

ISABELA FURTADO

Detecção por Reação em Cadeia da Polimerase de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em Sangue de Recém-Nascidos

CAMPO GRANDE - MS
2011

ISABELA FURTADO

Deteccção por Reação em Cadeia da Polimerase de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em Sangue de Recém-Nascidos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares

CAMPO GRANDE – MS
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

ISABELA FURTADO

Detecção por Reação em Cadeia da Polimerase de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em Sangue de Recém-Nascidos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), 29 de setembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Durval Batista Palhares (Orientador)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Almir de Souza Martins

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dra. Anna Maria Duarte Miglioli

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Aby Jaine Montes Moura

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Senhor e Salvador JESUS CRISTO, por estender a Sua forte e poderosa mão e me tirar das trevas para a Sua maravilhosa luz!

Muito obrigada, meu Senhor Jesus!!

“O Senhor é o meu rochedo, e o meu lugar forte, e o meu libertador; o meu Deus, a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação e o meu alto refúgio.”

Salmos 18:2

AGRADECIMENTOS

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

Meus queridos pais por acreditaram em meu potencial e me darem condições para realizar esta jornada;

Ao meu noivo **Rubens**, o qual sempre me apoiou neste desafio, me ajudando em inúmeras tarefas, sempre me incentivando;

A todos os **familiares e amigos** que me incentivaram a não desistir em meio a tantas dificuldades enfrentadas;

Ao meu orientador, **Dr. Durval Batista Palhares** por aceitar prontamente a me orientar;

Ao Prof ° **Almir de Souza Martins**, por nos ajudar na padronização desta metodologia e por ter sanado tantas dúvidas durante a realização desta dissertação;

À Dra **Anna Maria Duarte Miglioli** por todas as vezes que me ajudou, sempre me incentivando a seguir em frente;

À farmacêutica **Paula Christina Niz Xavier** por toda a preciosa ajuda em tantas etapas desta pesquisa;

Às enfermeiras da UTI-Neo: **Patrícia Trindade Benites** e **Carla Moreira Lorentz Higa, Mayara Carolina Cañedo** por me ajudarem nas coletas;

À fisioterapeuta **Luciana Venhofen Tavares** por me ajudar com a bioestatística;

Às biólogas **Fabiana Alves, Sarah Martins, Camila Bolognes Couto** e **Ana Paula Machado** por todas as vezes em que me ajudaram!

À farmacêutica **Ana Cláudia Souza Rodrigues**, a qual me sanou tantas dúvidas referentes à microbiologia;

Em Cristo JESUS, somos mais que vencedores!!!!

RESUMO

Furtado I. Detecção por Reação em Cadeia da Polimerase de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em Sangue de Recém-Nascidos. Campo Grande; 2011. [Dissertação – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul].

Introdução: Enterococos são microrganismos comensais que atuam como patógenos oportunistas podendo causar infecções em pacientes hospitalizados por longo período de tempo e aqueles que receberam múltiplos tipos de terapia antimicrobiana. São cocos Gram-positivos, catalase negativos, geralmente aos pares ou em curtas cadeias e saprófitas do trato gastrointestinal de animais, incluindo humanos, cujas duas espécies mais frequentes nas infecções humanas são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. **Justificativa:** A deficiência de estudos, em âmbito regional, das infecções em recém-nascidos e a utilização da biologia molecular para diagnóstico destas bactérias estimulou o desenvolvimento deste projeto para conhecimento e divulgação dos resultados obtidos, visando o diagnóstico precoce da doença infecciosa no recém-nascido. **Objetivo:** Detectar a presença das espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* por reação em cadeia da polimerase e reação em cadeia da polimerase em tempo real, respectivamente, em sangue de recém nascidos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da UFMS. **Metodologia:** Foram analisadas amostras de sangue de 50 recém-nascidos com quadro clínico de infecção tardia, internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Universitário da UFMS, no período de setembro de 2010 a janeiro de 2011. As amostras foram submetidas às técnicas de reação em cadeia da polimerase e em tempo real para pesquisa de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, respectivamente. Os resultados foram comparados com os resultados de hemoculturas para 40 destes pacientes. Foram coletados dados referentes aos pacientes do estudo, como sexo, idade gestacional, peso, Índice de Apgar e uso de procedimentos assistenciais e invasivos. **Resultado:** Não foi identificado crescimento compatível com enterococos nas hemoculturas, porém, em 8/50 amostras de sangue identificou-se a presença de *Enterococcus faecium* através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real. E, em 22/50 amostras de sangue, foram detectados DNA genômico de *E. faecalis*, através de PCR convencional. **Conclusão:** O resultado encontrado é preocupante devido à gravidade clínica que os pacientes avaliados apresentaram juntamente com a não identificação da bactéria por métodos microbiológicos. Acredita-se que as técnicas de PCR utilizadas constituem-se em métodos rápidos e de alta especificidade para o diagnóstico de infecções. Sugere-se que a eficácia, segurança e rapidez das técnicas aplicadas poderá constituir-se em ferramenta de auxílio imprescindível no que tange o tratamento específico e em tempo hábil. Espera-se que a implantação desta técnica como rotina no hospital favoreça o diagnóstico precoce e colabore para o bem-estar dos pacientes.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, prematuridade, infecção neonatal, PCR.

ABSTRACT

Furtado I. Detection by Polymerase Chain Reaction of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in blood of newborns. Campo Grande; 2011. [Dissertation– Federal University of Mato Grosso do Sul].

Introduction: Enterococcus are commensal microorganisms and opportunistic pathogens that can cause infections in hospitalized patients for a long period of time and those that received multiple kind of antimicrobial therapy. They are Gram-positive, catalase negative coccus, usually in pairs or in short chains and saprophyte of the gastrointestinal tract of animals, including humans, the two more common species are *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Justification:** The deficiency of studies, in the national ambit, of the infections in newborns and the utilization of the molecular biology to the diagnostic of these bacteriums stimulated the development of this project to knowledge and divulgation of the results obtained, with the view of the precocious diagnostic of the infectious disease in the newborn.

Objective: To detect the presence of the species *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* across the method of polymerase chain reaction (PCR) and real time polymerase chain reaction, respectively, in blood of newborns interned in the Neonatal Intensive Care Unit of the University Hospital of the UFMS.

Methodology: Were analysed samples of blood of 50 newborns with clinic symptoms of late infection, interned in the Neonatal Intensive Care Unit of the University Hospital of the UFMS, in the period of 2010's September to 2011's January. The samples were submitted to the techniques of polymerase chain reaction (PCR) and real time polymerase chain reaction to research of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, respectively. The results were compared with the hemoculture' results of 40 these patients. Data of the patients how, sex, gestational age, weight, Apgar Score, and use of invasive procedures.

Results: It was not identified growth of Enterococcus in the hemocultures, however, in 8/50 samples of blood was observed the presence of *Enterococcus faecium* across the technique of real time polymerase chain reaction, and in 22/50 blood samples were detected genomic DNA of *E. faecalis*, by PCR.

Conclusion: The results founded is preoccupying because of the clinic severity of the patients analysed coupled with the fact of that the bacteria was not identified across traditional methods. It's believed that the methods of PCR utilized are fast and specific to the diagnostic infections. Is suggested that the efficacy, security and brevity of the techniques utilized will can turn these methodology instruments of important help to the specific treatment in a able time. It's wait that the implantation of this method how routine in the hospital benefit to precece diagnostic and collaborate to the well-being of the patients.

Key-words: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, prematurity, neonatal infection, PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipo de parto e índice de prematuridade entre os recém-nascidos com a presença de pelo menos uma das bactérias pesquisadas através de PCR e PCRrt.....	38
Tabela 2 – Procedimentos invasivos e assistenciais na UTI Neonatal aos recém-nascidos com a presença de pelo menos uma das bactérias pesquisadas através de PCR e PCRrt.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sequência de nucleotídeos da região alvo de PCR para <i>Enterococcus faecium</i>	35
Figura 2 – Sequência de nucleotídeos da região alvo de PCR para <i>Enterococcus faecalis</i>	35
Figura 3 – Amostras positivas para <i>Enterococcus faecium</i> através de PCR em Tempo Real.....	39
Figura 4 – Resultado da PCR convencional com os primers para <i>Enterococcus faecalis</i> em amostras de DNA de sangue dos RNs avaliados.....	39
Figura 5 – Resultado da PCR convencional com os primers para <i>Enterococcus faecalis</i> em amostras de DNA de sangue dos RNs avaliados.....	40
Figura 6 – Resultados das técnicas de PCRrt e PCR convencional para as bactérias <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> no sangue dos recém-nascidos internados na UTI Neonatal HU-UFMS, Campo Grande – MS.....	40
Figura 7 – Curva padrão para <i>Enterococcus faecium</i> evidenciando 2 picos de temperatura de dissociação.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Etilenodiamina Tetracética Dissódica
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EMAs	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
VER	Enterococos resistente à vancomicina
ITU	Infecção do trato urinário
NaCl	Cloreto de Sódio
OD	Densidade óptica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCRrt	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
RNs	Recém-nascidos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	micrograma
μl	microlitro
rpm	rotações por minuto
ml	mililitro
ng	nanograma
min	minuto
pb	pares de base
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta
γ	gama
pH	potencial hidrogeniônico

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	61
APÊNDICE 2 – Protocolo para análise de Prontuários.....	63

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo de Extração de DNA Genômico.....	67
Anexo 2 – Carta de autorização pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFMS....	72

SUMÁRIO

Resumo.....	05
Abstract.....	06
LISTA DE TABELAS.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	09
LISTA DE SÍMBOLOS.....	10
LISTA DE APÊNDICES.....	11
LISTA DE ANEXOS.....	12
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A Sepsé Neonatal.....	18
2.2 Os Agentes da Infecção Enterocócica.....	23
2.2.1 Características Gerais.....	23
2.2.2 Resistência em Enterococos.....	24
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	28
3.2 Específicos.....	28
4 MATERIAL E CASUÍSTICA.....	29
4.1 População.....	30
4.1.1 Critérios de Inclusão.....	30
4.1.2 Critérios de Exclusão.....	30
4.2 Coleta de Amostras para Hemoculturas.....	31
4.3 Processamento das Amostras.....	31
4.3.1 Coleta de Amostras de Sangue para PCR Convencional e PCR em Tempo Real.....	31
4.3.2 Extração do DNA Genômico das Amostras Sanguíneas.....	32
4.3.3 PCR em Tempo Real	33
4.3.4 PCR Convencional.....	33
4.3.5 Gel de Agarose.....	34
4.4 Análise dos Resultados.....	34
5 Resultados.....	36

6 Discussão.....	42
7 Conclusões.....	48
8 RECURSOS FINANCEIROS.....	50
9 REFERÊNCIAS.....	52
10 APÊNDICES.....	60
11 ANEXOS.....	66

Os enterococos fazem parte da microbiota normal da cavidade oral e do trato gastrointestinal como microrganismos comensais que atuam como patógenos oportunistas e que podem causar infecções em pacientes hospitalizados por um longo período de tempo, imunocomprometidos, submetidos a procedimentos invasivos, assim como, aqueles que receberam múltiplos tipos de terapia antimicrobiana ¹.

Recentemente tem emergido como importante agente patogênico em ambientes hospitalares causando infecções severas com altas taxas de mortalidade ², sendo as duas espécies mais frequentes: *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

As infecções mais comuns são as do trato urinário, de feridas, bacteremia, septicemia e endocardites. Algumas espécies podem ser isoladas a partir de solo, alimentos, água e plantas, podendo crescer e sobreviver sob diversas condições ambientais.

Nas últimas décadas houve um aumento na frequência de seu isolamento ³ sendo um patógeno emergente tanto nas infecções hospitalares como nas adquiridas na comunidade ⁴, responsáveis por 12% das infecções nosocomiais ¹.

Uma característica marcante das bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* é a resistência intrínseca a muitos dos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por cocos Gram-positivos.

A carência de estudos, em âmbito regional, que relatem as infecções por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em recém-nascidos internados em unidades de tratamento intensivo estimulou o desenvolvimento deste projeto para conhecimento e divulgação dos resultados obtidos, visando o diagnóstico precoce da doença infecciosa no recém-nascido (RN), através da biologia molecular, que oferece rapidez e especificidade, tornando-se imprescindível para uma terapia específica bem sucedida.

2.1 A Sepse Neonatal

A sepse neonatal é a mais frequente infecção hospitalar em unidades de terapia intensiva neonatais e sua incidência vem aumentando em decorrência da maior sobrevivência dos recém-nascidos de muito baixo peso e extremo muito baixo peso. Além disso, o uso de cateteres vasculares são grandes fatores de risco para esta complicação, contribuindo significativamente com a morbidade, custos e prolongamento da hospitalização ⁴.

É definida como síndrome clínica de bacteremia com sinais sistêmicos e sintomas de infecção, nas primeiras quatro semanas de vida, sendo a principal causa de mortalidade entre neonatos, responsável por aproximadamente 30 a 50% do total de mortes neonatais ⁵.

Se diagnosticada precocemente e tratada de forma adequada através de antibioticoterapia específica e cuidados de suporte, é possível eliminar a maioria dos casos de sepse, principalmente quando não houver resistência bacteriana.

A sepse neonatal é classificada em duas categorias: primária, usualmente presente com desconforto respiratório e pneumonia e normalmente acontece nas primeiras 72 horas após o nascimento; e sepse tardia, usualmente com septicemia e pneumonia, ocorre após 72 horas do nascimento ⁶.

A sepse primária frequentemente manifesta-se como pneumonia e geralmente origina-se no trato genital materno, causada por organismos prevalentes neste trato. Alguns fatores estão associados à sepse primária, os quais incluem: baixo peso ao nascimento, ruptura prolongada de membranas, febre materna, entre outros ⁷.

Tradicionalmente a sepse primária é causada por: *Estreptococos* do grupo B, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, além de outras bactérias ^{7, 8}. Já a sepse tardia é originada por patógenos encontrados no ambiente, sendo que em pacientes hospitalizados, os mais comuns agentes etiológicos são: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus*, *Candida* spp, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* ^{8, 9}.

Esta infecção é frequentemente transmitida através de mãos contaminadas de profissionais da saúde e os sintomas se apresentam como septicemia, pneumonia ou meningite ⁶.

Entre os fatores de maior risco para sepse tardia estão muito baixo peso ao nascer, prematuridade, longos períodos de internação hospitalar e o uso de procedimentos invasivos. A mortalidade devido à sepse em neonatos prematuros e com muito baixo peso ao nascimento permanece entre 18 à 20% nos países desenvolvidos e em torno de 80% nos países em desenvolvimento, sendo estes notáveis fatores de risco para esta população ^{8,10}.

SepSES relacionadas ao uso de cateteres endovenosos ocorrem em 1.3% a 26.2% dos pacientes com cateter vascular central usado para administrar soluções parenterais e medicamentos. Devido aos seus componentes nutricionais, a nutrição parenteral pode suportar crescimento microbiológico.

A imunossupressão associada às condições nutricionais não favoráveis, a hiperglicemia exacerbada por infusão de dextrose e a colonização e contaminação de cateteres, aumentam o risco de infecções nestes pacientes ⁹.

Benjamin Jr. e colaboradores, em 2001, observaram que recém-nascidos com bacteremia experimentaram menores complicações infecciosas quando cateteres vasculares centrais foram removidos rapidamente, em relação àqueles em que os cateteres não foram retirados dentro de 24 horas ¹¹.

Van Der Brock e colaboradores, em 2001, avaliaram se a prática de lavagem das mãos e o uso de luvas ao contato com secreções e excretas faziam diferença no grau de contaminação da equipe de atendimento do departamento de pediatria e foi observada a presença de microrganismos patogênicos em 35% da equipe de saúde antes do início de suas atividades e em 25% após a aplicação de solução alcoólica.

Sendo os patógenos isolados: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, entre outros. Os autores também concluíram que campanhas para aprimorar a higiene das mãos devem ampliar seu foco para o ensino da técnica adequada ¹².

Pacientes hospitalizados podem ter uma maior incidência de infecção enterocócica não somente devido à virulência, mas porque o hospital em si mesmo é um meio favorável, devido às constantes internações de pacientes colonizados com bactérias resistentes. E, isto pode ser ilustrado pelo Departamento de Saúde do Reino Unido, em 2004, o qual destaca o fato de que os enterococos podem contaminar e sobreviver ao redor dos pacientes por vários dias ¹³.

Estes microrganismos podem sobreviver em utensílios como termômetros e estetoscópios, e também sobre as mãos de profissionais de saúde por períodos

prolongados, esta característica associada à sua resistência intrínseca e adquirida a vários antibióticos e à sua habilidade em colonizar indivíduos, torna-os potentes patógenos nosocomiais ¹⁴.

A resistência a vários antibióticos empregados atualmente pode ser intrínseca ou adquirida por mutação ou recebendo material genético estranho através de plasmídeos e transposons ¹⁵.

A maior parte destas infecções origina-se da própria microbiota normal do paciente, embora possam também ser transferidas de paciente para paciente ou através do consumo de água ou alimentos contaminados ¹⁶.

Por muitos anos, as bactérias componentes da microbiota normal do trato gastrointestinal foram consideradas inofensivas para os seres humanos e não muito importantes na medicina. Mas, recentemente se tornaram um dos mais comuns patógenos nosocomiais, com taxas de mortalidade de mais de 60 % entre os pacientes ¹⁷.

As espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* têm sido documentadas entre as principais causas de bacteremia, sepses, endocardites, sepse neonatal e meningite ^{18, 19}.

Estas bactérias representam a segunda causa mais comum de bacteremia e endocardites em hospitais norte-americanos ²⁰, sendo responsável por 8% das bacteremias nosocomiais ²¹. No Brasil, é a segunda causa mais comum de bacteremias causadas por patógenos Gram-positivos e a espécie *Enterococcus faecalis* é responsável por, aproximadamente, 76% de todas as infecções enterocócicas ²².

Bearman e Wenzel, em 2005, relataram *S. aureus*, estafilococos coagulase-negativos e os enterococos como as espécies mais relacionadas à bacteremia ²³.

Poh e colaboradores, em 2006, determinaram a epidemiologia e a resposta clínica de quarenta e dois pacientes adultos com bacteremia enterocócica, quando 18 pacientes usaram procedimentos invasivos e a infecção do trato urinário foi a fonte de infecção mais comum entre os pacientes ²⁴.

O fato das espécies enterocócicas serem patógenos oportunistas foi claramente ilustrado por um estudo na Dinamarca, o qual mostrou que pacientes hospitalizados tiveram 57% de taxa de infecção por *E. faecalis* enquanto indivíduos saudáveis mostraram somente 39 a 40% de ocorrência. Pacientes hospitalizados

podem ter maior incidência não somente devido à virulência ²⁵, mas também por fatores ambientais e imunológicos.

Em 2005, foram reportados 7066 casos de bacteremia causada por espécies enterocócicas no Reino Unido, um aumento de 8% desde 2004, sendo 28% destes resistentes a antibióticos ²⁶. O risco de morte por enterococos resistente à vancomicina é de 75%, comparado com 45% de risco por estratos suscetíveis ²⁷.

Em estudo realizado por Fernandez et al., em 2004, foram analisadas características epidemiológicas, clínicas e prognósticas de casos de bacteremias por *Enterococcus faecalis*. Noventa e cinco episódios foram documentados, 83.2 % com origem nosocomial, 85.3 % associados a procedimentos invasivos, 9.5 % em neonatos e 41.1 % tinham recebido amplo espectro de antibióticos previamente ²⁸.

A importância clínica de infecções enterocócicas tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas, no sentido de identificar e controlar a sua ocorrência ¹⁹.

Os sintomas de infecção neonatal não são específicos, mesmo para os diferentes agentes, havendo a necessidade de testes microbiológicos e moleculares mais sensíveis e específicos ²⁹.

Estas tecnologias moleculares podem detectar até pequenas quantidades de DNA bacteriano diretamente de amostras de sangue e possuem grande sensibilidade e especificidade na detecção de muitos agentes infecciosos relacionados à sepse, podendo ser úteis juntamente com diagnósticos microbiológicos tradicionais ³⁰.

Neste sentido, Jordan e Durso, em 2005, utilizaram PCRrt para diagnóstico de DNA bacteriano de amostras sanguíneas de neonatos sendo avaliados por sepse. E, os resultados sugeriram que as técnicas moleculares podem incrementar os métodos de cultura para diagnóstico de sepse ³¹.

Semelhantemente, Martin e colaboradores, em 2002, realizaram um estudo quantitativo de bactérias isoladas de cáries obtidas de dentinas, através de colônias microbiológicas e PCR em tempo real. A PCRrt indicou um número maior de carga microbiana do que aquele determinado pela contagem das colônias ³².

Gomes e colaboradores, em 2006, investigaram a presença de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas através de cultura e reação em cadeia da polimerase, sendo identificado em 23 e 79 de 100 casos, respectivamente ³³.

Estes métodos através da PCR detectam dados qualitativos enquanto a técnica quantitativa de PCR em tempo real é capaz de detectar e quantificar bactérias em amostras ³⁰.

As técnicas de PCR em tempo real e convencional consistem em métodos rápidos, específicos e muito sensíveis aos agentes para os quais foram desenhados, desde que se tenha material genômico para a identificação ³⁴.

Embora a erradicação das infecções hospitalares seja impossível, efetiva vigilância e controle destas podem reduzir significativamente seus índices e custos associados ³⁵, permitindo aos hospitais tomarem medidas de intervenção apropriadas para seu controle e prevenção, pois a identificação a respeito da presença de patógenos colonizadores pode ser decisiva na escolha do tratamento ³⁶⁻³⁸.

2.2 Os Agentes da Infecção Enterocócica

O nome enterococcus foi primeiramente usado por Thiercelin, em 1899, devido a sua origem intestinal ³⁹. Em 1906, Andrews & Horder propuseram a transferência para o gênero *Streptococcus*, sob a denominação de *Streptococcus faecalis*, devido a sua habilidade em formar curtas ou, sob determinadas condições longas cadeias ⁴⁰. E, no início dos anos 60, a espécie *Streptococcus faecium* foi oficialmente reconhecida ⁴¹.

Em 1984, foi proposta a criação do gênero *Enterococcus* que reunia inicialmente as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, até então classificadas como estreptococos do Grupo D, segundo o sistema de grupagem sorológica de Lancefield ⁴².

2.2.1 Características Gerais

Os enterococos são cocos Gram-positivos que geralmente se dispõem aos pares ou em curtas cadeias e são catalase negativos ⁴³⁻⁴⁴, anaeróbios facultativos,

microrganismos não esporulados. Pertencentes à família Enterococcaceae, gênero *Enterococcus* e possuem 28 diferentes espécies ⁴⁴. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais relacionadas às infecções em humanos, sendo que, doenças causadas por outras espécies deste gênero são raras.

Estas bactérias crescem em meios de cultura com 40% de sais biliares ou com NaCl a 6,5% (pH de 9,6 e à temperatura de 5-50° C), Sendo que as temperaturas ótimas, mínimas e máximas de crescimento, são 42,7, 6,5 e 47,8 ° C, respectivamente, em condições aeróbicas, embora o crescimento também ocorrerá em atmosfera anaeróbica ⁴⁶, além de tolerar temperaturas elevadas por longos períodos de tempo (60°C/30 min) ⁴⁷, o que os torna distintos de outros gêneros como *Streptococcus*.

Quanto à hemólise em ágar - sangue, o comportamento dos enterococos é variável, podendo ser α , β ou δ hemolíticos ⁴⁸.

Seu principal reservatório humano é o trato gastrointestinal, porém podem ser encontrados, embora com menos frequência, na cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina ¹. Muito resistentes às condições ambientais, também podem ser encontrados no solo, em alimentos, na água, em animais, pássaros e insetos ^{44, 48}.

Possuem um grande número de fatores de virulência como: substância de agregação, gelatinase, produção extracelular de superóxido, polissacarídeos capsulares e determinantes de resistência aos antibióticos ⁴⁹.

Pelo fato de produzirem bacteriocinas, têm sido muito utilizados, durante a última década, na indústria alimentícia como probióticos ⁵⁰.

Recentemente, embora estudos na taxonomia e identificação das espécies enterocócicas tenham sido desenvolvidos ainda é difícil distingui-las de outras bactérias ácido lácticas, particularmente, dos *Streptococos* do grupo D e de outras espécies enterocócicas, o que tem sido facilitado pelo desenvolvimento na tipagem genética, auxiliando a análise da epidemiologia de surtos e suas fontes ^{51, 52}.

2.2.2 Resistência em Enterococos

Uma característica marcante das bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* é a resistência intrínseca a muitos dos antimicrobianos utilizados no

tratamento de infecções por cocos Gram-positivos como, por exemplo, oxacilina, lincosaminas e cefalosporinas. Os isolados de enterococcus resistentes à vancomicina (ERV) foram primeiramente reportados no final da década de 1980 ⁵³.

A resistência intrínseca a moderadas concentrações de aminoglicosídeos, o que ocorre em todas as espécies, decorre de uma baixa penetração do antimicrobiano pela parede bacteriana. Nesses casos, a associação de um aminoglicosídeo com um antimicrobiano que atue interferindo na formação da parede celular resulta em um efeito sinérgico bactericida ⁵⁴.

Somando à resistência intrínseca, os enterococos podem adquirir novos genes que codificam enzimas que modificam os antibióticos conferindo resistência a diversas classes de antimicrobianos, como cloranfenicol, altas concentrações de aminoglicosídeos e β -lactâmicos, glicopeptídeos e quinolonas ^{54, 55}.

Enterococos com resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos têm sido descritos com frequência crescente nas últimas décadas ⁵⁶. Esta resistência adquirida pode ser decorrente de mutações cromossômicas, no caso da estreptomicina, ou da inativação enzimática através da produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs), codificadas por genes em plasmídeos transferíveis e transposons ⁵⁷.

A espécie *Enterococcus faecium* é inerentemente mais resistente a muitos agentes antimicrobianos e o alto nível de resistência aos aminoglicosídeos e glicopeptídeos são usualmente maiores nesta espécie quando comparada à espécie *E. faecalis*. Sendo que no Brasil, aproximadamente a metade dos isolados clínicos de *E. faecium* são resistentes à ampicilina ⁵⁸.

A espécie *Enterococcus faecalis* tem adquirido alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, e aos glicopeptídeos, embora a resistência à ampicilina seja ainda raramente encontrada ⁵⁹.

A vancomicina, um glicopeptídeo tricíclico originário de um actinomiceto, *Ammycolatopsis orientalis*, e posteriormente modificado, é um dos antibióticos de escolha no tratamento de infecções de caráter grave produzidas por cocos Gram-positivos, quando não é possível utilizar a penicilina ou outros β -lactâmicos ⁶⁰, consiste no principal fármaco alternativo da penicilina, em conjunto com um aminoglicosídeo, no tratamento das infecções enterocócicas ⁶¹.

A resistência à vancomicina é uma das principais causas de infecções nosocomiais nos hospitais dos Estados Unidos, e em 2003 foi responsável por

28,5% das infecções nosocomiais enterocócicas em unidade de tratamento intensivo⁶².

Existem seis tipos de fenótipos de resistência à vancomicina descritos atualmente (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE e VanG) os quais apresentam níveis de expressão de resistência diferenciados, sendo alguns característicos de determinadas espécies. Destes, VanA e VanB são os mais relevantes clinicamente devido à capacidade de transferência genética entre espécies e gêneros, sendo ambos mais encontrados em *E. faecium* e *E. faecalis*.

A teicoplanina é um fármaco glicopeptídeo que exibe muitas semelhanças com a vancomicina. Os enterococos VanA são resistentes à teicoplanina, porém os VanB e VanC são suscetíveis a este fármaco⁶³.

A terapia antimicrobiana para as infecções enterocócicas é complicada, pois a maioria dos antibióticos não tem efeito bactericida em concentrações clinicamente relevantes.

Desta forma, as infecções enterocócicas sistêmicas, como endocardites, são comumente tratadas com um agente que atue na parede celular (um betalactâmico, como a ampicilina, ou um glicopeptídeo, como a vancomicina) e um aminoglicosídeo (usualmente gentamicina ou estreptomicina). Esses agentes atuam sinergicamente para promover a ação bactericida.

Em geral, a monoterapia é adequada para o tratamento de infecções teciduais e do trato urinário, que não apresentem complicações e a ampicilina ou penicilina permanecem como agente de escolha para tais infecções⁶⁴.

A resistência a antibióticos das espécies enterocócicas, em âmbito nacional e internacional, destaca a necessidade por maior entendimento deste gênero, incluindo sua ecologia, epidemiologia e virulência⁶⁵.

O diagnóstico e a antibioticoterapia precoce, com apropriado manejo dos problemas metabólicos e respiratórios e as medidas preventivas podem reduzir de forma significativa os problemas relacionados à sepse neonatal⁶⁵.

A hemocultura é o padrão ouro para diagnóstico de sepse, porém possui baixa sensibilidade e os resultados não ficam disponíveis em tempo menor do que 48 a 72 horas^{66,67,68}. Constituem uma importante ferramenta epidemiológica de base para a terapia empírica. Entretanto, seu valor como diagnóstico geral para o clínico é limitado devido à demora nos resultados, baixa sensibilidade e o uso de antibióticos antes do exame⁶⁸.

Além do mais, em crianças com menor contagem de colônias de bactérias, tanto quanto 60 % dos resultados podem ser falsos negativos, é o que relata Squire e colaboradores, quando seu estudo demonstrou hemoculturas negativas em 18% das crianças, as quais morreram por infecção bacteriana ⁶⁹.

Enquanto um resultado de cultura positivo confirma o diagnóstico de sepse, um resultado negativo não transmite o mesmo grau de certeza e não é sempre utilizado para determinar o tratamento antimicrobiano ⁶⁸.

Brozanski e colaboradores, em 2006, observaram que a PCR constitui em uma ferramenta que pode ser facilmente incorporada em hospitais para avaliação de crianças admitidas em unidades de terapia intensiva por sepse. Eles concluíram que o uso da PCR poderia diminuir a antibioticoterapia empírica e a estadia hospitalar ⁷⁰.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a detecção de sequências genômicas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* por PCR em sangue de recém-nascidos.

3.2 Específicos

3.2.1 Detectar as sequências genômicas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* por reação em cadeia da polimerase convencional e em tempo real, respectivamente, em sangue de recém-nascidos com suspeita ou piora de infecção, internados na UTI Neonatal do HU-UFMS.

3.2.2 Identificar a especificidade e sensibilidade da reação em cadeia da polimerase convencional e em tempo real, para detecção de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, respectivamente, em sangue de recém-nascidos internados na UTI Neonatal do HU-UFMS.

3.2.3 Identificar os casos de hemoculturas positivas para o gênero *Enterococcus*.

3.2.4 Caracterizar a população estudada quanto ao sexo, idade gestacional, peso, índice de Apgar, tipo de parto, taxa de prematuridade dos recém-nascidos e uso de procedimentos invasivos.

4.1 População

Participaram do estudo 50 recém-nascidos internados na UTI Neonatal do Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul no período de setembro de 2010 a janeiro de 2011.

Os recém-nascidos foram incluídos no estudo, independentemente de etnia, cor, sexo e idade gestacional.

A pesquisa só foi iniciada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS (Protocolo nº 1520) e as mães ou responsáveis deram o seu consentimento de participação voluntária no estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em apêndice.

4.1.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo os recém-nascidos (pré-termo, termo ou pós-termo) que apresentavam suspeita de infecção hospitalar, internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) com pelo menos 72 horas de internação ou aqueles com piora clínica ou troca de antibioticoterapia, no período de setembro de 2010 a janeiro de 2011.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os recém-nascidos de etnia indígena ou aqueles os quais os pais ou responsáveis não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 Coleta de Amostras para Hemoculturas

As amostras de sangue para hemocultura foram colhidas de rotina pelo Serviço de Neonatologia-NHU nos casos de suspeita de infecção dos recém-nascidos com piora clínica. Foram colhidos em torno de 2,0 ml de sangue, colocados em frasco específico e encaminhados para o Laboratório Central do HU-UFMS, onde foram processados e analisados pelo sistema automatizado, segundo metodologia Bactalert, sendo os resultados comparados com os obtidos por este estudo.

4.3 Processamento das Amostras

4.3.1 Coleta de Amostras de Sangue para PCR Convencional e PCR em Tempo Real

As amostras de sangue foram colhidas de veia periférica com todo rigor de assepsia e aproveitando-se a oportunidade de coleta de material da rotina do Serviço.

Era colhido 0,5 ml de sangue em tubo com EDTA o qual foi imediatamente transportado para o congelador a -70° C até a extração de DNA e posterior PCRrt e PCR convencional.

Em todas as amostras de sangue processadas foram pesquisadas as seguintes bactérias: *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. O período da coleta foi de aproximadamente quatro meses, com o número de 50 amostras. A análise de prontuários foi feita através dos dados coletados: sexo, idade gestacional, peso ao nascimento (g), Índice de Apgar, tipo de parto, uso de antibacterianos, uso de procedimentos assistenciais e invasivos pelo paciente.

4.3.2 Extração do DNA genômico das amostras sanguíneas

A extração do DNA genômico das amostras sanguíneas armazenadas a -70° C foi realizada de acordo com o método de Grimberg et al (1989) ⁷², com algumas modificações realizadas no Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica Funcional (NUFIGEN – ICB - UFMG) para sangue total congelados a -70 ° C. Foi removida uma alíquota de 0,3 ml (300 µl) do sangue e colocado em um tubo de 2 ml.

Acrescentou-se 1 ml de Tampão de Lise Celular. Centrifugou-se por 5 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante foi então desprezado em papel absorvente. Estes procedimentos foram repetidos por quatro vezes. Foi acrescentado 400 µl de Master Mix, sendo 390 µl de Tampão de Digestão de Proteínas e 10 µl de Proteinase K (20 mg/ml), e agitado por 15 segundos.

As amostras foram incubadas a 55 ° C em Banho Maria por no mínimo 2 horas. O material foi centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, e acrescentado 200 µl de Cloreto de Lítio 7,5 M.

As amostras foram agitadas por aproximadamente 5 segundos e colocadas em gelo por 10 minutos. Foram, então, centrifugadas por 20 minutos a 13.000 rpm, à 4 ° C. De cada amostra foi retirado cuidadosamente o sobrenadante e colocado em um novo tubo. O DNA genômico foi precipitado com a adição de 1 ml de etanol 100% e colocadas no congelador por no mínimo 1 hora.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet deixado secar por 15 minutos e acrescentado 50 µl de tampão TE pH 7,5 em cada amostra. Após a extração, o DNA genômico foi quantificado pela leitura em Genequant-OD260. Alíquotas de aproximadamente 200 ng de cada amostra foram utilizadas para PCRrt e 100 ng para PCR convencional, sendo estas obtidas através de diluições.

As alíquotas de DNA foram submetidas à PCR em datas diferentes e em locais diferentes: Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica Funcional (NUFIGEN- ICB-UFMG) para extração de DNA genômico e PCRrt, e Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Católica Dom Bosco para PCR convencional.

4.3.3 PCR em Tempo Real

A técnica de PCR_{rt} foi realizada no Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica Funcional (NUFIGEN- ICB-UFMG) da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta técnica foi realizada nas 50 amostras de sangue para a pesquisa da bactéria *Enterococcus faecium*.

Para a reação de PCR em tempo real foi utilizado o kit *SYBR GREEN PCR core Reagents* da PE Biosystems. Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) foram desenhados a partir de sequências genômicas encontradas no Genbank. Os primers selecionados para *Enterococcus faecium* foram: EFAEFOR1 = 5'-gggtacaacccgattacttcgtcccat-3' e EFAEFOR2 = 5'-gggtacaacccgattactttgtcccat; EFAEREV1 = 5'-tctgccgtctacttcttgatggt-3' e EFAEREV2 = 5'-tctgccgtctacttcttgaatggt-3'.

Os ciclos foram padronizados pelo aparelho ABI Prism 7000. Os primers (300 mM cada), 50-100 ng de DNA e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) foram combinados e executados sob condições padrão no Sequence Detection ABI Prism 7000 como determinado pelo KIT. Em todos os ensaios controles positivos e negativo (no-template-PCR) foram incluídos. O valor de CT (threshold cycle) foi determinado para cada amostra positiva.

4.3.4 PCR Convencional

A amplificação das amostras extraídas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional⁷³ foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Os *primers* selecionados para *Enterococcus faecalis* foram: FAECALISFOR = 5'-gcaattactggtggaggacctgg-3' e FAECALISREV = 5'-tccaattcctttgcaagacctgc-3'. Estes foram desenhados a partir de sequências genômicas encontradas no Genbank.

A PCR foi realizada em 50 amostras com 200 ng de DNA genômico cada. Foi feito um mix contendo em cada tubo 14, 37 µl de água mili-Q SF; 2,5 de tampão

PCR 10x; 2 µl de dNTP mix, (200 µM cada dNTP); 1,00 µl de MgCl₂ a 50 mM; 2 µl de cada *primer* (10 pmol/µl); 0,125 µl (5 U) de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec) e 1 µl de DNA genômico, num volume total de 25 µl de reação.

Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água. A reação foi desenvolvida em termociclador com o seguinte programa: 95 ° C/ 5 min.; seguidos de 05 ciclos de 94 ° C/ 1 min.; 56 ° C/1 min, e 72 ° C/1 min.; seguidos de 40 ciclos de: 92 ° C/1 min.; 60 ° C/ 1 min, e 72 ° C/ 1 min.; com extensão final a 72 ° C/4 min.

4.3.5 Gel de agarose

As bandas de DNA obtidas foram analisadas através de eletroforese a 80 Volts/1hr, em gel de agarose (Ludwig Biotec) a 1.5%, em 1x TBE. O produto da PCR foi, então, visualizado por coloração com Gel Red e exposição em transiluminador de UV e fotografados.

4.4 **Análise dos resultados**

A comparação entre o grupo dos recém-nascidos avaliados em relação ao PCR sanguíneo, foi realizada por meio do teste não paramétrico Qui-quadrado com tabela de contingência 2x2 com células de valor maior que 5. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0 (2003 atualizado 2010), considerando diferenças significativas quando o valor de “p” foi menor que 0,05 ⁷⁴.

GGTACAACCCGATTACTTTGTCCCATTGAAAATCATTGATGGAGCAACGCCAGA
ACTTCCAGCTGGAGCTACCATTCAAGAAGTAGACGGCAGA

Figura 1. Sequência de nucleotídeos da região alvo de PCR para *Enterococcus faecium* (78 pb). Os iniciadores selecionados para PCR em Tempo Real estão sublinhados

GCAATTACTGGTGGAGGACCTGGAAAATGGTTACCATGGCTACAACCCGCATA
TGATTTTGTTCAGGTCTTGCAAAAGGAATTGGA

Figura 2. Sequência de nucleotídeos da região alvo de PCR para *Enterococcus faecalis* (87 pb). Os iniciadores selecionados para PCR convencional estão sublinhados

Participaram do estudo 50 recém-nascidos, os quais possuíam suspeita de infecção e estavam internados na UTI-Neonatal do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Foram avaliados 50 recém-nascidos, de ambos os sexos, sendo que 48% (n=24) do sexo feminino e 52% (n=26) masculinos, com média de idade gestacional de 31 semanas, média de peso de nascimento 1745,54 gramas e Índice de Apgar médio de 6 no primeiro minuto e 8 no quinto minuto.

Quanto ao tipo de parto, 32% (n=16) foram partos normais, enquanto que 68% (n=34) foram operatórios. E, a taxa de prematuridade foi de 46% (n=23).

Quanto aos procedimentos assistenciais aos recém-nascidos avaliados, (n=29) ou 58% usaram algum tipo de cateter vascular (entre os quais, cateter umbilical venoso e/ou arterial, e outros cateteres vasculares), (n=34) ou 68% usaram caixa de hood, e 80% ou (n=40) foram submetidos à ventilação mecânica.

Dos 50 recém-nascidos, 62% (n=31) receberam nutrição parenteral total, 52% (n=26) usaram fototerapia e 80% (n=40) usaram algum tipo de antibacteriano.

Dentre os pacientes nos quais foram detectados a presença de DNA de alguma das bactérias estudadas, 45,84% (n=11) eram do sexo feminino e 54,17% (n=13) do sexo masculino e a média de peso de nascimento foi de 1.591 gramas e a idade gestacional de 30, 5 semanas.

Dos RNs nos quais foi detectada a presença de material genômico de enterococos e, 62,5% (n=15) apresentaram Índice de Apgar < 6 no primeiro minuto e 25% (n=6) RNs apresentaram índice < 6 no quinto minuto. Assim como, 29,17% (n=7) foram obtidos de parto normal e 70,84% (n=17) de partos operatórios. E a taxa de prematuridade foi de 50%. Estes resultados podem ser observados através da Tabela 1.

Os resultados referentes ao uso de procedimentos invasivos e assistenciais pelos RNs do estudo nos quais foi detectada a presença de pelo menos uma das bactérias do estudo estão colocados na Tabela 2.

n=24	Total	
	n	%
Parto Normal	7	29,17
Parto Operatório	17	70,84
Prematuridade	12	50

Tabela 1 – Tipo de parto e índice de prematuridade entre os recém-nascidos com a presença de pelo menos uma das bactérias pesquisadas através de PCR e PCRrt

n=24	Total	
	n	%
Cateteres Vasculares	24	100
Transfusão Sanguínea	4	8
Caixa de Hood	14	28
Ventilação Mecânica	16	32
Nutrição Parenteral	16	32
Fototerapia	12	18

Tabela 2 – Procedimentos invasivos e assistenciais na UTI Neonatal aos recém-nascidos com a presença de pelo menos uma das bactérias pesquisadas através de PCR e PCRrt

Dos 50 pacientes estudados, 40 fizeram hemocultura, e destes apenas 2 tiveram resultado positivo, sendo 1 para *Staphylococcus epidermides* e 1 para *Staphylococcus haemolyticus*. Não foi observado crescimento compatível com enterococos em nenhuma das hemoculturas.

Em relação aos resultados de PCRrt do sangue dos recém-nascidos avaliados, 16% (n=8/50) foi detectado o DNA de *E. faecium*, conforme pode ser observado na Figura 3. Em 44% dos pacientes (n=22/50) foi detectado *E. faecalis*, por meio de PCR convencional. A Figura 4 e 5 mostram a eletroforese em gel típico de agarose dos produtos da PCR convencional com os primers para *Enterococcus faecalis* de amostras de sangue de seis pacientes do estudo. Dos 50 pacientes avaliados, 12% (n=6/50) apresentaram os dois tipos de bactérias. Teste Qui-

quadrado, $p=0,004$ considerada diferença significativa. Os resultados estão ilustrados na Figura 6.

Setup Instrument Results								
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot	Standard Curve	Dissociation	Report		
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty		
A11	11	Sybr Green	Unknown	17.81		Undet.		
C1	25	Sybr Green	Unknown	38.34		Undet.		
C4	28	Sybr Green	Unknown	16.96		Undet.		
C5	29	Sybr Green	Unknown	17.24		Undet.		
C6	30	Sybr Green	Unknown	36.46		Undet.		
C7	31	Sybr Green	Unknown	36.64		Undet.		
D2	38	Sybr Green	Unknown	Undet.		Undet.		
D6	42	Sybr Green	Unknown	Undet.		Undet.		
D10	46	Sybr Green	Unknown	37.15		Undet.		
E2	50	Sybr Green	Unknown	39.26		Undet.		
F3	e. faecium padrao	Sybr Green	Standard	20.95		Undet.		
	1	2	3	4	5	6	7	8

Figura 3 – Amostras positivas para *Enterococcus faecium* através de PCR em Tempo Real

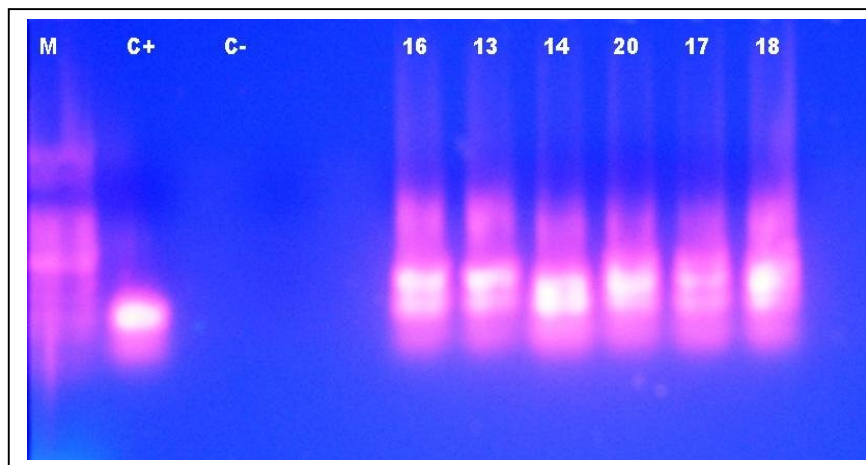


Figura 4. Resultado da PCR convencional com os primers para *Enterococcus faecalis* em amostras de DNA de sangue dos RNs avaliados. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 10 µl da PCR para eletroforese em gel de agarose a 80 volts/ 1 hora, corado com syber red. Os produtos de PCR de 87 pb são mostrados para cada amostra. Coluna 1, marcador 50 pb DNA ladder; (2-3) controles positivo (ATCC 19433) e negativo para *E. faecalis* ; (4-10) amostras de sangue

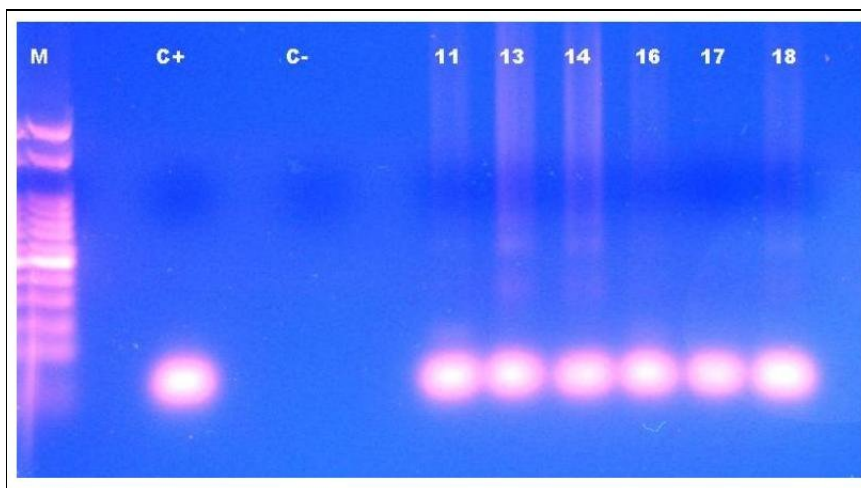
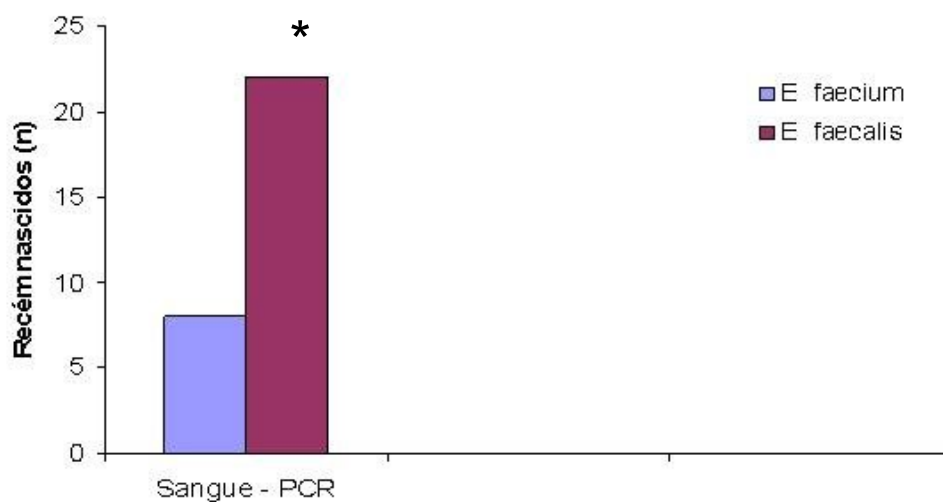


Figura 5. Resultado da PCR convencional com os primers para *Enterococcus faecalis* em amostras de DNA de sangue dos RNs avaliados. A verificação dos amplicons foi feita utilizando-se alíquotas de 10 µl da PCR para eletroforese em gel de agarose a 80 volts/ 1 hora, corado com syber red. Os produtos de PCR de 87 pb são mostrados para cada amostra. Coluna 1, marcador 50 pb DNA ladder; (2-3) controles positivo (ATCC 19433) e negativo para *E. faecalis* ; (4-10) amostras de sangue



*Diferença significativa, teste Qui-quadrado $p=0,004$.

Figura 6 – Resultados das técnicas de PCRrt e PCR convencional para as bactérias *E. faecium* e *E. faecalis* no sangue dos recém-nascidos internados na UTI Neonatal HU-UFMS, Campo Grande – MS

A Figura 7 mostra o resultado da amplificação do agente alvo *Enterococcus faecium* através de PCRrt. A curva de dissociação substitui o gel de agarose. A banda no gel equivale ao pico na curva.

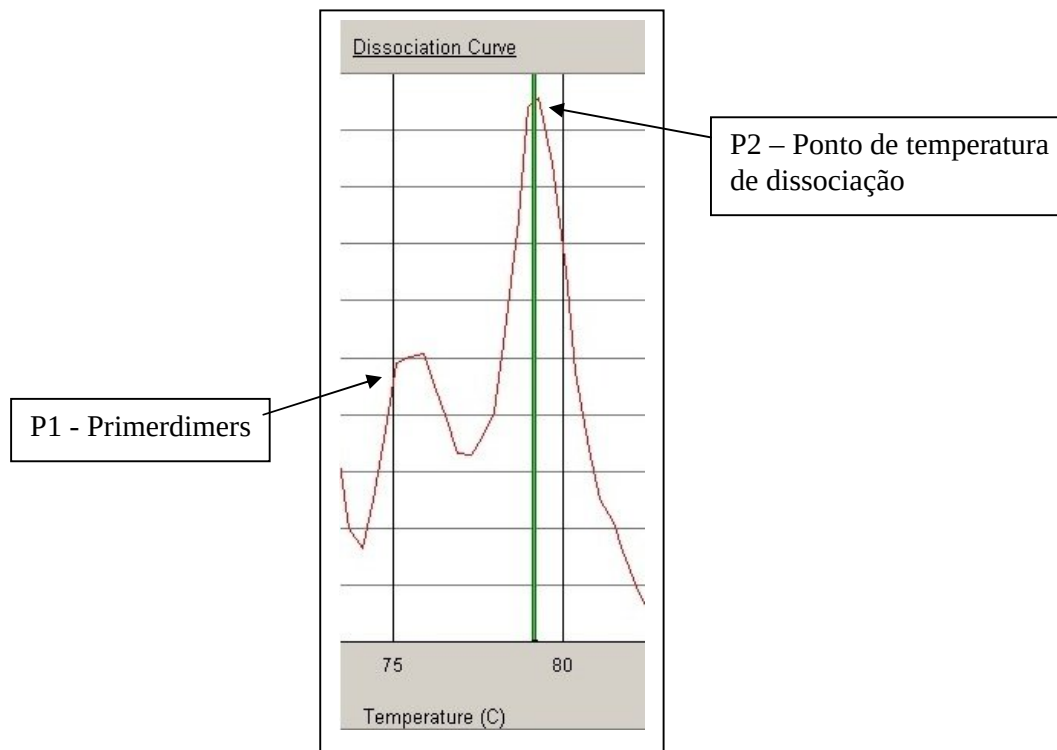


Figura 7 – Curva padrão para *Enterococcus faecium* evidenciando 2 picos de temperatura de dissociação

A importância clínica de infecções enterocócicas tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas, no sentido de identificar e controlar a sua ocorrência. As principais espécies causadoras de infecção no homem são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, representando cerca de 85% a 90% e 5% a 10%, respectivamente, dos enterococos isolados na clínica¹⁹.

A literatura tem documentado que estas bactérias estão entre as principais causas de várias infecções humanas, incluindo bacteremia, sepse, endocardites, sepse neonatal e meningite, além de infecções do sítio cirúrgico.

Para a detecção genômica das bactérias *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, em sangue de recém-nascidos com fatores de risco para infecção, utilizamos a PCRt e convencional, respectivamente, por ser tratar de métodos rápidos e específicos.

Também comparamos estes resultados com os resultados obtidos pelas hemoculturas realizadas, com o intuito de mostrar a sensibilidade da PCR e, de acordo com os resultados, estimular o desenvolvimento desta técnica nos hospitais.

Não foi observado nenhum resultado positivo para as bactérias estudadas através das hemoculturas. Outros estudos já relataram a menor sensibilidade de hemoculturas^{66,67,68}, apesar de se tratar do padrão ouro para diagnóstico de sepse, é uma técnica demorada, cujos resultados não ficam prontos em tempo menor do que 48 a 72 horas e vários autores questionam a sua credibilidade⁶⁶.

Por não termos nenhum resultado positivo destas hemoculturas para *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, estes resultados não necessariamente estão relacionados à sepse neonatal, mas podem estar relacionados à colonização bacteriana pelas bactérias estudadas, mas não exclui a possibilidade de problemas técnicos na realização das hemoculturas, principalmente no que se refere à quantidade de sangue coletado para análise quando menor do que 2 ml, pois em algumas situações não é possível a coleta deste volume, principalmente devido o peso da criança e dificuldades técnicas de coleta.

Os resultados da PCR podem sugerir colonização bacteriana, mas não é possível excluir a possibilidade de infecção por estes patógenos, ou mesmo por outros, considerando o estado imunológico do paciente, além dos fatores de risco associados.

Vários métodos moleculares para a específica detecção de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* têm sido reportados como uma poderosa ferramenta na investigação de surtos de infecções hospitalares³⁷.

Tais técnicas se destacam pela rapidez e especificidade de seus resultados, os quais são essenciais para a prevenção e controle da transmissão de infecções.

Jordan e Durso, em 2005, sugeriram que incorporar a PCR para detecção bacteriana diretamente do sangue facilitaria o diagnóstico e o tratamento apropriado na sepse neonatal.

Eles utilizaram a PCRrt para detectar material genético bacteriano diretamente de material extraído de sangue de recém-nascidos com suspeita de sepse, obtendo boa correlação. Esta técnica requer menos de quatro horas para a sua execução, enquanto o sistema de hemocultura leva dias.

Um diagnóstico precoce e específico pode significar o início de um tratamento imediato e melhores resultados, assim como, menor tempo de hospitalização e melhor prognóstico neurológico.

Devido à alta morbimortalidade do paciente com sepse, o tratamento habitualmente implica o uso de amplo-espectro de antimicrobianos associados antes de receberem os resultados de hemocultura, além do mais, observamos que os resultados de hemoculturas nem sempre detectam os patógenos apresentados pelo paciente, o que também já foi observado por outros autores³².

As técnicas moleculares, de PCR convencional e em tempo real, consistem em bons exames para avaliações de grandes populações, pois confirmam especificamente o agente para os quais foram desenhados.

Os hospitais deveriam dispor de Laboratório de Biologia Molecular para o desenvolvimento de técnicas que propiciem o diagnóstico precoce e preciso de agentes infecciosos³⁴.

A mais importante razão pelo qual organismos Gram-positivos resistentes à antimicrobianos têm crescido em ambientes hospitalares é o fato de que estes microrganismos podem passar de paciente para paciente através de mãos contaminadas de profissionais da saúde, aparelhos, equipamentos pessoais ou médicos.

O índice de Apgar no primeiro e no quinto minuto está associado à sepse de início precoce, porém esta sepse não foi o alvo do nosso estudo, mas sim, a sepse tardia. Obviamente um prematuro que apresentou um índice de Apgar baixo, tem

maior probabilidade de desenvolver sepse tardia devido ao grau de imunodepressão, bem como, aos adventos que são submetidos. Neste estudo, dos neonatos que apresentaram presença de DNA enterocócico, 15 (30%) tiveram Índice Apgar menor do que seis no primeiro minuto e, seis (12%) no quinto minuto.

Pacientes gravemente doentes, os quais necessitam de antibióticos de maior espectro e maiores cuidados médicos e de enfermagem, fazem parte do grupo de risco na aquisição destes patógenos.

Neste estudo, entre as amostras de sangue nas quais foram detectadas pelo menos um dos agentes bacterianos aqui estudados, o uso de cateteres vasculares central foi o procedimento com maior correlação com a presença de material genômico das bactérias (54%), seguido do uso de ventilação mecânica (32%) e nutrição parenteral (32%).

Estes dados são concordantes com outros estudos. Herrmann e colaboradores, em 2008, também encontraram que o uso de procedimentos invasivos como o cateterismo venoso, o uso de alimentação por via parenteral e a ventilação mecânica tiveram relação importante com o desenvolvimento da sepse neonatal tardia ¹¹.

O uso de nutrição parenteral tem sido relacionado à infecção tardia e ao atraso do início da dieta enteral. Outros autores sugerem que a via enteral deve ser iniciada o mais precocemente possível para reduzir o tempo de nutrição parenteral, que está associado a um grande risco de infecção ¹¹.

Os resultados do presente estudo concordam com estes autores mostrando ser a nutrição parenteral um fator de risco para infecção, não só pela manipulação, como também pelos próprios nutrientes e também devido ao acesso vascular central necessário neste procedimento.

Muitos fatores de risco contribuem para o aumento da sepse, como a antibioticoterapia de amplo espectro, nutrição parenteral e a perda da flora comensal por bifidobactérias e lactobacilos devido ao jejum prolongado. O diagnóstico precoce deste problema com efetivo tratamento e conduta, seria uma medida útil para diminuir a morbimortalidade ⁷¹.

A prematuridade e o baixo peso são descritos como fatores neonatais relevantes para o surgimento da sepse tardia, uma vez que é a principal causa de ingresso dos neonatos em Unidades de Terapia Intensiva ¹¹.

Este estudo confirma estes dados, no qual dentre os pacientes que apresentaram pelo menos uma das bactérias aqui estudadas, a média de peso foi de 1,591 Kg e idade gestacional de 30,5 semanas, mostrando a prematuridade como importante característica da população estudada, o pré-termo é mais vulnerável à infecção devido à sua imunodeficiência.

Em um estudo, em 2005, por Bizarro et al., foi observado que a infecção congênita de início precoce diminuiu e ao contrário o índice de infecção tardia aumentou, sendo este aumento relacionado à bactérias comensais, particularmente em RNs prematuros, com o uso de cateteres vasculares, nutrição parenteral e ventilação mecânica prolongada ⁷². Tais dados são concordantes com os encontrados em nosso estudo, os quais foram específicos para as bactérias *E. faecium* e *E. faecalis*.

Schlapbach et al. (2011), observaram num estudo de 541 RNs prematuros, sendo 25% com sepse comprovada, 31% com suspeita de sepse e 44% sem sinais de infecção, a Sepse contribui para o atraso do desenvolvimento neurológico independentemente dos fatores de risco em RNs prematuros ⁷³.

Melhores estratégias no controle de infecções são importantes para o melhor prognóstico destes prematuros, por isto, a implantação do diagnóstico precoce de sepse neonatal, através de métodos moleculares, é de suma importância no que tange o prognóstico destas crianças ⁷³. Nós observamos que dentre os 50 pacientes estudados, 46% (n=23) eram prematuros e, entre estes, 24% (n=12) apresentavam o DNA de pelo menos uma das bactérias aqui estudadas.

Hufnagel et al. (2007), em um estudo de 274 recém-nascidos prematuros internados em uma UTI, foi observado que 23% estavam colonizados, sendo 48% com *E. faecium* e 13% *E. faecalis*. Destes, 57% eram resistentes à terapia antimicrobiana, mas nenhum resistente à vancomicina. Também referiram que durante o inverno e primavera o número de infecções enterocócicas resistentes foi maior. No atual trabalho não valorizamos o período sazonal, mas a prematuridade também, como já referida, foi um fator importante ⁷⁴.

Algumas práticas podem ser adotadas como medidas de redução de sepse tardia. Sabendo-se que o uso de cateteres vasculares e a ventilação mecânica estão relacionados à presença de infecção, o seu tempo de uso deve ser reduzido para diminuir o risco de infecção e de forma segura. Medidas de desinfecção no

manuseio de equipamentos, anti-sepsias e lavagem correta das mãos são medidas importantes na prevenção de infecções nosocomiais ¹¹.

Além disso, outros fatores como longos períodos de internação hospitalar, uso de antimicrobianos, são fatores de risco adicionais para colonização e infecção em unidade de tratamento intensivo neonatal ^{17,38,39}, resultando em altas taxas de morbimortalidade ^{43, 45}.

No entanto, novos estudos são necessários para melhor conhecimento da sepse tardia e seus fatores de risco entre neonatos.

As técnicas de PCRrt e convencional consistem em métodos rápidos e de alta especificidade para o diagnóstico de infecções. Sugere-se que a eficácia, segurança e rapidez das técnicas aplicadas poderão se tornar uma ferramenta de auxílio imprescindível no que tange o tratamento específico e em tempo hábil.

Espera-se que a implantação destas técnicas no hospital favoreça um diagnóstico precoce, diminuindo o tempo de tratamento, os custos hospitalares e as taxas de seqüelas e de mortalidade.

7 CONCLUSÕES

Os métodos moleculares de PCR convencional e PCRRt realizaram a detecção de material genômico das bactérias *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, respectivamente, em sangue de recém-nascidos.

Estes métodos mostraram boa sensibilidade e especificidade na detecção das bactérias *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, enquanto os métodos de hemocultura não apresentaram nenhum caso positivo para enterococos.

Quanto à caracterização da população estudada, entre os RNs avaliados não houve diferença significativa entre os sexos.

Na população estudada, a média de idade gestacional foi menor do que 36 semanas.

A média de peso da população foi de 1745,54 gramas, enquanto que dentre aqueles com o DNA bacteriano enterocócico foi de 1591 gramas.

Dos RNs nos quais foi detectada a presença de material genômico de enterococos, 15/50 apresentaram Índice de Apgar < 6 no primeiro minuto e 6/50 dos RNs apresentaram índice < 6 no quinto minuto.

Na população total estudada, quanto ao tipo de parto, o número de partos operatórios foi maior em relação ao número de partos normais, assim como entre aqueles com a presença de material genômico enterocócico. A prematuridade foi uma característica importante na população estudada.

Com relação aos procedimentos invasivos, todos os recém-nascidos nos quais foi detectada a presença de material genético das bactérias estudadas estavam submetidos a algum tipo de cateter vascular.

O uso de ventilação mecânica e nutrição parenteral representaram características importantes entre estes pacientes.

O suporte financeiro do projeto foi realizado através da Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDECT) (Edital Fundect/MS/CNPq/SES N º 07/2009 Saúde) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Edital MCT/CNPq nº 70/2008 - Mestrado).

Adicionalmente, foi feita parceria com a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) no período de janeiro a julho de 2011 e com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em fevereiro de 2011, que disponibilizaram seus respectivos laboratórios de Biologia Molecular para a realização do projeto.

1. Ozbek SM, Ozbek A, Erdogan AS. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR syber green method. J Appl Oral Sci. 2009; 17(5): 370-4.
2. Strabelli TMV, Cais DP, Zeigler R, Siciliano R, Rodrigues C, Carrara D, Neres S, Lessa S, Uip DE. Clustering of *Enterococcus faecalis* infections in a Cardiology Hospital Neonatal Intensive Care Unit. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2006; 10(2): 113-116.
3. D'Azevedo PA, et al. Resistência aos níveis elevados de aminoglicosídeos entre amostras de *Enterococcus* isoladas na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA). J Bras Patol. 1998; 34(3): 148-53.
4. Sader HS, Sampaio JLM, Zocolli C, Jones RN. Results of 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three Brazilian medical centers. BJID 1999; 3(2): 63-79.
5. Salgado CD, Ison MG. Should Clinicians worry about vancomycin-resistant *Enterococcus* bloodstream infections? Bone Marrow Transplantation. 2006; 38: 771-774.
6. Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Health PT. Neonatal sepsis: an international perspective. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2005; 90: 220-4.
7. Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, et al. Early onset Neonatal Sepsis: The Burden of Group b Streptococcal and *E. coli* Disease continues. Pediatrics, 2011; 128: 390.
8. Haque NK. Neonatal Sepsis in the Very Low Birth Weight Preterm Infants: Part 1: Review of Patho-physiology. Journal of Medical Sciences. 2010; 3(1): 1-10.
9. Opilla M. Epidemiology of bloodstream infection associated with parenteral nutrition. American Journal of Infection Control. 2008; 36 (10): 173-8.
10. Herrmann DMML, Amaral LMB, Almeida SC. Fatores de risco para o desenvolvimento de sepse neonatal tardia em uma Unidade de Terapia Intensiva. Pediatria. 2008; 30 (4): 228-236.
11. Benjamin Júnior DK, Miller W, Garges H, Benjamin DK, McKinney Jr RE, Cotton M, Fisher RG, Alexander KA. Bacteremia, Central Catheters, and Neonates: When to Pull the Line. Pediatrics. 2001; 107: 1272-76.
12. Van Der Brock PJ, Verbakel-Salomons EMA, Bernards AT. Quantity versus quality of hand hygiene. J Hosp Infect. 2001; 49: 297-298.
13. Brown DFJ, Brown NM, Cookson BD, Duckworth G, Farrington M, French GL, King L, Lewis D, Livermore DM e outros autores. National glycopeptide-resistant

enterococcal bacteraemia surveillance Working Group report to the Department of Health – August 2004. J Hosp Infect. 62 (1): 1-27.

14. Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerg Infect Dis. 1998; 4:37-47.

15. Mahieu LM, De Muynck AO, Leven MM, De Dooy JJ, Goossens HJ, Van Reempts PJ. Risk factors for central vascular catheter-associated bloodstream infections among patients in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect 2001; 48: 108-116.

16. Murray P. et al. Microbiologia médica. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 220-3.

17. De Fátima Silva Lopes M, Ribeiro T, Abrantes M, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, Crespo MTB. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. Int J Food Microbiol. 2005; 103: 191-198.

18. Giacometti A, Cirione O, Schimizzi AM, Del Prete MS, Barchiesi F, D'Errico MM, Petrelli E, Scalise G. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. J Clin Microbiol. 2000; 38: 918-22.

19. Higaki S, Moronashi M, Yamagishi T. Isolation of *Enterococcus* species from infectious skin lesions. Drugs Exp Clin Res. 2002; 28:91-93.

20. Bontem MJM, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? Lancet Infect Dis. 2001; 1:314-25.

21. Centers for Disease Control and Prevention: Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendations of the Hospitals Infection Control Practices Advisory Committee (HIPAC). MMWR 44 (RR-12): 1-13, 1995.

22. Titze-de-Almeida R, Rollo FM, Nogueira CA, Rodrigues IP, Eudes FJ, Nascimento RS, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. Braz J Infect Dis. 2004; 8:197-205.

23. Bearman GML, Wenzel RP. Bacteraemias: a leading cause of death. Arch Med Res. 2005; 36: 646-659.

24. Poh CH, Oh HML, Tan AL. Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteremia in an acute care hospital. Journal of Infection. 2006; 52 (5): 383-6.

25. Mutnick AH, Biedebach DJ, Jones RN. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in

the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect.* 2003; 46: 63-8.

26. Health Protection Agency. Bacteraemia. Disponível em www.hpa.org.uk

27. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 2009; 1749-1757.

28. Fernández Fernández FJ, de la Fuente Aguado J, Rubianes González M, Pérez Fernández S, Alvarez Fernández M, Nodar Germiñas A, Sopeña Pérez-Arquelles B, Martínez Vazquez C. *Enterococcus faecalis* bacteremia. *Rev Clin Esp.* 2004; 204 (5): 244-50.

29. Nourse C, Byrne C, Murphy H, et al. Eradication of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from a paediatric oncology unit and prevalence of colonization in hospitalized and communit-based children. *Epidemiol Infect.* 2000; 124: 53-59.

30. Remco PHP, Agtmael MAVA, Sven AD, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4:751-60.

31. Jordan JA, Durso MB. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detecting Bacterial DNA Directly from Blood of Neonates Being Evaluated for Sepsis. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2005; 7 (5): 575-581.

32. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative Microbiological Study of Human Carious Dentine by Culture and Real-Time PCR: Association of Anaerobes with Histopathological Changes in Chronic Pulpitis. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002; 40 (5): 1698-1704.

33. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Endod.* 2006; 102: 247-53.

34. Miglioli AMD. DNA genômico de *Streptococos* e *Escherichia coli* em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento [Tese]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2009.

35. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod.* 2006; 32 (3): 173-177.

36. Mirhend H, Makimura K, Khoramizadrez M, Yamaguichi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Journal Medicine Mycology*. 2006; 47: 225-229.
37. Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Jones RN. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil, using pulsed field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994; 15(5):320-3.
38. Weller TMA, Mackenzie FM, Forbes KJ. Molecular epidemiology of a large outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol* 1997; 46:921-6.
39. Thiercelin ME. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *C. R. Soc. Biol.* 1899; 5:269-271.
40. Andrews FW; Horder TJ. A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet*. 1906; 2: 708-713.
41. Kalina AP. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1970; 20(2): 185-9.
42. Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. Nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1984; 34: 31-34.
43. Koneman EW, et al. Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001:589-659.
44. Murray P. et al. Microbiologia médica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 220-3.
45. Teixeira LM; Facklam RR. Enterococcus. In: MURRAY, P.R. et al (eds). *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2003.p.422-33.
46. Doming KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol*. 2003; 88:165-188.
47. Van den Bergue E, De Winter T, de Vuyst L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterized by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int J Food Microbiol*. 2006. 107:159-170.

48. Facklam RR, Carvalho MGS, Teixeira LM. 2002. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic; p.1-54. In MS Gilmore (ed.), *The Enterococci- Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. ASM Press, Washhington.
49. Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu;1999. p. 675, 758.
50. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* the root canal survivor and 'star' in post treatment disease. *Endod Topics*. 2003; 6:135-59.
51. Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*. 2008; 106: 1-24.
52. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology. *Microbiology*. 2004; 2: 151-9.
53. Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistances of enterococci from food and gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol*. 2003; 88:269-90.
54. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin. United States, 1989-1993. *MMWR* 42:597-9.
55. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*. 1990; 3:46-65.
56. Teixeira LM, Facklam RR. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance, In: Murray PR. et al. (eds) *Manual of clinical Microbiology*. 8.ed. Washington, D.C.; American Society for Microbiology, 2003. p. 1178-81.
57. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*. 4: 239-49.
58. Zervos MJ, Kauffman CA, Therasse PM, Bergman AGT, Mikessell T, Scharberg DR. Nosocomial infection by gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*: an epidemiologic study. *Ann Intern Med*. 1986; 106: 687-689.
59. Cereda RF, Pignatari AC, Hashimoto A. In vitro antimicrobial activity against enterococci isolated in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 1997; 1: 83-90.
60. Cereda RF, Jones RN, Sejas L, Machado AM, Zanatta YP, Rego STMS, Medeiros EAS. *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin and teicoplanin (VanA Phenotype) isolated from a bone marrow transplanted patient in Brazil. 2001; 5(1): 40-6.

61. Jawetz, Melnick, Adelberg, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Microbiologia Médica. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.159, Capítulo 15.
62. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control. 2004; 32: 470-85.
63. Moellering Jr RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis.1992; 14: 1173-1178.
64. Dobson SRM, Baker CJ. Enterococcal sepsis in neonates: features by age at onset and occurrence of focal infection. Pediatrics. 1990; 85: 165-71.
65. Vigani AG, Macedo de Oliveira A, Bratfich OJ, Stucchi RSB, Moretti ML. Clinical, epidemiological, and microbiological characteristics of bacteremia caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2008; 41: 890-5.
66. Honest H, Sharma S, Khan KS. Rapid tests for Group B. *Streptococcus* colonization in laboring women: a systematic review. Pediatrics. 2006; 117 (4): 1055-1066.
67. Yadav AK, Wilson CG, Prasad PL, Menon PK. Polymerase chain reaction in rapid diagnosis of neonatal sepsis. Indian Pediatrics. 2005; 42 (7): 681-685.
68. Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. J Pediatr. 1996; 129: 275-278.
69. Squire E, Favara B, Todd J. Diagnosis of neonatal bacterial infection: hematologic and pathologic findings in fatal and nonfatal cases. Pediatrics. 1979; 64: 60-64.
70. Brozanski BS, Jones JG, Krohn MJ, Jordan JA. Use of polymerase chain reaction as a diagnostic tool for neonatal sepsis can result in a decrease in use of antibiotics and total neonatal intensive care unit length of stay. Journal of Perinatology. 2006; 26: 688-692.
71. Grimberg J.et al.A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids Research. 1989; 17 (20): 83-90.
72. Saiki RK, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 239 (4839): 487-91.
73. Shott S. Statistics for health professionals. London: W.B. Saunders Company, 1990.

74. Manzoni P, Decembrino L, Gallo E, Rizzollo S, Franco C, Mostert M, Stronati M, Farina D. Recent advances in prevention of sepsis in the preterm neonate. *Recent Prog Med.* 2010 Dec; 101(12):483-9.
75. Bizarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, Gallagher PG. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. *Pediatrics.* 2005; 116(3): 595-602.
76. Schlapbach LJ, Aebischer M, Adams M, Natalucci G, Bonhoeffer J, Latzin P, Nelle M, Bucher HU, Latal B; Impact of Sepsis on Neurodevelopmental Outcome in a Swiss National Cohort of Extremely Premature Infants. *Pediatrics.* 2011; 128(2): 348-357.
77. Hufnagel M, Liese C, Loescher C, Kunze M, Proempeler H, Berner R, Krueger M. Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *Infect Dis.* 2007; 16 (7): 107.

Apêndice 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento registra o consentimento dos pais e/ou responsáveis legais dos recém-nascidos que serão estudados durante a realização da pesquisa para a dissertação de mestrado da bióloga Isabela Furtado.

Mãe, você está sendo convidada a participar dessa pesquisa e eu gostaria muito que, antes de tomar a sua decisão, você lesse muito bem o que está escrito abaixo. Caso você tenha alguma dúvida do que você leu, estou à sua disposição.

Esse estudo está sendo realizado sob a orientação do Dr. Durval Batista Palhares.

Alguns bebês podem adquirir infecção dentro da Unidade Neonatal por uma bactéria chamada Enterococos. Esta infecção pode ser adquirida pelo recém-nascido através de sua própria condição de baixa imunidade e pelo uso de procedimentos invasivos.

Para tanto o propósito deste trabalho é fazer o exame para detectar se os bebês que estão internados na UTI neonatal estão infectados por estas bactérias.

Não haverá ônus algum para o paciente e sua família. Os resultados serão repassados aos responsáveis e os bebês que tiverem resultados positivos serão devidamente tratados.

Sua participação é voluntária e não tem fins lucrativos. O seu recém-nascido pode sair do estudo quando os pais ou responsáveis desejarem e os pais ou responsáveis têm o direito de não autorizar a participação do seu filho (a) na pesquisa.

Se você concorda com a participação do seu recém-nascido no estudo, e não tem nenhuma dúvida sobre a sua realização, peço que assine o termo de consentimento, em duas vias. Uma via é sua, e fica com você.

Eu _____ declaro que estou ciente dos termos aqui apresentados e autorizo a inclusão do meu filho (a) na pesquisa.

Campo Grande (MS), ____ de _____ de 2010.

Obs. Este documento foi feito em duas vias de igual teor sendo uma via do sujeito da pesquisa e outro para o pesquisador. O sujeito da pesquisa poderá ter acesso ao Comitê

de Ética em Pesquisa (Fone: (67) 3345-7187), no momento em que desejar.

Pesquisadora: Isabela Furtado- Telefone para contato: (67) 8118-4970.

Apêndice 2 - PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE PONTUÁRIOS – UFMS

Setor: UTI – NEONATAL Data da coleta: ____ / ____ / ____

[illegible]

Nome do bebe: _____ Sexo: ()

Peso ao nascer:_____ Idade Gestacional:_____

Data de Nascimento: / / APGAR: PC:

Data de Internação: ____/____/____

Procedência	Paciente	Naturalidade
1	2	3
4	5	6
7	8	9
10	11	12
13	14	15
16	17	18
19	20	21
22	23	24
25	26	27
28	29	30
31	32	33
34	35	36
37	38	39
40	41	42
43	44	45
46	47	48
49	50	51
52	53	54
55	56	57
58	59	60
61	62	63
64	65	66
67	68	69
70	71	72
73	74	75
76	77	78
79	80	81
82	83	84
85	86	87
88	89	90
91	92	93
94	95	96
97	98	99
100	101	102
103	104	105
106	107	108
109	110	111
112	113	114
115	116	117
118	119	120
121	122	123
124	125	126
127	128	129
130	131	132
133	134	135
136	137	138
139	140	141
142	143	144
145	146	147
148	149	150
151	152	153
154	155	156
157	158	159
160	161	162
163	164	165
166	167	168
169	170	171
172	173	174
175	176	177
178	179	180
181	182	183
184	185	186
187	188	189
190	191	192
193	194	195
196	197	198
199	200	201
202	203	204
205	206	207
208	209	210
211	212	213
214	215	216
217	218	219
220	221	222
223	224	225
226	227	228
229	230	231
232	233	234
235	236	237
238	239	240
241	242	243
244	245	246
247	248	249
250	251	252
253	254	255
256	257	258
259	260	261
262	263	264
265	266	267
268	269	270
271	272	273
274	275	276
277	278	279
280	281	282
283	284	285
286	287	288
289	290	291
292	293	294
295	296	297
298	299	300
301	302	303
304	305	306
307	308	309
310	311	312
313	314	315
316	317	318
319	320	321
322	323	324
325	326	327
328	329	330
331	332	333
334	335	336
337	338	339
340	341	342
343	344	345
346	347	348
349	350	351
352	353	354
355	356	357
358	359	360
361	362	363
364	365	366
367</		

Telefone: CEP:

Endereço: _____ Bairro: _____

Registro NO HOSPITAL

--	--	--	--	--	--

Diagnóstico

Interação: _____

Uso de antifúngico? Sim () Não ()

Quais:

Uso de antibióticos? Sim () Não ()

Quais:

Uso de CPAP NASAL () CPAP ENDOTRAQUEAL () NÃO ()

Foi feito sorologia? SIM () Resultado: NÃO ()

HEMOGRAMA

Data: ____/____/____

ERIT:

HB:

Metamielócitos:

HT:

Promielócitos:

Leucócito:

Blastos:

Eosinófilos: %

Reticulócitos:

Segmentados: %

Na: Creatinina:

Basófilos: %

K: Uréia:

Linfócitos: %

Mg: Bilirrubina total:

Monócitos: %

P: Bilirrubina direta:

Bastão: %

Ca: Bilirrubina indireta:

Plaquetas:

Glicemia:

Eritroblastos:

Outros:

TIPO DE SANGUE DO BEBE:

PCR:

EVOLUÇÃO:

Procedimentos:

- () Cateter subnasal de O₂
- () Cateter umbilical venoso
- () Cateter de acesso venoso central
- () Nutrição parenteral (NP)
- () Sonda enteral
- () Sonda Nasogástrica
- () Fototerapia
- () Dissecção de veia
- () AVP – Acesso venoso periférico
- () Sonda vesical

- () Vent. Mecânica (VM)
- () Cateter umbilical arterial
- () Transfusão sanguínea
- () Traqueostomia
- () Sonda orogástrica
- () PICC
- () Gastrostomia
- () Caixa de Hood

Fez hemocultura? Sim () Resultado: _____
Não: ()

Fez cultura de sangue para fungos? Sim () Resultado: _____
Não: ()

Fez swab retal/anal? Sim () Resultado: _____
Não: ()

Fez cultura de liquor:

a) Para fungos? Sim () Resultado: _____
Não: ()

a) Para bactérias? Sim () Resultado: _____
Não: ()

Dados da Mãe

Idade: _____ Tipo de Sangue: _____

Tipo de Parto: _____ Apresentação: _____ Com Fórceps: Sim () Não ()

Gesta: _____ P: _____ A: _____ Rotura de bolsa: _____

Patologia na gestação: _____ Drogas usadas na gestação: _____

Sorologia para CMV ----- Positivo () Negativo () Não consta ()

Anexo 1 - EXTRAÇÃO DE DNA PARA TESTE DE PATERNIDADE

A – EXTRAÇÃO DE DNA NO SANGUE:

A - 1 DESCRIÇÃO:

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

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

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

Tempo requerido: Cerca de 4 horas

A – 2 REAGENTES, EQUIPAMENTOS E ESTOQUE:

REAGENTES

⇒ **Tampão de lise celular**

320 mM de sacarose

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

5 mM deMgCl₂

1% (v/v) TritonX-100

Instrução: Estocar e usar a 4°C

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

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

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

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

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

Instrução: Estocar a temperatura ambiente.

⇒ **Proteinase K (20 mg/ml)**

Cat. No. 25530-49 (5ml)

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

⇒ **Tampão TE-4**

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

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

Instrução: Estocar a temperatura ambiente.

⇒ **Etanol 100%**

Instrução: Estocar a temperatura ambiente.

⇒ **Etanol 70%**

Instrução: Estocar a temperatura ambiente.

EQUIPAMENTOS

⇒ **Microcentrífuga:**

Rotador designado para tubos de 1,5 a 2,0 ml. Capaz de obter velocidade de no mínimo 13.000 rpm.

⇒ **Banho Maria de 55°C.**

⇒ **Pipetas.**

De 3 volumes diferentes: 1-20ul, 20-200ul e 200-1000ul.

⇒ **Sistema de concentração de DNA.**

⇒ **Agitador.**

⇒ **Caixa de isopor.**

ESTOQUE DISPONÍVEL

⇒ **Tubos para microcentrífuga** (1,7-2,0 ml de capacidade, em 4 cores):
(vermelho, amarelo, azul e verde).

⇒ **Ponteiras para pipetas esterilizadas** (3 tamanhos: 1-20ul, 20-200ul e 200-1000ul).

⇒ **Etiquetas ou caneta para retroprojektor:** (tamanho apropriado para tubos de microcentrífuga).

A-3 PROCEDIMENTO

ADIANTANDO

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

Mãe -----Tubos vermelhos

Filho(s)-----Tubos amarelos

Pai alegado-----Tubos azuis

Etiquete todos os tubos cuidadosamente.

PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO DNA:

PRECAUÇÕES

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

PROCEDIMENTOS

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

proteínase K (20ug/ml) requerido é determinado pela multiplicação do número das amostras (N + 2) por 5 (5ug por amostra) Agite o Máster Mix.

MASTER MIX VOLUME

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

9. Acrescente 400ul de Máster Mix em cada amostra. Agite por 15 segundos para dissolver o pellet (precipitado), com a ponteira + 10 segundos no Vortex.
10. Coloque as amostras em Banho Maria a 55°C.
11. Incube as amostras a 55°C por, pelo menos, 2 horas. Agite cada tubo em 30 minutos por 15 segundos para ter certeza que o pellet está ressuspendido.
12. Após as 2 horas de incubação, centrifugue os tubos por 5 minutos a 13.000 rpm (na velocidade máxima), ou por 20 minutos a 10.000 rpm, para precipitar os fragmentos celulares.
13. Separar o sobrenadante com pipeta com barreira (sempre) na ponteira. Se necessário o procedimento pode ser interrompido nesse ponto e as amostras podem ser estocadas à 4°C.
14. Acrescente 200ul de Cloreto de Litium⁷, 5 M em cada amostra (ou 187,5 ul de Cloreto de Litium 8M).
15. Agite as amostras por aproximadamente 5 segundos e coloque as amostras em gelo seco (1 kg) por 10 minutos (ou no freezer – 80°C por uma hora e meia).
16. Centrifugue a 4°C as amostras por 15 minutos a 13.000 rpm (ou 25 minutos à 10.000 rpm) para precipitar proteínas e outras contaminações.
17. Em cada amostra, retire cuidadosamente o sobrenadante e o coloque em um novo tubo com a identificação apropriada. Evite transferir qualquer material que esteja precipitado. Descarte os tubos com o precipitado de proteínas.

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

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

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

Anexo 2 – Carta de autorização pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

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



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1520 da Pesquisadora Isabela Furtado intitulado “Detecção de DNA genômico de Enterococcus faecium e Enterococcus faecalis por reação em cadeia da polimerase em sangue de recém-nascidos no serviço de neonatologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul”, o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados em reunião ordinária no dia 10 de dezembro de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos

Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 15 de dezembro de 2009.

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