematuro com e sem sepse clínica neonatal precoce.

6. METODOLOGIA

6.1. POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram estudados recém-nascidos prematuros com idade gestacional menor ou igual a 32 semanas, nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e internados na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal dessa mesma instituição.

6.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Presença de malformações congênitas ou síndromes genéticas;
- Infecções congênitas;
- Mães portadoras do vírus HIV;
- Não autorização dos pais ou responsáveis legais.

6.3. LOGÍSTICA

Ao ocorrer um nascimento prematuro com idade gestacional menor ou igual a 32 semanas no Centro Obstétrico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, preenchendo critérios de inclusão e exclusão, a família foi contatada para solicitar autorização para inclusão na pesquisa, após um número de inclusão foi gerado para iniciar o protocolo de coleta de dados (ANEXO I). Um termo de consentimento livre esclarecido (ANEXO II) foi lido e fornecido para autorizar a inclusão do filho ou tutelado na pesquisa, com todas as questões e dúvidas esclarecidas pelo pesquisador principal (LVD).

Após a autorização concedida, foi coletada a primeira eliminação de mecônio do recém-nascido. Esta coleta foi realizada de forma estéril. A seguir, a amostra foi armazenada

em tubo estéril com glicerol na diluição 1:1 e após imediatamente congelada e armazenada em botijão criogênico até ser transportado para o laboratório da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), onde foi feita a extração do DNA microbiano e a posterior análise da composição da comunidade microbiana. Todas as amostras de fezes foram imediatamente congeladas a -80°C em frascos com tampa rosca adequados para não ocorrer derramamentos, até o momento da extração de DNA e análise da composição da comunidade bacteriana. Sempre que um botijão criogênico estivesse com a sua capacidade de armazenamento completa, este era transportado por carro até a UNIPAMPA.

6.3.1. Análises laboratoriais da microbiota intestinal

6.3.1.1. Técnica para extração do DNA

O DNA microbiano total foi extraído a partir de amostras de 200-300mg de fezes usando o *kit* QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante e modificado pela inclusão de uma etapa adicional de lise mecânica. A pureza do DNA genômico total foi analisada com auxílio de espectrofotômetro tipo NanoVue™ (GE Healthcare, Chicago, IL, Estados Unidos) através da medição da razão entre absorvância a 260 e 280nm Aubit® 2.0. Em posse da concentração de DNA total, todas as amostras foram diluídas de acordo com aquela de menor concentração para que cada amostra contivesse a mesma concentração de DNA. O DNA foi congelado a -80°C até o momento da amplificação do gene 16S e sequenciamento.

6.3.1.2. Amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento

A diversidade, abundância e estrutura das comunidades microbianas foram estimadas com base na metodologia proposta por Roesch *et al.* (ROESCH *et al.*, 2007) e Fulthorpe *et al.* (FULTHORPE *et al.*, 2008) para o sequenciamento do gene 16S por meio da plataforma ION PGM™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Para cada amostra de DNA microbiano foi amplificado o gene 16S a partir dos oligonucleotídeos iniciadores universais, recomendados pelo Human Microbiome Project, 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), para amplificação de MO do domínio *Bacteria* e *Archaea* (CAPORASO *et al.*, 2012).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados juntamente com os adaptadores A-Key (5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG'3) e P1-Key (5'CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT'3) para a obtenção de uma sequência de oligonucleotídeos iniciadores única (*primer fusion*). Múltiplas amostras foram analisadas em uma única utilização do instrumento ION PGM™ e para tanto, foram adicionados à região 5' dos oligonucleotídeos iniciadores, 10 bases conhecidas (código de barras) que serviram para posterior identificação da origem de cada sequência segundo metodologia proposta por Hamady *et al.* (HAMADY *et al.*, 2008).

Múltiplas amostras foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (*PCR*) usando iniciadores codificados em código de barras ligados à sequência do adaptador "A" (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') e à sequência do adaptador "P1" (5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3') para obter uma sequência iniciadora composta pelo adaptador A-barcode-806R e P1-515F. A reação de *PCR* foi feita em 25 µL e consistiu em 2U de Platinum® Taq DNA High Fidelity Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 4 µL 10X High Fidelity *PCR* Buffer, 2 mM MgSO₄, 0,2 mM dNTP's, 0,1 µM de ambos os iniciadores descritos acima, 25 µg de UltraPure BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e aproximadamente 50 ng de DNA molde.

As condições de *PCR* utilizadas foram: 95 °C durante 5 min, 35 ciclos a 94°C por 45s; 56 °C por 45s e 72 °C por 1 min.; seguidos por 10 min a 72°C. Os produtos de *PCR* resultantes foram purificados com o Reagente Agencourt[®] AMPure[®] XP (Beckman Coulter, Brea, CA, Estados Unidos) e a concentração final do produto de *PCR* foi quantificada usando o *kit* Fluorômetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante.

Por fim, as reações foram combinadas em concentrações equimolares a fim de se criar uma mistura composta por fragmentos amplificados do gene 16S de cada amostra. Tal amostra composta foi utilizada para a preparação da biblioteca com o sistema Ion OneTouch[™] 2 usando o *kit* ION PGM[™] Template OT2 400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). O sequenciamento foi realizado utilizando o *kit* comercial ION PGM[™] Sequencing 400 no ION PGM[™] System usando Ion 318[™] Chip v2 com um máximo de 40 amostras por microchipe.

6.3.1.3. Preparação dos dados para análise

Os arquivos Fastq exportados do sistema ION PGM[™] foram analisados com base nas recomendações do Projeto Microbioma Brasileiro (BMP) (PYLRO *et al.*, 2014) usando o Sistema Operacional BMP (PYLRO *et al.*, 2016). Em síntese, uma tabela de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) foi elaborada utilizando-se o *pipeline* UPARSE (EDGAR, 2013), onde as sequências foram cortadas a 200 bases e filtradas por qualidade usando um erro máximo esperado de 0,5. As sequências foram reunidas em UTO usando um critério de 97% similaridade para o agrupamento e sequências quiméricas foram removidas (EDGAR, 2013). A classificação taxonômica foi realizada usando o *software* QIIME (CAPORASO *et al.*, 2010) com base no método UCLUST contra o banco de dados Greengenes 13.5

(MCDONALD *et al.*, 2012) com um limite de confiança de 80%. O esforço de amostragem foi estimado usando o cálculo de cobertura de proposto por Good (GOOD, 1953).

Toda a técnica para extração do DNA, amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento, assim como a classificação filogenética dos genes do 16SrRNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAMPA, sob a responsabilidade do Dr. Luiz Roesh.

6.4. VARIÁVEIS DO ESTUDO

6.4.1. Variáveis dependentes

As variáveis principais em estudo foram sepse neonatal precoce e análise da microbiota intestinal, classificada por meio da ferramenta de classificação disponível no Greengenes *website* (<http://greengenes.lbl.gov/>).

Devido à baixa sensibilidade e ao número desprezível de hemoculturas positivas nas primeiras 72 horas de vida, utilizamos o diagnóstico de sepse neonatal precoce clínica, definida como: presença de três ou mais sinais clínicos no recém-nascido ou no mínimo dois destes sinais associados a fatores de risco materno, sendo eles:

- Sinais clínicos no recém-nascido: apneia, taquipneia, batimento de asa nasal, tiragem intercostal, cianose, esforço respiratório, taquicardia ou bradicardia, perfusão ruim ou choque, irritabilidade, letargia, hipotonia, convulsão, distensão abdominal, vômito, diarreia, intolerância alimentar, resíduo gástrico, hepatomegalia, instabilidade térmica, icterícia inexplicada, petéquia ou purpura, “recém-nascido parece não estar bem”.

- Fatores de risco maternos: febre, bolsa rota por mais de 18 horas, trabalho de parto prematuro.

6.4.2. Variáveis independentes

- Dados maternos e obstétricos:

- Tipo de parto: vaginal ou cesariana;
- Tempo de bolsa rota (BR);
- Infecção do trato urinário: confirmada por urocultura;
- Corioamnionite: diagnóstico anatomopatológico;
- Uso de antibiótico;
- Pré-eclâmpsia: pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou diastólica ≥ 90 mmHg após a vigésima semana de gestação, acompanhada por proteinúria > 300 mg em amostra de urina de 24h, sem hipertensão previa ou doença renal (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005).

- Idade gestacional (IG): variável contínua (dias) e avaliada por ultrassom obstétrico precoce (realizado nas primeiras 12 semanas da gestação). Na ausência deste dado, a IG baseou-se no exame clínico neonatal, New Ballard Score (BALLARD *et al*, 1991).

- Peso de nascimento: variável numérica contínua.

- Sexo: masculino/feminino.

- Escore de Apgar no 5ºmin (0-10).

- Adequação quanto a idade gestacional de acordo com a curva de crescimento revisada por Fenton, TR em 2013 (FENTON; KIM, J. H., 2013): em pequeno para a idade gestacional (PIG), aquele RN cujo peso ao nascimento, em relação à idade gestacional, estiver abaixo do percentil 10 da curva de crescimento intra-uterino e adequado para a idade gestacional (AIG),

aquele RN cujo peso de nascimento, em relação à idade gestacional, estiver acima do percentil 10 e abaixo do percentil 90 da curva de crescimento intra-uterino.

- Morbidades e intercorrências do recém-nascido:

- Síndrome do desconforto respiratório (SDR);
- Displasia broncopulmonar (DBP): necessidade de oxigênio suplementar aos 28 dias de vida (JOBE; BANCALARI, 2001; EHRENKRANZ *et al.*, 2005);
- Sepses neonatais tardias: hemocultura positiva após 72 horas de vida, acompanhadas de sinais clínicos de infecção;
- Enterocolite necrosante (ECN): presença de pneumatose e/ou pneumoperitônio;
- Hemorragia peri-intraventricular (HPIV) grau 2 ou maior: diagnosticada por ecografias cerebrais seriadas (PAPILE *et al.*, 1978);
- Leucomalácia periventricular (LPV): diagnóstico através de ecografia cerebral com a visualização de lesão da substância branca periventricular (componente difuso e/ou cístico);
- Persistência do canal arterial (PCA): diagnóstico realizado com ecocardiograma;
- Alta ou óbito.

Todas essas variáveis foram obtidas pela revisão de prontuários e longitudinalmente durante o acompanhamento do recém-nascido na UTIN, com devido registro em protocolo de coleta de dados individual (ANEXO I).

6.5. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Para medir a relação entre sepses e a diversidade da comunidade bacteriana, estimando um coeficiente de determinação maior do que 0,10 como relevante, conforme estudo realizado por Mai *et al.* quando estudado microbioma e sepses tardias em prematuros (MAI *et al.*, 2013).

Ou seja, uma correlação acima de 0,32, o cálculo de amostra foi de 85 sujeitos. Foi utilizado um poder de 80% e um nível de significância de 0,05. O cálculo foi realizado no WINPEPI versão 11.44.

6.6. DELINEAMENTO

Estudo de coorte prospectivo com amostra de conveniência.

6.7. CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos no estudo foram armazenados em banco de dados constituído para esse fim específico, utilizando o programa Excel. Posteriormente os dados foram processados e analisados com o auxílio do programa *Predictive Analytics Software* (PASW), versão 18.0 *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS). Os resultados foram descritos através de média e desvio-padrão (DP) (distribuição simétrica) ou mediana e intervalo interquartil (distribuição assimétrica). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências e percentuais. Para comparar as variáveis quantitativas em relação à presença ou não de sepe foram aplicados ou teste *t* de Student (distribuição simétrica) ou teste de Mann-Whitney (distribuição assimétrica). Para as variáveis qualitativas foi empregado o teste Qui-quadrado. O nível de significância estatística para qualquer uma das análises foi considerado para um valor de $\alpha = 0,05$.

Todas as bibliotecas (amostras) de genes 16S rRNA foram normalizadas por reamostragem aleatória das sequências de acordo com as recomendações de Lemos *et al.* (LEMOS *et al.*, 2011). O arquivo BIOM, contendo as UTO agrupadas a um nível de similaridade de 97%, foi importado para o ambiente R (R Development Core Team, 2008) e

uma matriz de dissimilaridade composicional foi gerada com base em distâncias binomiais entre amostras usando o pacote "*phyloseq*" (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

Para avaliar as diferenças na estrutura da comunidade microbiana uma matriz de dissimilaridade entre amostras usando a distância binomial foi calculada usando Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A matriz foi utilizada em uma análise de variância multivariada permutável não paramétrica (perMANOVA) com a função *Adonis* disponível no pacote *vegan* (OKSANEN *et al.*, 2015) para detectar variáveis de confusão. Para estimar a alfa diversidade, o número de UTO e o Índice de Diversidade de Shannon foram calculados e plotados usando o pacote "*phyloseq*" (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Estes foram descritos com mediana e intervalo interquartil e foi utilizado o teste de Mann-Whitney para o cálculo estatístico.

O pacote estatístico STAMP v2 foi usado para determinar diferenças na abundância relativa de filos microbianos entre os grupos. As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste t não paramétrico de White e os intervalos de confiança foram calculados usando o método bootstrap. As unidades taxonômicas com uma diferença entre proporções abaixo de 1% foram excluídas da análise. Escore de análise de discriminância linear (LDA *score*) foi utilizada para mostrar e explicar a diferença entre as comunidades microbianas dos grupos sepsis e controle.

6.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Atendendo à Resolução CNS 466/2012, que regulamenta a pesquisa com seres humanos, o projeto de pesquisa e o termo de consentimento foram submetidos para avaliação quanto aos seus aspectos metodológicos e éticos à Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e foram aprovados. Para o presente estudo utilizaram-se os dados da ficha clínica obtida a partir do acompanhamento pós-natal, que foram transcritos para um formulário padronizado (ANEXO I), individual para cada recém-nascido, sendo que foi anonimizado e identificado por código de número, preservando assim a identidade dos mesmos.

Toda pesquisa em seres humanos visa o mínimo de intervenções possível, com essa preocupação, os recém-nascidos não foram submetidos a procedimentos específicos para a pesquisa. As informações estão presentes no termo de consentimento informado, livre e esclarecido (ANEXO II).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDISSONE, A.N. *et al.* Meconium Microbiome Analysis Identifies Bacteria Correlated with Premature Birth. **PLos One**, v. 9, n. 3, p. 1-8, mar. 2014.

BALLARD, J.L. *et al.* New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. 417-23, 1991.

BEDFORD, A.R.; KUMAR, R. Early onset neonatal sepsis: diagnostic dilemmas and practical management. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 100, n. 4, p. 350-354, jul. 2015.

BENITZ, W.E.; WYNN, JL; POLIN, RA. Reappraisal of guidelines for management of neonates with suspected early-onset sepsis. **The Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 4, p. 1070-1074, abr. 2015.

BERRINGTON, J.E. *et al.* The neonatal bowel microbiome in health and infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 3, p. 236-243, jun. 2014.

CAPORASO, J.G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, maio. 2010.

CAPORASO, J.G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME J**, v. 6, n. 8, p.1621–1624, ago. 2012.

CARL, M.A. *et al.* Sepsis from the gut: the enteric habitat of bacteria that cause late-onset. **Clin Infect Dis**, v. 58, n. 9, p. 1211-1218, maio. 2014.

CHIESA, C. *et al.* Fetal and early neonatal interleukin-6 response. **PLos One**, v. 76, n. 1, p. 1-12, nov. 2015.

CONNELL, T.G. *et al.* How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. **Pediatrics**, v. 119, n. 5, p. 891-896, maio. 2007.

DIETZMAN, D.E.; FISCHER, G.W.; SCHOENKNECHT, F.D. Neonatal escherichia coli septicemia--bacterial counts in blood. **J Pediatr**, v. 85, n. 1, p. 128-130, jul. 1974.

DOBBLER, P.T. *et al.* Low Microbial Diversity and Abnormal Microbial Succession Is Associated with Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. **Fron Microbiol**, v. 15, n. 8, p. 1-12, nov. 2017.

EDGAR, R.C. UPARSE: highly accurate OUT sequences from microbial amplicon reads. **Nat. Methods**, v.10, p.996–998, 2013.

EHRENKRANZ R.A. *et al.* Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. **Pediatrics**, v.116, n.6, p. 1353-60, 2005

FENTON, T. R.; KIM, J. H. A systematic review and meta-analysis to revise the fenton growth chart for preterm infants. **Bmc pediatrics**, v. 13, n. 59, p. 1-13, 2013

FULTHORPE, R.R. *et al.* Distantly sampled soils carry few species in common. **ISME J**, v. 2, n. 9, p. 901-910, set. 2008.

GIONGO, A. *et al.* PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. **ISME J**, v. 4, n. 7, p. 852-861, jul. 2010.

GOOD, I.J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, v. 40, n. 3/4, p. 237-246, dez. 1953.

GRAHAM, P.L. *et al.* The gastrointestinal tract serves as the reservoir for Gram-negative pathogens in very low birth weight infants. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 26, n. 12, p. 1153-1156, dez. 2007.

HAMADY, M. *et al.* Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. **Nat Methods**, v. 5, n. 3, p. 235-237, mar. 2008.

HANSEN, R. *et al.* First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally- Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. **PLos One**, v. 10, n. 7, p. 1-10, jul. 2015.

HORNIK, C.P. *et al.* Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. **Early Hum Dev**, v. 88, n. 2, p. 69-74, maio. 2012.

INDRIO, F.; NEU, J. The intestinal microbiome of infants and the use of probiotics. **Curr Opin Pediatr**, v. 23, n. 2, p. 145-150, abr. 2011.

JIMÉNEZ, E. *et al.* Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Res Microbiol**, v. 159, n. 3, p. 187-193, abr. 2008.

JOBE, A.H.; BANCALARI E. Bronchopulmonary dysplasia. **Am J Respir Crit Care Med**, v.163, n.7, p.1723-9, 2001

KELLOG, J.A. *et al.* Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of age. **Pediatr Infect Dis J**, v. 16, n. 4, p. 381-385, abr. 1997.

KINROSS, J.M.; DARZI, A.W.; NICHOLSON, J.K. Gut microbiome-host interactions in health and disease. **Genome Med**, v. 3, n. 3, p. 1-12, mar. 2011.

LACAZE-MASMONTEIL, T.; ROSLYCHUCK, R.J.; ROBINSON, J.L. Value of a single C-reactive protein measurement at 18 h of age. **Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition**, v. 99, n. 1, p. 76-79, jan. 2014.

LAYEGHIFARD, M.; HWANG, D.; GUTTMAN, DS. Disentangling Interactions in the Microbiome: A Network Perspective. **Trends Microbiol**, v. 25, n. 3, p. 217-228, mar. 2017.

LEMOS, L.N. *et al.* Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **J Microbiol Methods**, v. 86, n. 1, p. 42-51, jul. 2011.

MADAN, J.C. *et al.* Gut microbial colonization in premature neonates predicts neonatal sepsis. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 97, n. 6, p. 456-462, nov. 2012.

MAI, V. *et al.* Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. 1-7, 2011.

MAI, V. *et al.* Distortions in Development of Intestinal Microbiota Associated with Late Onset Sepsis in Preterm Infants. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.

MANZONI, P. Hematologic aspects of early and late-onset sepsis in preterm infants. **Clin Perinatol**, v. 42, n. 3, p. 587-595, set. 2015.

MCDONALD, D. *et al.* An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **ISME J**, v. 6, n. 3, p. 610-618, mar. 2012.

MCMURDIE, P.J.; HOLMES, S. Phyloseq: an R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS ONE**, v.8, n.4, p. e61217, 2013.

NEU, J. Developmental aspects of maternal-fetal, and infant gut microbiota and implications for long-term health. **Matern Health Neonatol Perinatol**, v. 1, n. 6, p. 1-7, fev. 2015.

OKSANEN, J. *et al.* Vegan: Community Ecology Package. R package vegan, version.2.2-1, 2015.

PAPILE, L.A., *et al.* Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. **J Pediatr**, v. 92, n. 4, p. 529-34, 1978

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, maio. 2012.

PURI, K. *et al.* Association of Chorioamnionitis with Aberrant Neonatal Gut Colonization and Adverse Clinical Outcomes. **PLoS ONE**, v.11, n. 9, p. 1-16, set. 2016.

PYLRO, V.S. *et al.* Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **J. Microbiol. Methods**, v.107, p.30-37, dez. 2014.

PYLRO, V.S. *et al.* BMPOS: a flexible and user-friendly tool sets for microbiome studies. **Microb. Ecol**, v.72, p. 443-447, 2016.

RHEE, S.H.; POTHOUKAKIS, C.; MARYER, E.A. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 5, p. 306-314, maio. 2009.

ROESCH, L.F. *et al.* Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME J**, v. 1, n. 4, p. 183-190, ago. 2007.

ROESCH, L.F. *et al.* Diversity and composition of vaginal microbiota of pregnant women at risk for transmitting Group B Streptococcus treated with intrapartum penicillin. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. 1-13, fev. 2017.

SANTOS, R.P.; TRISTAM, D. A Practical Guide to the Diagnosis, Treatment, and Prevention of Neonatal Infections. **Pediatr Clin North Am**, v. 62, n. 2, p. 491-508, abr. 2015.

SCHELONKA, R.L. *et al.* Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. **J Pediatr**, v. 129, n. 2, p. 275-278, ago. 1996.

SCHLOSS, P.D. *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, dez. 2009.

SHAH, P. *et al.* Prolonged exposure to antibiotics and its associations in extremely preterm neonates—the Western Australian experience—aspects of maternal-fetal, and infant gut microbiota and implications for long-term health. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 26, n. 17, p. 1710-1714, nov. 2013.

SIBAI, B.; DEKKER G.; KUPFERMINEC M. Pre-eclampsia. **Lancet Lond Engl**, v.365, n. 9461, p.785–799, 2005

SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- and interleukin-1 for early diagnosis of neonatal sepsis. **Acta Paediatrica**, v. 88, n. 6, p. 647-650, jun. 1999.

SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S. Uma revisão atual sobre sepse neonatal. **Bol Cient Pediatr**, v. 01, n. 1, p. 29-35, 2012.

STEWART, C.J. *et al.* The preterm gut microbiota: changes associated with necrotizing enterocolitis and infection. **Acta Paediatrica**, v. 111, n. 11, p. 1121-1127, 2012

STEWART, C.J. *et al.* Longitudinal development of the gut microbiome and metabolome in preterm neonates with late onset sepsis and healthy controls. **Microbiome**, v. 5, n.75, p. 1-11, 2017

STOLL, B.J. *et al.* Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. **Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. 816-826, maio. 2011.

STOLL, B.J.; HANSEN, N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. **Semin Perinatol**, v. 27, n. 4, p. 293-301, ago. 2003.

TAFT, D.H. *et al.* Intestinal microbiota of preterm infants differ over time and between hospitals. **Microbiome**, v. 2, n. 36, p. 1-12, oct. 2014.

TAFT, D.H. *et al.* Center Variation in Intestinal Microbiota Prior to Late-Onset Sepsis in Preterm Infants. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. 1-17, jun. 2015.

VERGNANO, S. *et al.* Neonatal infections in England: the NeonIN surveillance network. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 96, n. 1, p. 9-14, jan. 2011.

WARDWELL, L.H.; HUTTENHOVER, C.; GARRETT, W.S. Current concepts of the intestinal microbiota and the pathogenesis of infection. **Curr Infect Dis Rep**, v. 13, n. 1, p. 28-34, fev. 2011.

ZHOU, M. *et al.* Interleukin-8 for diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. 1-12, maio. 2015.

8. ARTIGO

A MICROBIOTA DO PRIMEIRO MECÔNIO É UM PREDITOR DE SEPSE NEONATAL PRECOCE CLÍNICA EM RECÉM NASCIDOS PREMATUROS

Dornelles LV¹, Procianoy RS², Corso AL², Roesch LFW³, Silveira RC²

RESUMO

Introdução: A sepse neonatal precoce continua sendo uma das principais causas de morbimortalidade relacionadas à prematuridade e o seu diagnóstico permanece de extrema dificuldade. O mecônio não é estéril, portanto, uma melhor compreensão do padrão inicial de colonização de microbiota intestinal em recém-nascidos (RN) prematuros pode ser uma ferramenta útil para melhorar o diagnóstico e o tratamento da sepse neonatal precoce.

Objetivo: Determinar a microbiota intestinal do primeiro mecônio de recém-nascidos prematuros com idade gestacional (IG) \leq 32 semanas e verificar sua associação com sepse neonatal precoce clínica.

Métodos: Foi obtido uma amostra da primeira eliminação de mecônio de prematuros com IG \leq 32 semanas nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em um estudo de coorte prospectiva controlado. A microbiota dos prematuros com o diagnóstico de sepse neonatal precoce clínica foi comparada ao grupo controle. Critérios de exclusão: malformações ou infecções congênitas; síndromes genéticas; mães portadoras do vírus HIV e não autorização de pais ou responsáveis legais. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até a extração do DNA. O DNA microbiano foi isolado a partir de amostras de mecônio usando o QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos). A qualidade do DNA foi determinada por espectrofotometria usando o espectrofotômetro

NanoVue™ (GE Healthcare, Chicago, IL, Estados Unidos). A região V4 do gene rRNA 16S foi amplificada e sequenciada usando o ION PGM™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) com os iniciadores 515F e 806R, permANOVA foi utilizada para detectar variáveis de confusão.

Resultados: 84 prematuros foram incluídos; 40 (48%) com sepse neonatal precoce clínica e 44 (52%) sem sepse neonatal precoce (grupo controle). IG, peso ao nascer, tipo de parto e outros dados maternos e neonatais foram semelhantes, exceto as seguintes características: tempo de bolsa rota (BR) e síndrome do desconforto respiratório (SDR). O tempo de BR > 18h (15, 37,5% e 5, 11,4%, $p = 0,03$) e SDR (21, 52,5% e 11, 25%, $p = 0,03$) foram mais frequente nos sépticos quando comparados ao grupo controle. O uso materno de antibiótico (ATB) e pelo RN no momento da coleta não influenciaram a comunidade microbiana do primeiro mecônio. O filo mais abundante encontrado nos dois grupos foi *Proteobacteria*, porém mais prevalente no grupo sepse ($p = 0,034$). Presença de sepse neonatal precoce clínica explicou 14% da variação entre as comunidades bacterianas ($p = 0,001$). Os gêneros mais associados ao grupo sepse foram: *Paenibacillus*, *Caulobacter*, *Dialister*, *Akkermansia*, *Phenylobacterium*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Bradyrhizobium*, *Alloprevotella* e no grupo controle: *Flavobacterium*.

Conclusão: Estes achados suportam a hipótese de que a microbiota do primeiro mecônio de RNs prematuros é diferente naqueles pacientes com e sem o diagnóstico de sepse neonatal precoce clínica. A identificação de comunidades bacterianas específicas de risco pode levar ao desenvolvimento de biomarcadores alternativos para o diagnóstico precoce da sepse neonatal.

Palavras-chave: prematuro, sepse neonatal precoce, microbiota intestinal, microbioma intestinal e mecônio.

Estudo financiado pelo CNPq e FIPE - Brasil e Fundação Bill e Melinda Gates.

¹Médica Neonatologista do HCPA, aluna do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), MD.

²Professor(a) Doutor de Pediatria e do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), MD.

³Professor Doutor da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

ABSTRACT

Background: Early-onset neonatal sepsis (EONS) remains one of the main causes of morbidity and mortality related to prematurity, even with this clinical significance, its diagnosis remains extremely difficult. Meconium is not sterile, so a better understanding of initial gut microbiota colonization pattern in preterm infants may be a useful tool to improve the diagnosis and treatment of EONS.

Objective: To determine the intestinal microbiota of the first meconium of preterm infants with gestational age (GA) ≤ 32 weeks and to verify its association with EONS.

Methods: First pass meconium sample of preterm infants with GI ≤ 32 weeks born at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) was obtained in a prospective cohort study. The microbiota of the patients with the diagnosis of early neonatal sepsis was compared to the control group. **Exclusion criteria:** Malformations or congenital infections; Genetic syndromes; Mothers carrying the HIV virus and not authorization from parents or legal guardians. All samples were stored (-80°C) until DNA extraction. Microbial DNA was isolated from meconium samples using the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, United States). DNA quality was determined by spectrophotometry using NanoVue™

spectrophotometer (GE Healthcare, Chicago, IL, United States). The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced using the o ION PGMTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) with the primers 515F and 806R. perMANOVA was utilized to detect confounding variables.

Results: 84 premature were included; 40 (48%) with EONS and 44 (52%) without EONS (control group). GA, birth weight, type of delivery and other maternal and neonatal data were similar, except for the following characteristics: Premature Rupture of Membranes (PROM) > 18h and respiratory distress syndrome (RDS), except infants with EONS had more PROM > 18h (15, 37.5% and 5, 11.4%, $p = 0.03$) and SDR (21.52.5% and 11.25%, $p = 0.03$). The maternal use of antibiotic (ATB) and the use of ATB by the preterm at the time of meconium sampling did not influence the first meconium's microbial community. The most abundant phylum in both groups was *Proteobacteria*, being more common in the EONS group ($p = 0.034$). The main analysis showed that 14% of the variation among the communities can be explained by the presence of EONS ($p = 0.001$). The genera most found in the EONS group were: *Paenibacillus*, *Caulobacter*, *Dialister*, *Akkermansia*, *Phenylobacterium*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Bradyrhizobium*, *Alloprevotella* and in the control group: *Flavobacterium*.

Conclusion: These findings supports the hypothesis that first meconium microbiota from premature infants is different in those patients with and without EONS. Identifying microbial risk signatures might lead to the development of alternative biomarkers for early diagnosis of neonatal sepsis.

Key words: prematurity, early-onset neonatal sepsis, intestinal microbiome, intestinal microbiota and meconium.

Study supported by Grants from CNPq and FIPE - Brazil and Bill and Melinda Gates Foundation.

INTRODUÇÃO

A sepse neonatal precoce continua sendo uma das principais causas de morbimortalidade relacionadas à prematuridade e seu diagnóstico permanece de extrema dificuldade, especialmente o diagnóstico clínico (POLIN, 2012; LACAZE-MASMONTEIL; ROSLYCHUCK; ROBINSON, 2014). Testes diagnósticos laboratoriais disponíveis (hemograma, proteína C reativa, procalcitonina, citocinas), ainda tem um baixo valor preditivo positivo (VPP), dificultando a identificação do recém-nascido (RN) efetivamente infectado e levando a um uso exagerado de antibiótico (ATB) na primeira semana de vida. A hemocultura continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico de sepse neonatal precoce e tardia, porém sua sensibilidade é baixa, não ultrapassando cerca de 80% (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012; LACAZE-MASMONTEIL; ROSLYCHUCK; ROBINSON, 2014; ZHOU *et al.*, 2015; MANZONI, 2015). Devido a essas dificuldades, o diagnóstico de sepse presumida ou clínica (aqueles pacientes com fatores de risco e sinais clínicos para sepse, porém sem a confirmação da mesma com hemocultura) ainda é muito frequente nas unidades de tratamento intensivo neonatal (UTIN) (SANTOS; TRISTAM, 2015).

O mecônio eliminado pelo recém-nascido não é estéril (JIMÉNEZ *et al.*, 2008; MADAN *et al.*, 2012), cada vez mais evidências mostram que a microbiota do mecônio reflete a comunidade microbiana intra-útero (ARDISSONE *et al.*, 2014). Estudos prévios evidenciaram que o mecônio é menos diversificado em RN que irão desenvolver infecção (MADAN *et al.*, 2012), sugerindo que a falta de colonização por várias bactérias não patogênicas facilita a colonização por bactérias patogênicas, podendo aumentar o risco de doenças infecciosas e translocação bacteriana (MAI *et al.*, 2013; STEWART *et al.*, 2017).

Alguns estudos já mostraram um aumento de *Proteobacteria* antecedendo o diagnóstico de sepse tardia (MAI *et al.*, 2013) e o diagnóstico de enterocolite necrosante (ECN) (MAI *et al.*, 2011). As espécies *Citrobacter koseri* e *Klebsiella pneumoniae*, ambos pertencentes ao filo *Proteobacteria*, mostraram-se dominantes na microbiota de casos que desenvolveram ECN e, por isso, provavelmente podem ser consideradas biomarcadores para o diagnóstico precoce desta doença (DOBBLER *et al.*, 2017). Nestes mesmos pacientes, os casos de ECN, mostram uma microbiota menos diversificada e com menor abundância de *Lactobacillus* (DOBBLER *et al.*, 2017), além disso evidenciaram que os pacientes doentes apresentavam espécies mais interligadas e mais agrupadas em relação aos controles, mostrando um comunidade mais densamente relacionada (DOBBLER *et al.*, 2017).

Padrões de disbiose estão sendo estudados com objetivo de prevenir, monitorar e de encontrar alternativas terapêuticas em casos de enterocolite necrosante e de sepse tardia em RN prematuros, uma vez que é conhecida a associação desse desequilíbrio com as patologias citadas acima (BERRINGTON *et al.*, 2014). Mai *et al.* evidenciaram que a diversidade da microbiota intestinal do prematuro aumenta com o tempo e que a comunidade bacteriana intestinal é diferente naqueles pacientes que irão desenvolver enterocolite quando comparados a controles (MAI *et al.*, 2011). Além de tentar definir se esta disbiose pode ser a causa destas doenças, devemos nos perguntar se temos como manipular o microbioma de RN prematuros doentes ou não, a partir de engenharia genética, para este se assemelhar com o microbioma de neonatos a termo e saudáveis (BERRINGTON *et al.*, 2014).

Diversos estudos mostram a dificuldade de diagnosticar de forma confiável a sepse neonatal precoce, especialmente em prematuros. Logo, um melhor entendimento sobre a colonização microbiana do trato gastrointestinal do recém-nascido no período pós-natal imediato e a sua possível relação com a sepse precoce é essencial. O objetivo desse estudo foi determinar a microbiota intestinal do primeiro mecônio de recém-nascidos prematuros com

idade gestacional (IG) \leq 32 semanas e verificar sua associação com sepse neonatal precoce clínica. O melhor entendimento deste microbioma pode sinalizar aqueles pacientes que têm maior risco de desenvolver esta infecção.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo de coorte com amostra de conveniência de recém-nascidos prematuros com idade gestacional menor ou igual a 32 semanas, nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Critérios de exclusão: malformações ou infecções congênitas; síndromes genéticas; mães portadoras do vírus HIV e não autorização de pais ou responsáveis legais. Após a assinatura pela mãe ou responsável legal do termo de consentimento livre e esclarecido, foi coletada a primeira eliminação de mecônio do recém-nascido, armazenada a -80°C em botijão criogênico até ser transportado para o laboratório da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), onde foi feita a extração do DNA microbiano e a análise da composição da comunidade microbiana.

Os dados maternos estudados foram: tipo de parto (vaginal ou cesariana), tempo de bolsa rota (BR), infecção do trato urinário (confirmada por urocultura), corioamnionite (diagnóstico anatomopatológico), pré-eclâmpsia (pressão arterial sistólica \geq 140 mmHg e/ou diastólica \geq 90 mmHg após a vigésima semana de gestação, acompanhada por proteinúria $>$ 300mg em amostra de urina de 24h, sem hipertensão previa ou doença renal) (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005) e uso de antibiótico. E do RN: IG (baseado em ultrassom obstétrico nas primeiras 12 semanas da gestação e na ausência deste, baseou-se no exame clínico neonatal) (BALLARD *et al*, 1991), peso nascimento, sexo, score de Apgar no 5^omin, adequação quanto a idade gestacional (FENTON; KIM, J. H., 2013), síndrome do desconforto

respiratório (SDR), displasia broncopulmonar (DBP) (necessidade de oxigênio suplementar aos 28 dias de vida) (JOBÉ; BANCALARI, 2001; EHRENKRANZ *et al.*, 2005), sepse neonatal tardia (hemocultura positiva após 72 horas de vida, acompanhadas de sinais clínicos de infecção), ECN (presença de pneumatose e/ou pneumoperitônio), hemorragia periventricular (HPIV) grau 2 ou maior (PAPILE *et al.*, 1978), leucomalácia periventricular (LPV), persistência do canal arterial (PCA), alta ou óbito.

Os prematuros incluídos foram divididos em dois grupos de acordo com a presença de sepse precoce (grupo sepse) ou ausência de sepse precoce (grupo controle). Devido à baixa sensibilidade e ao número desprezível de hemoculturas positivas nas primeiras 72 horas de vida, definimos sepse neonatal precoce como: presença de três ou mais sinais clínicos no recém-nascido ou no mínimo dois destes sinais associados a fatores de risco materno. Sinais clínicos no recém-nascido: apneia, taquipneia, batimento de asa nasal, tiragem intercostal, cianose, esforço respiratório, taquicardia ou bradicardia, perfusão ruim ou choque, irritabilidade, letargia, hipotonia, convulsão, distensão abdominal, vômito, diarreia, intolerância alimentar, resíduo gástrico, hepatomegalia, instabilidade térmica, icterícia inexplicada, petéquias ou purpura, “recém-nascido parece não estar bem”. Fatores de risco maternos: febre, bolsa rota por mais de 18 horas, trabalho de parto prematuro. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HCPA

EXTRAÇÃO DE DNA MICROBIANO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

O DNA microbiano foi isolado a partir de amostras meconiais usando o QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) conforme as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi quantificada por espectrofotometria usando o

espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare, Chicago, IL, Estados Unidos). Todas as amostras de DNA foram armazenadas a -80 ° C até a sua utilização. A região V4 do gene rRNA 16S foi amplificada e sequenciada utilizando o ION PGM™ Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) com os oligonucleotídeos iniciadores 515F e 806R (CAPORASO *et al.*, 2012). Múltiplas amostras foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (*PCR*) usando iniciadores codificados em código de barras ligados à sequência do adaptador "A" (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') e a sequência do adaptador "P1" (5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3') para obter uma sequência iniciadora composta pelo adaptador A-barcode-806R e P1-515F. A reação de *PCR* foi feita em 25 µL e consistiu em 2U de Platinum® Taq DNA High Fidelity Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 4 µL 10X High Fidelity *PCR* Buffer, 2 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTP's, 0,1 µM de ambos os iniciadores descritos acima, 25 µg de UltraPure BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e aproximadamente 50 ng de DNA molde.

As condições de *PCR* utilizadas foram: 95 °C durante 5 min, 35 ciclos a 94°C por 45s; 56°C por 45s e 72 °C por 1 min, seguidos por 10 min a 72 °C. Os produtos de *PCR* resultantes foram purificados com o Reagente Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Brea, CA, Estados Unidos) e a concentração final do produto de *PCR* foi quantificada usando o *kit* Fluorômetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante.

Por fim, as reações foram combinadas em concentrações equimolares a fim de se criar uma mistura composta por fragmentos amplificados do gene 16S de cada amostra. Tal amostra composta foi utilizada para a preparação da biblioteca com o sistema Ion OneTouch™ 2 usando o *kit* ION PGM™ Template OT2 400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). O sequenciamento foi realizado usando o *kit* comercial ION

PGM™ Sequencing 400 no ION PGM™ System usando Ion 318™ Chip v2 com um máximo de 40 amostras por microchipe.

PROCESSAMENTO DAS SEQUÊNCIAS PARA ANÁLISE

Os arquivos Fastq exportados do sistema ION PGM™ foram analisados com base nas recomendações do Projeto Microbioma Brasileiro (BMP) (PYLRO *et al.*, 2014) usando o Sistema Operacional BMP (PYLRO *et al.*, 2016). Em síntese, uma tabela de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) foi elaborada utilizando-se o pipeline UPARSE (EDGAR, 2013), onde as sequências foram cortadas a 200 bases e filtradas por qualidade usando um erro máximo esperado de 0,5. As sequências foram reunidas em UTO usando um critério de 97% similaridade para o agrupamento e sequências quiméricas foram removidas (EDGAR, 2013). A classificação taxonômica foi realizada usando o *software* QIIME (CAPORASO *et al.*, 2010) com base no método UCLUST contra o banco de dados Greengenes 13.5 (MCDONALD *et al.*, 2012) com um limite de confiança de 80%. O esforço de amostragem foi estimado usando o cálculo de cobertura proposto por Good (GOOD, 1953).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para medir a relação entre sepsis e a diversidade da comunidade bacteriana, estimando um coeficiente de determinação maior do que 0,10 como relevante (MAI *et al.*, 2013), ou seja, uma correlação acima de 0,32, o cálculo de amostra foi de 85 sujeitos. Foi utilizado um poder de 80% e um nível de significância de 0,05. O cálculo foi realizado no WINPEPI versão 11.44.

Os dados obtidos no estudo foram armazenados em banco de dados constituído para esse fim específico, utilizando o programa Excel. Posteriormente os dados foram processados e analisados com o auxílio do programa *Predictive Analytics Software* (PASW), versão 18.0 do *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS). Os resultados foram descritos através de média e desvio-padrão (DP) (distribuição simétrica) ou mediana e intervalo interquartil (distribuição assimétrica). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências e percentuais. Para comparar as variáveis quantitativas em relação à presença ou não de sepe foram aplicados ou teste *t* de Student (distribuição simétrica) ou teste de Mann-Whitney (distribuição assimétrica). Para as variáveis qualitativas foi empregado o teste Qui-quadrado. O nível de significância estatística para qualquer uma das análises foi considerado para um valor de alfa = 0,05.

Todas as bibliotecas (amostras) de genes 16S rRNA foram normalizadas por reamostragem aleatória das sequências de acordo com as recomendações de Lemos *et al.* (LEMOS *et al.*, 2011) . O arquivo BIOM, contendo as UTO agrupadas a um nível de similaridade de 97%, foi importado para o ambiente R (R Development Core Team, 2008) e uma matriz de dissimilaridade composicional foi gerada com base em distâncias binomiais entre amostras usando o pacote "*phyloseq*" (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

Para avaliar as diferenças na estrutura da comunidade microbiana uma matriz de dissimilaridade entre amostras usando a distancia binomial foi calculada usando análise de coordenadas principais (PCoA). A matriz foi utilizada em uma análise de variância multivariada permutável não paramétrica (perMANOVA) com a função *Adonis* disponível no pacote *vegan* (OKSANEN *et al.*, 2015) para detectar variáveis de confusão. Para a estimar a alfa diversidade, o número de UTO e o Índice de Diversidade de Shannon foram calculados e plotados usando o pacote "*phyloseq*" (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Estes foram descritos

com mediana e intervalo interquartil e foi utilizado o teste de Mann-Whitney para o cálculo estatístico.

O pacote estatístico STAMP v2 foi usado para determinar diferenças na abundância relativa de filos microbianos entre os grupos. As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste t não paramétrico de White e os intervalos de confiança foram calculados usando o método bootstrap. As unidades taxonômicas com uma diferença entre proporções abaixo de 1% foram excluídas da análise. Escore de análise de discriminância linear (LDA *score*) foi utilizada para mostrar e explicar a diferença entre as comunidades microbianas dos grupos sepse e controle.

RESULTADOS

Cento e sessenta e oito pacientes foram elegíveis, sendo então aplicado o termo de consentimento informado e incluídos no estudo. Destes, 84 estavam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão e forneceram amostras de mecônio em quantidade e qualidade adequada que permitissem as análises propostas. Cada paciente prematuro foi responsável por 1 amostra de mecônio. Estes 84 pacientes foram divididos em 2 grupos, 40 (48%) para o grupo com o diagnóstico de sepse clínica e 44 (52%) para o grupo sem o diagnóstico de sepse, grupo controle.

As características dos pacientes estudados estão apresentadas na Tabela 1, divididas em características maternas (1A) e do recém-nascido (1B). A média de peso de nascimento do grupo sepse foi de 1395 gramas (± 496) e a do grupo controle foi de 1428 gramas (± 497). A média de idade gestacional do grupo sepse foi de 30 semanas ($\pm 2,4$) e a do grupo controle foi

de 30,5 semanas ($\pm 2,2$). Não houve diferença entre os dois grupos quando comparadas essas características ($p = 0,69$ e $p = 0,29$, respectivamente).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto às características maternas e do RN, exceto pelo tempo de BR e presença de SDR. 15 pacientes do grupo sepse (37,5%) e 5 pacientes do grupo controle (11,4%) tiveram tempo de BR maior do que 18 horas, $p = 0,03$ (Tabela 1A). 21 pacientes do grupo sepse (52,5%) e 11 pacientes do grupo controle (25%) apresentaram SDR, $p = 0,03$ (Tabela 1B).

Após filtragem do 16S rRNA, foi obtido um total de 1,920,679 sequências de alta qualidade com mais de 200 bases. O esforço de amostragem variou de 87% a 99%, (GOOD, 1953) indicando que o conjunto de dados era representativo das comunidades microbianas analisadas.

A análise de ordenação e agrupamento das comunidades microbianas encontradas em amostras de mecônio de prematuros com e sem sepse (Figura 1) revelou uma clara diferença na estrutura destas comunidades entre grupos com e sem sepse. O valor de R^2 indica que 14% da variação entre as comunidades foi explicada pela presença de sepse neonatal precoce clínica ($p = 0,001$). Para detectar possíveis variáveis confundidoras foi utilizado permANOVA. O resultado mostra que nenhuma das variáveis testadas isoladas ou em combinação influenciaram a microbiota do mecônio. A variável peso de nascimento apresentou um valor de p estatisticamente significativo nesta análise ($p = 0,022$), porém, o valor de R^2 foi muito baixo (0,024) para ser considerada como importante variável que influenciaria na microbiota meconial.

Na figura 2 estão demonstradas as diferenças na diversidade alfa entre os grupos com e sem sepse clínica, o número de UTO observadas no grupo controle variou de 9 a 110. A mediana observada foi 63,4. O número de UTO obtidas no grupo de pacientes com sepse

variou de 7 a 127. A mediana encontrada foi de 80,4. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney indicou diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,005$), no entanto a variação da quantidade de UTO observadas por paciente foi grande. A média do índice de diversidade de Shannon foi 2,62 e 2,22 para o grupo controle e para o grupo sepse, respectivamente (Figura 2). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney não indicou diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,07$).

Uma vez que houve diferença estatisticamente significativa na estrutura da comunidade microbiana entre os dois grupos, utilizamos LDA *score* para mostrar e explicar esta diferença entre os grupos sepse e controle com base nos diferentes gêneros microbianos presentes nas amostras. Os resultados estão presentes na Tabela 2. Um total de 9 gêneros estão mais associado a indivíduos que irão desenvolver sepse ($p \leq 0.05$; $FDR \leq 0.05$). De acordo com LDA *score*, a ordem de importância destes gêneros foi: *Paenibacillus*, *Caulobacter*, *Dialister*, *Akkermansia*, *Phenylobacterium*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Bradyrhizobium*, *Alloprevotella*. Por outro lado, um gênero está mais associado ao grupo controle, sem o diagnóstico de sepse: *Flavobacterium*.

O filo mais abundante no mecônio dos RN prematuros foi *Proteobacteria*, quando comparamos os dois grupos percebemos que o esse filo foi mais comum no grupo sepse ($p = 0,034$) (Figura 3).

DISCUSSÃO

Nosso estudo mostra que a microbiota intestinal de prematuros com o diagnóstico de sepse neonatal precoce clínica é diferente daqueles sem infecção. Essa diferença é em 14% explicada pela presença desta doença. O uso prévio de ATB pela mãe durante o trabalho de

parto e o uso de ATB pelo RN no momento da coleta do mecônio não mostraram interferência na diferença do microbioma entre os dois grupos. O peso de nascimento teve cerca de 2% de participação na diferença da comunidade bacteriana entre os dois grupos, o que pode ser desconsiderado na prática clínica. Quando comparada a alfa diversidade nos dois grupos, encontramos uma diferença significativa entre eles, porém a variação do número de UTO observada por paciente em cada grupo foi grande, permitindo inferir que esta medida de diversidade pode não ser um indicador robusto de diferenças microbianas entre os dois grupos testados.

Atualmente sabemos que existe uma interação sinérgica entre o ser humano e a microbiota intestinal, onde é mantido um equilíbrio para o funcionamento adequado de diversas funções, dentre elas, a construção da resposta imune. Esta resposta imune pode ser via hematológica ou local, fortalecendo a barreira mucosa intestinal (KINROSS; DARZI; NICHOLSON, 2011; MAI *et al.*, 2013; BERRINGTON *et al.*, 2014). Em RN saudáveis e a termo o intestino e o sistema imune regulam a comunidade microbiana para um adequado funcionamento (WARDWELL; HUTTENHOVER; GARRETT, 2011). No entanto, este equilíbrio pode ser destruído rapidamente, principalmente em situações que envolvem a prematuridade, como ruptura prematura de membranas, corioamnionite, uso de ATB pela mãe, atraso no início da alimentação enteral, infecção e instabilidade hemodinâmica (BERRINGTON *et al.*, 2014). Esta ruptura no funcionamento do sistema é chamada disbiose, e o papel da disbiose na sepse precoce neonatal vinha sendo pobremente descrito até esse estudo.

O diagnóstico de certeza da sepse precoce em prematuros é difícil, a coleta da hemocultura, padrão-ouro para o diagnóstico de sepse neonatal, necessita de 1-2mL de sangue para poder detectar os microrganismos, pois a contagem de colônias no período neonatal é pequena (SCHELONKA *et al.*, 1996). Além disso este volume pode representar cerca de 2-

3% da volemia de um paciente de 1000 gramas; fato que reforça a necessidade de entender se um padrão de disbiose no mecônio pode prever sepse. Neste contexto, encontramos nove gêneros mais associados a prematuros que irão desenvolver sepse precoce clínica.

Estudos mostram que o microbioma presente no primeiro mecônio do RN é muito provavelmente originado do líquido amniótico (LA) (ARDISSONE *et al.*, 2014). Puri *et al.*, compararam as fezes de RN com e sem corioamnionite / funisite nas semanas 1, 2 e 3 de vida e observaram uma alteração na microbiota naqueles com corioamnionite e funisite somente na semana 1, permitindo uma associação causal (PURI *et al.*, 2016). Assim como no nosso estudo, onde mostramos uma diferença clara na microbiota do mecônio entre os prematuros com e sem sepse, lembrando que corioamnionite é um dos grandes fatores de risco para sepse neonatal precoce.

A comparação da alfa diversidade entre os diferentes estudos já realizados ainda é um grande desafio, pois não há uma padronização na coleta do material analisado. Na sepse neonatal tardia, foi mostrado tanto uma diferença na microbiota quanto uma redução na diversidade bacteriana nos RN que irão desenvolver sepse em relação ao grupo controle (MADAN *et al.*, 2012; TAFT *et al.*, 2015). Madan *et al.* estudaram 6 pacientes prematuros e viram que aqueles que desenvolveram sepse tardia já apresentavam uma menor biodiversidade nas fezes desde o nascimento (MADAN *et al.*, 2012). Porém nenhum destes foi capaz de descrever uma alteração do microbioma característica prévia ao desenvolvimento da doença. Seguindo a mesma linha, Dobbler *et al.*, mostrou redução da diversidade de bactérias prévia ao diagnóstico de ECN (DOBBLER *et al.*, 2017). Em contra partida, dois estudos encontraram diferença na composição e características da microbiota intestinal entre casos e controles, porém sem detectar diferença na alfa diversidade entre os dois grupos. Mai *et al.* compararam a microbiota de prematuros com e sem o diagnóstico de sepse tardia e Puri

et al. compararam a microbiota de prematuros filhos de mães com e sem corioamnionite (MAI *et al.*, 2013; PURI *et al.*, 2016).

Já em nosso estudo encontramos uma alfa diversidade maior naqueles que desenvolveram sepse, porém os dois grupos apresentaram grande variação no número de UTO observada por paciente, o que permite inferir que este critério microbiológico pode não ser útil para diferenciar os pacientes com o diagnóstico de sepse precoce presumida daqueles sem sepse clínica. Além disso as fezes analisadas nestes estudos citados anteriormente (MAI *et al.*, 2013; PURI *et al.*, 2016) foram coletadas dias após a internação na UTIN, diferente do nosso estudo no qual coletamos a primeira eliminação de fezes do RN. O momento e o ambiente da coleta das fezes influenciam na composição da comunidade bacteriana e no seu padrão de colonização, como descrito por Taft *et al* em dois estudos diferentes (TAFT *et al.*, 2014; TAFT *et al.*, 2015). Inclusive fezes coletadas no mesmo hospital em anos diferentes, mostraram microbiotas diferentes, quando estudados prematuros que não desenvolveram ECN ou sepse tardia (TAFT *et al.*, 2014).

Encontramos que o filo *Proteobacteria* foi mais abundante nos casos de sepse precoce no nosso estudo. Este também foi o filo mais evidente em amostras de fezes antecedendo os casos de sepse tardia (MAI *et al.*, 2013) e de ECN (MAI *et al.*, 2011), e, por isso, provavelmente pode ser considerado biomarcador para o diagnóstico destas condições.

Apesar das dificuldades técnicas da coleta do primeiro mecônio do RN, sendo as principais a demora em eliminar o mecônio e o volume do mesmo, conseguimos coletar um número expressivo de amostras em condições de serem analisadas de forma confiável. Além disso este é o primeiro estudo que compara a comunidade microbiana presente no mecônio de RN prematuros com e sem o diagnóstico de sepse precoce clínica, onde a microbiota foi analisada pela técnica de amplificação do DNA e sequenciamento do 16S rRNA.

A principal limitação do nosso estudo é na definição de sepse precoce, pois utilizamos o diagnóstico de sepse clínica devido a ausência de hemoculturas positivas nas primeiras 72 horas de vida. Lembramos que para realizar este mesmo estudo, apenas com pacientes com hemocultura positiva, cerca de 3% da população geral neonatal (LACAZE-MASMONTEIL; ROSLYCHUCK; ROBINSON, 2014) e com uma amostra significativa e representativa, teríamos que realizar um estudo multicêntrico, o que gera inúmeros vieses quando estamos nos referindo a microbioma. Estes vieses estão relacionados a diferenças climáticas e ambientais, diferenças nas práticas clínicas, cuidados, condutas e protocolos terapêuticos, na própria população em estudo, seu poder aquisitivo e seu acesso a assistência médica (TAFT *et al.*, 2014; TAFT *et al.*, 2015).

Concluindo, nossos achados confirmam a hipótese de que a microbiota do primeiro mecônio de prematuros com sepse neonatal clínica é diferente daqueles prematuros sem sepse, e que esta diferença está em 14% relacionada ao diagnóstico de sepse precoce clínica. Além disso, mostramos uma predominância do filo *Proteobacteria* nos grupos, porém mais importante nos casos de sepse precoce. Esses achados são compatíveis com a literatura internacional quando estudado a microbiota intestinal de RN prematuros e, da mesma forma que estudos anteriores, não foi possível identificar uma alteração específica relacionada ao diagnóstico.

A microbiota intestinal é uma coleção de indivíduos conectados e representa um grande organismo complexo (LAYEGHIFARD; HWANG; GUTTMAN, 2017). Logo, devemos buscar o entendimento deste microbioma como um todo, buscando o momento do desequilíbrio ou da mudança da composição do mesmo (DOBBLER *et al.*, 2017). No entanto, são necessário mais estudos nesta área para um melhor entendimento desta microbiota e de seu funcionamento antes de interferirmos de forma rotineira nesta complexa comunidade.

BIBLIOGRAFIA

ARDISSONE, A.N. *et al.* Meconium Microbiome Analysis Identifies Bacteria Correlated with Premature Birth. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. 1-8, mar. 2014.

BALLARD, J.L. *et al.* New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. 417-23, 1991.

BERRINGTON, J.E. *et al.* The neonatal bowel microbiome in health and infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 3, p. 236-243, jun. 2014.

CAPORASO, J.G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, maio. 2010.

CAPORASO, J.G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME J**, v. 6, n. 8, p.1621–1624, ago. 2012.

DOBBLER, P.T. *et al.* Low Microbial Diversity and Abnormal Microbial Succession Is Associated with Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. **Fron Microbiol**, v. 15, n. 8, p. 1-12, nov. 2017.

EDGAR, R.C. UPARSE: highly accurate OUT sequences from microbial amplicon reads. **Nat. Methods**, v.10, p.996–998, 2013.

FENTON, T. R.; KIM, J. H. A systematic review and meta-analysis to revise the fenton growth chart for preterm infants. **Bmc pediatrics**, v. 13, n. 59, p. 1-13, 2013

GOOD, I.J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, v. 40, n. 3/4, p. 237-246, dez. 1953.

JIMÉNEZ, E. *et al.* Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Res Microbiol**, v. 159, n. 3, p. 187-193, abr. 2008.

JOBE, A.H.; BANCALARI E. Bronchopulmonary dysplasia. **Am J Respir Crit Care Med**, v.163, n.7, p.1723-9, 2001

KINROSS, J.M.; DARZI, A.W.; NICHOLSON, J.K. Gut microbiome-host interactions in health and disease. **Genome Med**, v. 3, n. 3, p. 1-12, mar. 2011.

LACAZE-MASMONTEIL, T.; ROSLYCHUCK, R.J.; ROBINSON, J.L. Value of a single C-reactive protein measurement at 18 h of age. **Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition**, v. 99, n. 1, p. 76-79, jan. 2014.

LAYEGHIFARD, M.; HWANG, D.; GUTTMAN, DS. Disentangling Interactions in the Microbiome: A Network Perspective. **Trends Microbiol**, v. 25, n. 3, p. 217-228, mar. 2017.

LEMOS, L.N. *et al.* Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **J Microbiol Methods**, v. 86, n. 1, p. 42-51, jul. 2011.

MADAN, J.C. *et al.* Gut microbial colonization in premature neonates predicts neonatal sepsis. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 97, n. 6, p. 456-462, nov. 2012.

MAI, V. *et al.* Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. 1-7, 2011.

MAI, V. *et al.* Distortions in Development of Intestinal Microbiota Associated with Late Onset Sepsis in Preterm Infants. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.

MANZONI, P. Hematologic aspects of early and late-onset sepsis in preterm infants. **Clin Perinatol**, v. 42, n. 3, p. 587-595, set. 2015.

MCDONALD, D. *et al.* An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **ISME J**, v. 6, n. 3, p. 610-618, mar. 2012.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: an R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS ONE**, v.8, n.4, p. e61217, 2013.

OKSANEN, J. *et al.* Vegan: Community Ecology Package. R package vegan, version.2.2-1, 2015.

PAPILE, L.A., *et al.* Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. **J Pediatr**, v. 92, n. 4, p. 529-34, 1978

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, maio. 2012.

PURI, K. *et al.* Association of Chorioamnionitis with Aberrant Neonatal Gut Colonization and Adverse Clinical Outcomes. **PLoS ONE**, v.11, n. 9, p. 1-16, set. 2016.

PYLRO, V.S. *et al.* Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **J. Microbiol. Methods**, v.107, p.30–37, dez. 2014.

PYLRO, V.S. *et al.* BMPOS: a flexible and user-friendly tool sets for microbiome studies. **Microb. Ecol**, v.72, p. 443–447, 2016.

SANTOS, R.P.; TRISTAM, D. A Practical Guide to the Diagnosis, Treatment, and Prevention of Neonatal Infections. **Pediatr Clin North Am**, v. 62, n. 2, p. 491-508, abr. 2015.

SCHELONKA, R.L. *et al.* Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. **J Pediatr**, v. 129, n. 2, p. 275-278, ago. 1996.

SIBAI, B.; DEKKER G.; KUPFERMINC M. Pre-eclampsia. **Lancet Lond Engl**, v.365, n. 9461, p.785–799, 2005

SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S. Uma revisão atual sobre sepse neonatal. **Bol Cient Pediatr**, v. 01, n. 1, p. 29-35, 2012.

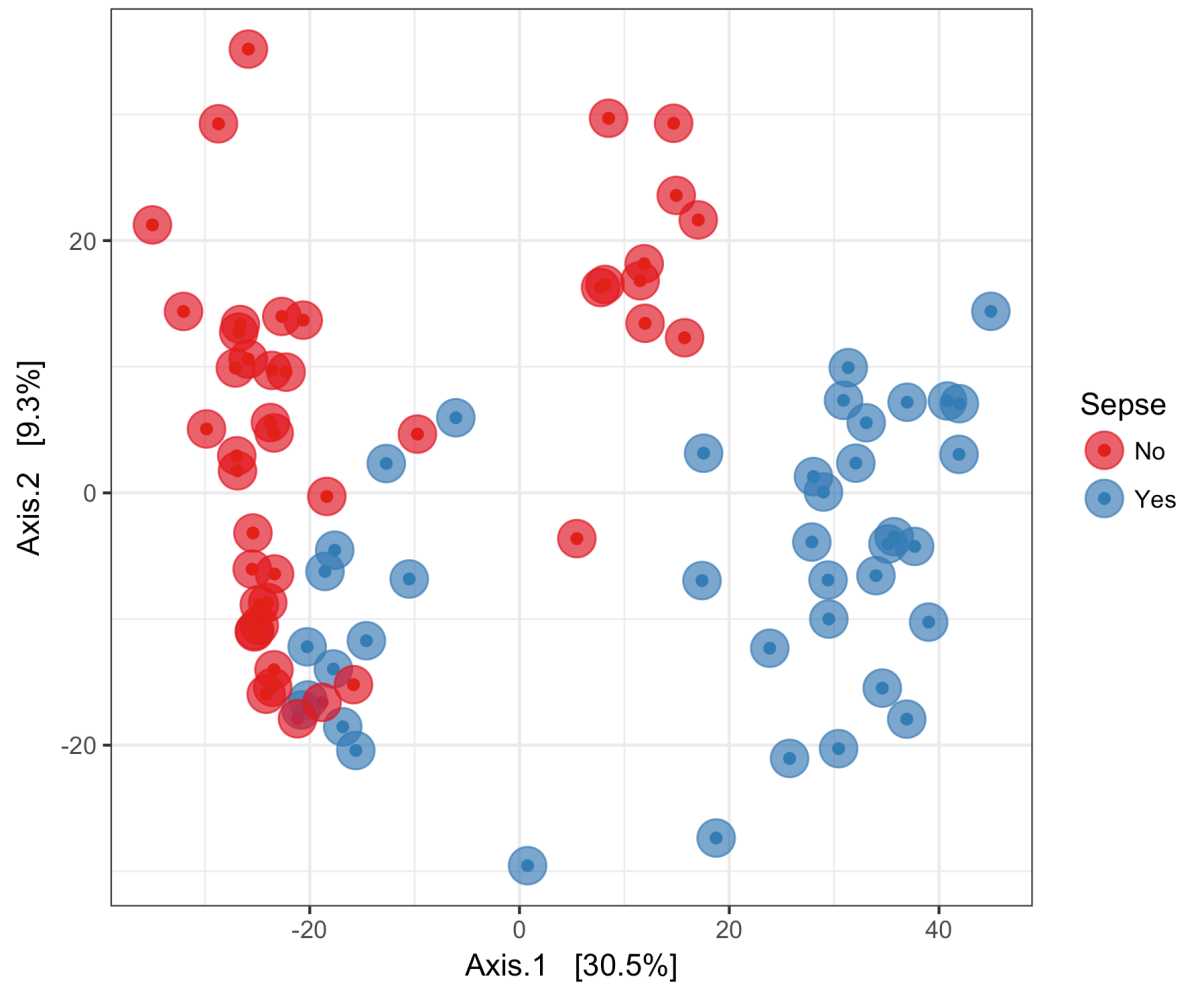
STEWART, C.J. *et al.* Longitudinal development of the gut microbiome and metabolome in preterm neonates with late onset sepsis and healthy controls. **Microbiome**, v. 5, n.75, p. 1-11, 2017

TAFT, D.H. *et al.* Intestinal microbiota of preterm infants differ over time and between hospitals. **Microbiome**, v. 2, n. 36, p. 1-12, oct. 2014.

TAFT, D.H. *et al.* Center Variation in Intestinal Microbiota Prior to Late-Onset Sepsis in Preterm Infants. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. 1-17, jun. 2015.

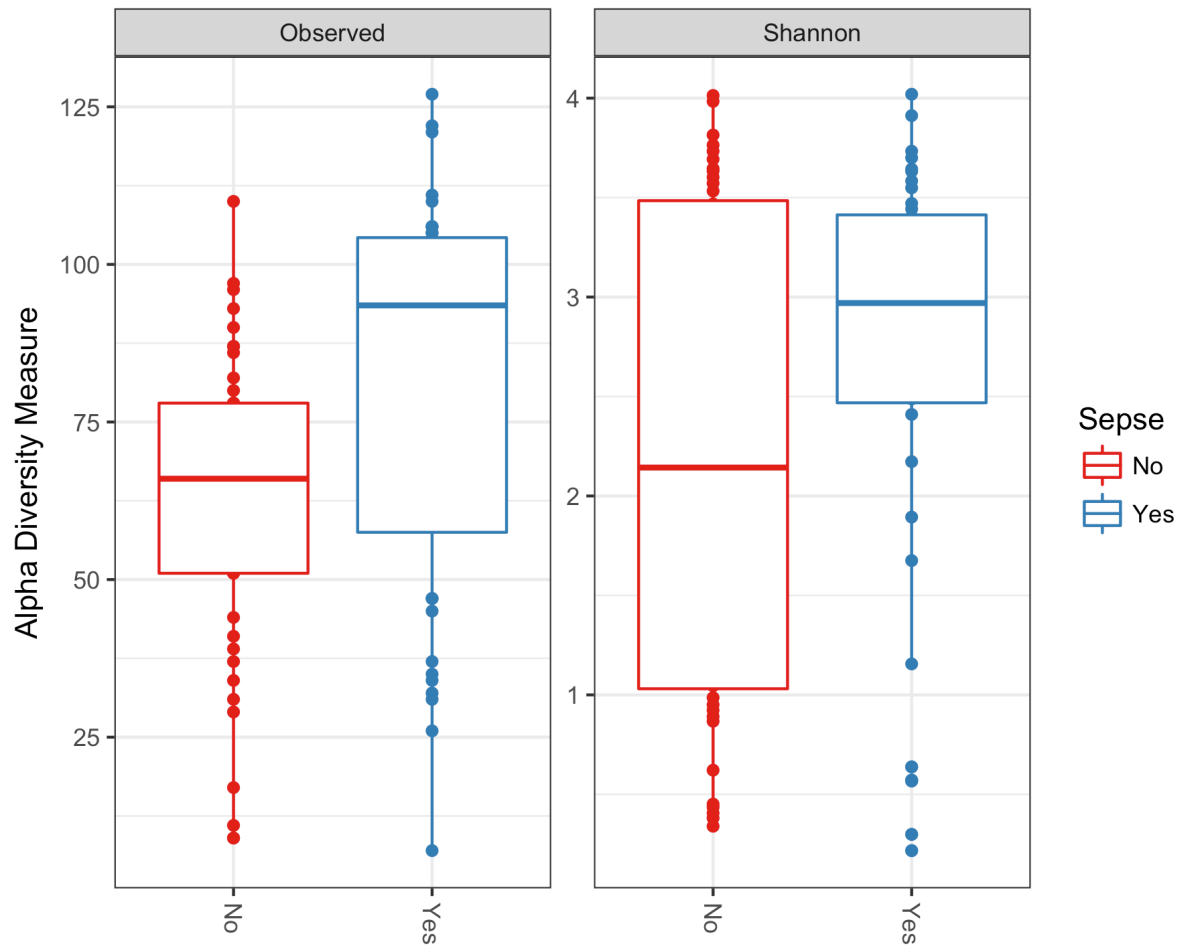
WARDWELL, L.H.; HUTTENHOVER, C.; GARRETT, W.S. Current concepts of the intestinal microbiota and the pathogenesis of infection. **Curr Infect Dis Rep**, v. 13, n. 1, p. 28-34, fev. 2011.

ZHOU, M. *et al.* Interleukin-8 for diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. 1-12, maio. 2015.

Figura 1 – Análise de coordenadas principais

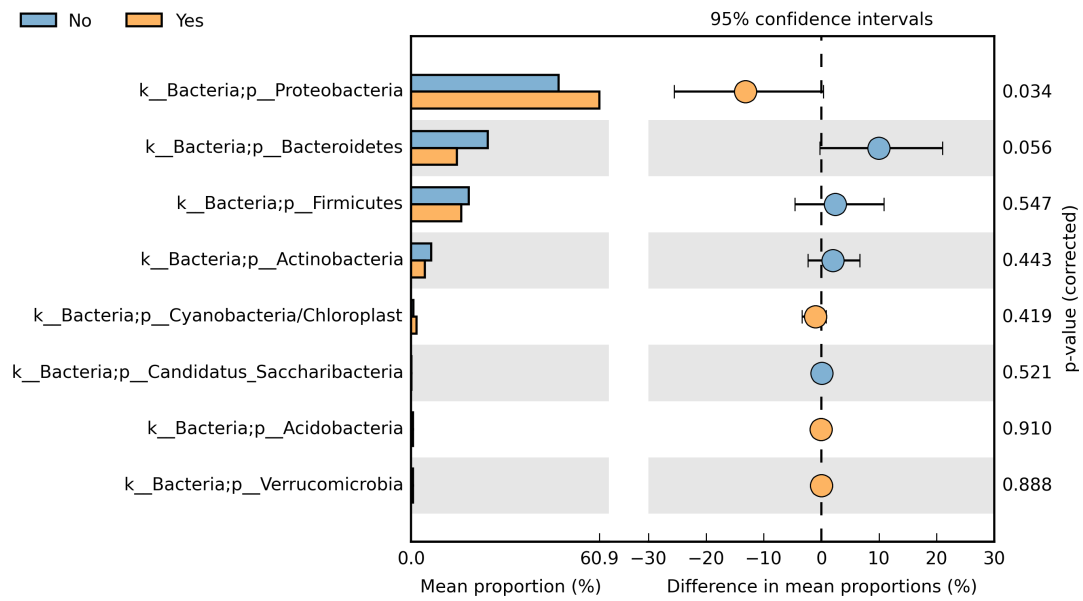
Análise de coordenadas principais (PCoA). Representa agrupamentos de comunidades microbianas encontrados em amostras de mecônio de bebês prematuros com e sem sepse. Cada ponto representa uma amostra individual, com cores indicando presença ou ausência de sepse.

Figura 2 – Alfa diversidade e índice de Shannon



Diversidade de comunidades microbianas medidas em amostras de mecônio de prematuros com e sem sepse. As caixas abrangem do primeiro ao terceiro quartil; a linha horizontal dentro das caixas representa a mediana. As linhas que se estendem verticalmente das caixas indicam variabilidade fora dos quartis superiores e inferiores. *Observed* = número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO); *Shannon* = índice de diversidade de Shannon.

Figura 3 – Abundância de filos



Average abundance of phyla present in meconium samples from preterm babies with and without sepsis. The error bars show calculated standard deviation. The colored circles represent the 95 % confidence intervals calculated using the Welch's inverted method. Corrected p-values were calculated using Bonferroni Multiple test correction.

Tabela 1 – Características dos pacientes estudados

A. Características maternas

	Sepse (n = 40)	Não Sepse (n = 44)	p valor
Bolsa Rota > 18horas	15 (37,5%)	5 (11,4%)	0,03^c
Infecção do Trato Urinário	9 (22,5%)	5 (11,4%)	0,33^c
Corioamnionite	17 (42,5%)	11 (26,2%)	0,25^c
Pré-eclâmpsia	11 (27,5%)	13 (29,5%)	0,91^c
Uso Antibiótico	33 (82,5%)	28 (63,6%)	0,20^c
Parto Vaginal	15 (37,5%)	12 (27,3%)	0,54^c

Varáveis descritas como frequências/percentis. ^c Teste Qui-quadrado.

B. Características do recém-nascido

	Sepse (40)	Não sepse (44)	p valor
Sexo masculino	24 (60%)	19 (43,2%)	0,28^c
Idade Gestacional	30 (\pm 2,4)	30,5 (\pm 2,2)	0,29^a
Peso Nascimento (g)	1395 (\pm 496)	1428 (\pm 497)	0,69^a
PIG	10 (25%)	18 (40,9%)	0,14^c
APGAR no 5^o min	8 (7-9)	9 (8-9)	0,06^b
SDR	21 (52,5%)	11 (25%)	0,03^c
DBP	12 (30%)	11 (25%)	0,90^c
Apneia	35 (87,5%)	29 (65,9%)	0,11^c
Sepse Tardia	12 (30%)	12 (27,3%)	0,84^c
HPIV	10 (25%)	9 (20,5%)	0,91^c
LPV	5 (12,5%)	3 (6,8%)	0,66^c
PCA	4 (10%)	10 (22,7%)	0,17^c
ECN	3 (7,5%)	7 (15,9%)	0,35^c
Óbito	5 (12,5%)	4 (9,1%)	0,94^c

PIG (Pequeno para Idade Gestacional), SDR (Síndrome do Desconforto Respiratório), DBP (Displasia Broncopulmonar), HPIV (Hemorragia Peri-Intraventricular), LPV (Leucomalácia Periventricular), PCA (Persistência do Canal Arterial), ECN (Enterocolite Necrosante)

Varáveis descritas como média/DP, mediana/intervalo interquartilico e frequências e percentis. ^a Teste T; ^b Teste de Mann–Whitney; ^c Teste Qui-quadrado.

Tabela 2 – Análise de discriminância linear

A. Gêneros mais associados com grupo sepse

Gênero	P valor	FDR	LDA score
<i>Paenibacillus</i>	< 0,0001	< 0,001	-1,55
<i>Caulobacter</i>	< 0,0001	< 0,001	-1,13
<i>Dialister</i>	< 0,0001	< 0,001	-0,322
<i>Akkermansia</i>	< 0,0001	< 0,001	-0,382
<i>Phenylobacterium</i>	0,000172	0,0017544	-1,95
<i>Propionibacterium</i>	0,0020472	0,015447	-0,782
<i>Ruminococcus</i>	0,0021201	0,015447	-0,528
<i>Bradyrhizobium</i>	0,0025037	0,015961	-1,92
<i>Alloprevotella</i>	0,0076397	0,043292	-0,319

Escore de análise de discriminância linear (*LDA score*) mostrando os gêneros mais prováveis de explicar a diferença entre a comunidade microbiana entre os grupos sepse e controle. Chance de Falso Descobrimto (FDR).

B. Gênero mais associado com grupo não sepse

Gênero	P valor	FDR	LDA score
<i>Flavobacterium</i>	0,009649	0,04921	0,937

Escore de análise de discriminância linear (*LDA score*) mostrando os gêneros mais prováveis de explicar a diferença entre a comunidade microbiana entre os grupos sepse e controle. Chance de Falso Descobrimto (FDR).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sepse neonatal precoce é um diagnóstico muito prevalente e de grande impacto na saúde dos RN, mesmo após a melhoria no atendimento e acompanhamento das gestantes de alto e baixo risco. Dentro deste grupo de pacientes, os prematuros encontram-se mais vulneráveis a adquirir a infecção e de sofrerem suas complicações. Apesar disto, diagnosticar sepse precoce em prematuros persiste sendo um grande desafio na vida do neonatologista.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a microbiota do primeiro mecônio do RN prematuro com idade gestacional menor ou igual a 32 semanas, para verificar se há ou não diferença nesta comunidade bacteriana entre os pacientes com e sem o diagnóstico de sepse neonatal precoce clínica, com intenção futura de auxiliar no diagnóstico daqueles pacientes realmente infectados, permitindo a redução de uso de ATB desnecessário. Percebemos que a microbiota dos dois grupos é diferente, e esta diferença pode ser explicada pela sepse precoce, porém sem encontrar um padrão específico para o diagnóstico, o que está de acordo com a literatura internacional quando estudada sepse tardia e enterocolite necrosante.

Lembrando que este estudo tem limitações e que os estudos avaliando o microbioma intestinal do RN são escassos, mais estudos sobre esse tema e suas possíveis implicações nas morbidades do RN são necessários para seguirmos ampliando nossos conhecimentos nesta área, que se mostra bastante promissora para o auxílio diagnóstico e terapêutico de diversas condições da prática médica.

10. APÊNDICE

10.1. APÊNDICE A – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

N CÓDIGO RN _____ PRONT.: _____

SEXO: (1) masc (2) feminino DN: ___ / ___ / ___ DATA ALTA: ___ / ___ / ___

PRÉ-ECLAMPSIA (1) sim (2) não

DADOS MATERNOS:

Idade materna: ___ anos N° gestações: ___ Pré-termos anteriores: (1) sim (2) não

N° consultas pré-natal: _____

DMG/ DM: (1) sim (2) não (9) ignorado

ITU/Inf. ovular: (1) sim (2) não (9) ignorado

HAC: (1) s (2) n (9) ignorado BR: ___ horas (1) 18h (2) 18h (9) ignorado

LA: (1) alterado (2) claro/ normal (9) ignorado Cultura de estrepto B: (1) positiva (2) negativa (8) não fez

Corticoide: (1) sim completo (2) não (3) sim incompleto (9) ignorado

DADOS DA INTERNAÇÃO HOSPITALAR:

Tempo de internação: ___ dias IGO: ___ sem Eco com ___ sem IG final: ___ sem

PN: _____ g Comp: _____ cm PC: _____ cm IGP (Ballard, sem): _____ sem

Classif. IG/P: (1) AIG (2) PIG Percentil <3: (1) não (2) sim TAX na admissão: _____

Tipo de parto: (1) vaginal (2) cesariana (9) ignorado

Indicação: _____

Apgar 1': _____ Apgar 5': _____ SNAPPE II: _____

Reanimação em sala de parto: (1) não precisou (2) O2 inalatório (3) VPP máscara

(4) VPP TET (5) MCE (6) drogas (7) CPAP em SP (9) ignorado

Surfactante sala de parto: (1) sim (2) não (9) ignorado Surfa outro momento: (1) sim (2) não

(9) ignorado Horas de vida na primeira dose: _____ horas Surfa número

total de doses: _____

Surfactante: (1) profilático (2) terapêutico (3) profilático e terapêutico (8) não usou surfactante
(9) ignorado

Sistema Respiratório:

DMH: (1) sim (2) não (9) ignorado Hipertensão pulmonar: (1) sim (2) não (9) ignorado BCP
congenita: (1) sim (2) não (9) ignorado BCP adquirida: (1) sim (2) não (9) ignorado
Pneumotórax: (1) sim (2) não (9) ignorado TTRN: (1) sim (2) não (9) ignorado

VMAF: (1) sim (2) não (9) ignorado iNO: (1) sim (2) não (9) ignorado

Hemorragia pulmonar: (1)sim (2) não (9) ign Adaptação Respiratória: (1) sim (2) não (9)
ignorado

Tempo VM: ____ dias VM não invasiva _____ dias TCPAPn: ____ dias Oxigenioterapia:
____ dias

DBP: (1) sim (2) não Corticoide para displasia broncopulmonar: (1) sim (2)
não

Apneias: (1) trat. c/ xantinas (2) xantinas e doxapram (8) não teve apnéias (9) ignorado

Suspensão tratamento com: ____ dv (____ IG corrig) (9) ignorado

Suporte nutricional:

NPP AA nas 24h dv: (1) sim (2) não (9) ignorado Tempo de NPT: _____ dias

Início da nutrição enteral: ____ dv (__/__/__) Enteral plena (150ml/kg/d): ____ dv (__/__/20__)

Peso mínimo: _____ g Peso mínimo: _____ dv (__/__/200__)

Recuper. PN: _____ dv (__/__/20__)

NPT plena (3g/kg/dia de AA) com 5dv: (1)sim (2)não (8) não usou NPT(9) ignorado

Acessos vasculares:

Epicutâneo (PIC): (1) sim (2) não (9) ignorado Dissecção (flebo): (1) sim (2) não (9) ignorado

Cateterismo (umbilical): (1) sim (2) não(9) ignorado

Infecções:

Sepse precoce: (1) sim - dx clínico (2) sim – HMC positiva Germe: _____ (8) não teve sepse precoce

Sepse hospitalar: (1) sim – dx clínico (2) sim – HMC positiva Germe: _____ (8) não teve sepse tardia

Uso de antibióticos:

Data:	Esquema:	Data:	Esquema:
__/__/20__	_____	__/__/20	_____
__/__/20__	_____	__/__/20	_____
__/__/20__	_____	__/__/20	_____
__/__/20__	_____	__/__/20	_____
__/__/20__	_____	__/__/20	_____

Meningite neonatal: (1) sim (2) não (9) ignorado Germe: _____

ECN: (1) sim (2) não (9) ignorado Necessidade de intervenção cirúrgica: (1) sim (2) não

Sistema Nervoso:

Convulsões neonatais: (1) sim (2) não (9) ignorado

HPIV: (0) não teve (1) grau I (2) grau II (3) grau III (4) grau IV (8) não fez eco cerebral

LPV: (1) sim (2) não (8) não fez eco

Ciclo sono-vigília: (1) ausente (2) imaturo (3) desenvolvido

Sistema Cardiovascular:

PCA: (1) dx ecocardio (2) dx clínico (8) não teve PCA (9) ignorado

Indometacina: (1) profilática (2) tratamento (3) profilático e tratamento (8) não usou (9) ignorado

Ibuprofeno: (1) profilática (2) tratamento (3) profilático e tratamento (8) não usou (9) ignorado

Fez cirurgia para PCA: (1) sim (2) não

Drogas vasoativas nas primeiras 72 horas: (1) sim (2) não

Quais: _____

Uso de CTC para choque: (1) sim (2) não

Outros:

Osteopenia (nível + alto de FA): _____ Tratamento: (1) sim (2) não (3) não teve (9) ignorado

Transfusão de CHAD: _____ (número de transfusões) Data da última transfusão: ___/___/200__

Hipoglicemia: (1) sim (2) não (9) ignorado EIM: (1) sim (2) não (9) ignorado

Incompatibilidade ABO: (1) sim (2) não (9) ignorado Exsanguíneo transfusão: (1) sim (2) não (9) ignorado

Uso de imunoglobulina para incompatibilidade ABO: (1) sim (2) não (9) ignorado

DADOS DA ALTA HOSPITALAR:

ROP: (0) sem ROP (1) ROP 1 (2) ROP 2 (3) ROP 3 (4) ROP 4 (5) ROP 5 (8) não fez avaliação

Fez cirurgia para ROP: (1) sim (2) não (9) ignorado

OEA: (1) alterado unilateral (2) alterado bilateral (3) normal (8) não fez OEA

Exame neurológico: (1) alterado (2) normal (8) não realizado (9) ignorado

Alta hospitalar com oxigênio: (1) sim (2) não

Peso: _____ g Comp: _____ cm PC: _____ cm PT: _____ cm PB: _____ cm

Alimentação: (1) SM exclusivo (2) Aleitamento misto (3) Fórmula exclusiva

Teste do pezinho: (1) normal (2) alterado (8) não foi feito (9) ignorado

10.2. APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG: 15-0537

Título do Projeto: A MICROBIOTA DO MECÔNIO COMO UM PREDITOR DE SEPSE NEONATAL PRECOCE CLÍNICA EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS

Você e seu bebê estão sendo convidados a participar de uma pesquisa cujo objetivo é saber se existe uma ligação entre infecção precoce ou inflamação no recém-nascido com alterações nas populações de bactérias (germes) que habitam o intestino de bebês prematuros.

Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes:

Será coletada a primeira eliminação de fezes do seu bebê que será retirada diretamente da fralda.

Também precisaremos acessar o seu prontuário do bebê para a coleta de dados adicionais. Por isso, solicitamos sua autorização para este acesso.

As amostras coletadas serão utilizadas exclusivamente para esta pesquisa. Após a realização de todas as análises previstas para a pesquisa, as amostras serão descartadas.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são: A coleta das fezes do recém-nascido será feita diretamente da fralda após sua eliminação, sem riscos ao paciente.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são:

Você e seu bebê não terão um benefício direto ao participar do estudo, mas irão contribuir para o melhor conhecimento dessa doença, a sepse precoce do recém-nascido, e de uma forma mais confiável para o seu diagnóstico.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que os participantes da pesquisa recebem ou possam vir a receber na instituição. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, os participantes receberão todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Rita de Cássia Silveira e com a pesquisadora Dra. Laura Vargas Dornelles pelo telefone 335918794 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do recém-nascido

Nome da mãe

Assinatura

Responsável (Se aplicável) Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo Assinatura

Local e Data: _____