



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E DA SAÚDE – FACES**

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**HENRIQUE DE LACERDA PEREIRA
GABRIEL DO AMARAL CAVALCANTE**

**COMPARAÇÃO DA ACURÁCIA ENTRE OS MÉTODOS DE
DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO POR HEMOCULTURA E PCR
(REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE**

**BRASÍLIA
2017**



**HENRIQUE DE LACERDA PEREIRA
GABRIEL DO AMARAL CAVALCANTE**

**COMPARAÇÃO DA ACURÁCIA ENTRE OS MÉTODOS DE
DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO POR HEMOCULTURA E PCR
(REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e
Pesquisa pela Faculdade de Ciências da
Educação e da Saúde – FACES.

Orientação: Prof. Nivaldo Pereira Alves, PhD

**BRASÍLIA
2017**

AGRADECIMENTOS

Deixamos expressos nossos sinceros agradecimentos às seguintes pessoas e instituições, sem as quais o presente trabalho teria sido impossível:

Ao Dr. Nivaldo Pereira Alves, nosso professor orientador, pelo incentivo e pela paciência durante esses meses de desenvolvimento da pesquisa;

Aos estimados colegas de turma Gustavo Albergaria Brízida Bächtold e Matheus Moreno de Oliveira, que colaboram incansavelmente durante todo o processo de elaboração do trabalho;

À Dra. Elisiane Naluce Tavares de Lacerda Pereira, proprietária do Laboratório Tecnogene Diagnósticos Moleculares, pela receptividade, acolhimento e apoio técnico e administrativo;

Ao Dr. Estevão Lima dos Santos Xavier, médico pediatra, pelo acolhimento, estima e ajuda nas dependências do Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB);

Ao corpo de médicos, enfermeiros, biomédicos e técnicos de enfermagem do Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB) pela excepcional ajuda técnica e acolhimento durante ao longo desses meses de trabalho.

Aos colegas Fernando Santos da Costa, Mauricilene Dias da Silva, Evani de Castro Silva e Maria Aparecida Morais da Silva, da empresa Tecnogene Diagnósticos Moleculares, pelo valioso apoio técnico, sugestões e grande auxílio nestes meses de elaboração e confecção do trabalho.

À colega Emilie Karan Maia pelas incontáveis ajudas nestes meses de confecção e elaboração do trabalho.

Às Msc. Olivia Laquis de Moraes, Dra. Fernanda Costa Vinhaes de Lima e Biol. Clara Coleho Paranhos Motta pelo inestimável auxílio para confecção, elaboração e conclusão do trabalho ao longo desses meses.

COMPARAÇÃO DA ACURÁCIA ENTRE OS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO POR HEMOCULTURA E PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE

Gabriel do Amaral Cavalcante – UniCEUB, PIC Institucional, aluno bolsista
cavalcante.g@gmail.com

Henrique de Lacerda Pereira – UniCEUB, PIC institucional, aluno voluntário
hlacerda_13@hotmail.com

Nivaldo Pereira Alves – UniCEUB, professor orientador
nipeal@gmail.com

Matheus Moreno de Oliveira - UniCEUB, colaborador
matheus_moreno_d.o@hotmail.com

Gustavo Albergaria Brízida Bächtold - UniCEUB, colaborador
gus_bach@gmail.com

Resumo:

A pneumonia adquirida na comunidade é uma infecção contraída fora do ambiente hospitalar, a qual acomete, principalmente, as vias aéreas inferiores. Sendo comum durante a infância. Classicamente o paciente poderá apresentar sinais clínicos como: febre, tosse e dispneia. Durante o exame físico, o qual é imprescindível para o diagnóstico, podemos encontrar: retração intercostal, estridor expiratório contínuo e murmúrio vesicular diminuído. É comum que esse tipo de infecção seja resultante de uma exposição à bactérias. Contudo, não é o único patógeno causador dessa doença, podendo ser, também, vírus ou fungos. Os exemplos mais frequentes de agentes bacterianos causadores dessa doença são: *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus agalactiae*. Vale lembrar que os agentes mais habituais variam de acordo com a faixa etária. Durante a prática clínica além dos recursos de padrão clínico e de exame físico, têm-se os exames de imagem (radiografia de tórax) e exames laboratoriais mais específicos. Dentre esses temos a hemograma com VHS e hemocultura. O presente trabalho procura demonstrar a importância do PCR/RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase/Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição) na identificação e caracterização das bactérias através da genotipagem do DNA. Sendo assim, verificar qual metodologia de diagnóstico etiológico (hemocultura ou PCR/RFLP) possui melhor acurácia na identificação bacteriana em pacientes pediátricos com pneumonia adquirida na comunidade. Para coleta de dados 50 pacientes pediátricos foram selecionados e atendidos no Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB) na faixa etária de zero a doze anos. Os dados colhidos consistem em amostras de sangue dos pacientes, segundo critérios pré-determinados, e informações contidas no sistema de prontuário eletrônico da Secretaria de Estado de Saúde – DF (TrakCare). Em seguida, foram realizados ambos os exames para cada amostra de sangue colhida e feita a comparação entre os resultados obtidos com cada método. A PCR/RFLP foi realizada em três etapas:

extração do DNA da amostra; realização da técnica de reação em cadeia da polimerase com digestão enzimática utilizando um padrão de digestão com a enzima de restrição *Hae III* a fim de estabelecer diferenças genéticas entre os microrganismos e definir qual está infectando o paciente. Por fim, os resultados foram concebidos através da análise dos fragmentos de DNA observados nas eletroforeses em gel de agarose e poliacrilamida. A hemocultura, por sua vez, foi realizada em três etapas, sendo a primeira a coleta adequada da amostra de sangue, evitando contaminações que pudessem interferir no resultado final; a segunda o adequado armazenamento e transporte do material e a terceira o cultivo da amostra em culturas específicas para os agentes etiológicos. Pode-se inferir que quando o serviço de saúde disponibiliza esses dois tipos de exame, a hemocultura é mais escolhida em detrimento do preço, apesar da PCR/RFLP encontrar o agente etiológico mais rapidamente e com maior especificidade e sensibilidade. Com essa última técnica, foi definido um padrão etiológico bacteriano comum de *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus agalactiae* nas amostras. Contudo, a maioria das hemoculturas foi negativa para a pesquisa de gram positivo, gram negativo e anaeróbios.

Palavras-Chave: Pneumonia Adquirida na Comunidade; Hemocultura; PCR/RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase/Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	Página 1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	Página 4
3. METODOLOGIA.....	Página 9
3.1. Descrição da amostra.....	Página 9
3.2. Coleta e estocagem das amostras biológicas.....	Página 9
3.3. Extração de DNA.....	Página 11
3.4. Quantificação do DNA.....	Página 11
3.5. Preparo de amostras para reação de PCR.....	Página 12
3.6. Técnica de PCR.....	Página 12
3.7. Digestão – Utilizando as enzimas de restrição.....	Página 14
3.8. Limpeza das placas para eletroforese de poliacrilamida...	Página 16
3.9. Montagem das placas no cassete.....	Página 16
3.10. Condições para amplificação por PCR.....	Página 17
3.11. Quantificação dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0%.....	Página 18
3.12. Preparação de gel de poliacrilamida.....	Página 20
3.13. Preparação das amostras.....	Página 21
3.14. Eletroforese.....	Página 21
3.15. Colocação de nitrato de prata.....	Página 21
3.16. Técnica de hemocultura.....	Página 23
4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	Página 24
5. CONCLUSÃO.....	Página 32
6. REFERÊNCIAS.....	Página 33
7. ANEXO 1 – TCLE.....	Página 36
8. ANEXO 2 – TERMO DE ASSENTIMENTO.....	Página 39
9. ANEXO 3 – PARECER FEPECS - APROVADO.....	Página 41
10. ANEXO 4 – PARECER UniCEUB - APROVADO.....	Página 45

SIGLAS E ABREVIATURAS

CP – Controle positivo

DF – Distrito Federal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FEPECS - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde

g – Gramas

HMIB – Hospital Materno Infantil de Brasília

ICS – Infecção da corrente sanguínea

mA – mili-ampéres

mQ – MilliQ

NaOH – Hidróxido de sódio

PAC – Pneumonia adquirida na comunidade

PCR/RFLP – Reação em Cadeia da Polimerase/Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição.

PCR-SSCP – Polimorfismo de conformação de fita simples do PCR

PFGE – Eletroforese em gel com campo pulsado

PS – Pronto-Socorro

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – Ácido ribonucléico ribossomal

rpm – Rotações por minuto

SES – Secretaria de Estado da Saúde

SLR – Células vermelhas

SLB – Células brancas

UFC/ml – Unidades Formadoras de Colônias/ml

UniCEUB – Centro Universitário de Brasília

UV – Ultra-violeta

μL – Micro-litros

μg – Micro-gramas

ng – Nano-grama

W – Watts

1. INTRODUÇÃO

A pneumonia adquirida na comunidade (PAC) é uma infecção de vias aéreas inferiores adquirida fora do ambiente hospitalar. Doenças respiratórias com maior quadro de morbidade e mortalidade, como a PAC, causam diversas internações em pacientes pediátricos nos países em desenvolvimento. Isso gera um alto custo para a saúde pública, o desempenho escolar de crianças fica comprometido e principalmente, a qualidade de vida dos pacientes fica prejudicada. (VERAS et al, 2010)

É comum crianças terem até seis infecções respiratórias agudas por ano, e cerca de 3% desses desenvolvem pneumonia. (AHMAD et al, 2000) Os principais fatores de risco envolvidos estão relacionados com baixo nível socioeconômico, exposição à poluição e a alérgenos ambientais, prematuridade e tabagismo passivo. (VERAS et al, 2010) Mais fatores evidenciados são relacionados à baixa idade e às comorbidades que, juntamente com a gravidade da doença, podem concorrer para o desfecho letal. Outros fatores são baixo peso ao nascer, permanência em creche, episódios prévios de sibilos e pneumonia, ausência de aleitamento materno e vacinação incompleta. (MONTEIRO, 1985)

É alarmante o fato de que países em desenvolvimento possuem uma frequência até 10 vezes maior de casos por 100.000 habitantes do que países desenvolvidos. E mais grave ainda é o fato de que, além da frequência maior, possui um quadro de maior mortalidade. (MCINTOSH, 2002). De acordo com o Ministério da Saúde, 12% dos óbitos das crianças abaixo de cinco anos são de pneumonia.

O quadro clínico do paciente possui manifestações clássicas, porém pode também apresentar manifestações atípicas. Geralmente apresentam um histórico de infecção de via aérea superior precedendo o início das manifestações de sua própria doença (MICHELOW et al, 2004).

Classicamente há febre, tosse (quanto mais produtiva, mais grave), dispneia e prostração. Porém, pode haver manifestações atípicas, como irritabilidade, cefaleia, redução do apetite, vômitos e dor abdominal (BRAMAN, 2006).

Os achados nos exames são diversos, de acordo com a extensão e a anatomia de cada lesão. Dentre eles, taquipneia, retração intercostal, batimento de asa de nariz e presença de estridor expiratório contínuo. Durante ausculta, murmúrio vesicular pode

encontrar-se diminuído, devido a condensação, derrame pleural e grandes atelectasias. A palpação e a percussão podem identificar condensações e derrames extensos. Em decorrência das diversas combinações entre os achados, por vezes a clássica síndrome de condensação (frêmito tóraco-vocal aumentado, macicez e estertores crepitantes com sopro tubário) pode não estar presente. (BRAMAN, 2006; PARLAFOX et al, 2000).

Por existirem diversos agentes etiológicos e por haver resistência específica de cada espécie, por vezes necessita-se do diagnóstico etiológico adequado para se direcionar o tratamento. Logo, exames específicos são necessários, principalmente a hemocultura e a Reação em Cadeia da Polimerase. (GUSMAN-BLANCO et al, 2000)

Primeiramente, para a realização da hemocultura, há de se considerar as suas indicações: paciente virgem de tratamento, quadro clínico sugestivo, febre ou hipotermia, leucocitose ou granulocitopenia absoluta. Vale lembrar que, em casos de suspeita de foco de infecção provável, é indicada, também, a coleta de materiais representativos dos outros sítios, como líquido, urina, fezes, secreções, abscessos etc. (BRONFE, 1989).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que permite a amplificação de regiões específicas do DNA, o que torna esse método bastante flexível. Ela utiliza amplificação “in vitro” de uma região específica de ácidos nucleicos. A escolha dos primers (pequenos fragmentos sintetizados, complementares às sequências do fragmento do DNA a ser amplificado) determina a especificidade do teste e permite a amplificação dos ácidos nucleicos específicos (MOLINA E TOBO, 2004).

O objetivo do presente estudo é comparar, de forma sistematizada, a sensibilidade e a especificidade do método convencional (hemocultura), considerado como padrão-ouro para identificação bacteriana, com o método molecular (PCR-RFLP) para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*. A comparação foi realizada com amostras de sangue periférico de 50 pacientes pediátricos do Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB) comprovadamente com pneumonia adquirida na comunidade.

Os objetivos específicos foram identificar as pneumonias bacterianas, caracterizar o perfil bacteriano de cada uma e determinar os agentes etiológicos mais prevalentes na amostragem analisada.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Dentro das pneumonias, na maioria das vezes o agente etiológico não é identificado; entretanto, seu conhecimento é de suma importância para o direcionamento do tratamento. (AHMAD et al, 2000)

Os agentes etiológicos bacterianos mais comuns são: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. Vale ressaltar que cada idade possui um patógeno específico. (MCINTOSH, 2002)

No quadro clínico, a primeira coisa que se deve identificar é se a infecção é de vias aéreas superiores ou inferiores. Levando em consideração que as histórias clínicas são variadas em ambos os tipos, pode-se tornar um desafio para o clínico executar tal diferenciação. Além disso, existe um padrão constante dentro da PAC, que é um histórico de infecção de via aérea superior precedendo o início das manifestações de sua própria doença. (MICHELOW et al, 2004).

Outra coisa que se pode diferenciar (de forma grosseira) é se a etiologia é viral ou bacteriana, de acordo com o padrão de febre e prostração do paciente (excluindo crianças abaixo dos três meses de idade, que possuem um padrão mais afebril). Em etiologias virais, a febre e a prostração cedem após o uso de antipiréticos e banhos térmicos. Já em infecções bacterianas, a febre costuma não se extinguir e o quadro de prostração normalmente se mantém. (MICHELOW et al, 2004)

A gravidade do quadro clínico é diretamente proporcional a intensidade de febre, tosse mais produtiva e prostração mais evidente. (HEISKANEN-KOSMA et al, 1998)

O direcionamento para o tratamento se deve pelo conhecimento do patógeno que está infectando o paciente. Cada etiologia possui um espectro com sensibilidade e um com resistência. Pneumococos são resistentes principalmente à penicilina e, em menor frequência, aos macrolídeos e ao cotrimoxazol, sendo sensíveis às cefalosporinas de terceira geração. O *H. influenzae* é um produtor de beta-lactamase, gerando um tratamento mais específico. O *S. aureus* está aumentando sua resistência a oxacilina; contudo, ainda apresentam sensibilidade a glicopeptídeos. Os melhores fármacos para o

tratamento de *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* são os macrolídeos. (GUSMAN-BLANCO et al, 2000)

Para obtenção do diagnóstico etiológico, devem-se realizar exames específicos, e os abordados pelo trabalho serão hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Para se obter uma melhor coleta de uma amostra de hemocultura, deve-se ter em mente o correspondente a uma punção. Cada punção, por sua vez, corresponde a dois frascos para adultos ou a um frasco para pacientes pediátricos de até 13 kg. Recomenda-se coletar, no mínimo, de duas a quatro amostras por episódio infeccioso, o que permite o isolamento do agente bacteriano em mais de 95% dos eventos. Isso se justifica na premissa da positividade cumulativa de hemoculturas, ou seja, quanto maior a proporção do número de hemoculturas positivas em função do número total de amostras coletadas, maiores as chances de se tratarem de bacteremias verdadeiras, visto que os contaminantes geralmente crescem somente em uma amostra (quando duas ou mais são obtidas). Portanto, a coleta de uma amostra única deve ser inibida, já que um número substancial de bacteremias pode não ser detectado e impossibilita a discriminação de possíveis contaminantes. (ELMOR, 2012).

Em casos que o paciente estiver em vigência de antimicrobianos, as hemoculturas devem ser obtidas imediatamente antes da administração da próxima dose, para evitar resultados falso-negativos. Dá-se preferência a coletas por punção venosa, tão logo se inicie o aumento de temperatura do paciente.

Além disso, como a coleta de sangue arterial não está associada com aumento da sensibilidade, sua recomendação é quase inexistente, visto que sua técnica é mais invasiva e propensa a contaminações secundárias maiores. Cada amostra deve ser coletada de punções separadas e de sítios anatômicos diferentes, entretanto, vários frascos com sangue de uma mesma punção são considerados uma mesma amostra ou cultura de sangue.

Não há diferenças na recuperação de hemoculturas num período de 24 horas quando obtidas simultaneamente ou em intervalos separados. As hemoculturas, preferencialmente, não devem ser coletadas a partir de cateter, exceto para diagnóstico de infecção relacionada ao dispositivo. As respectivas coletas devem ser representadas por

um mesmo volume de sangue, para que sejam comparáveis quanto ao tempo de positividade. (THOMSON e col., 1991)

Em casos de pacientes pediátricos, o volume ótimo de sangue ainda não foi tão bem definido, mas os dados da literatura demonstram que há uma possível relação direta entre o volume de sangue obtido e a detecção de infecção da corrente sanguínea (ICS). Em estudos anteriores, já foi demonstrado que amostras de sangue com volume maior ou igual a 1ml detectaram mais bacteremias que amostras com volumes inferiores. (KELLOGG e col, 2003; COCKERILL, 2004) Portanto, a bacteremia de baixo grau, com contagem inferior a 10 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias/ml) ocorria em cerca de 68% dos lactentes até dois meses e em cerca de 60% das crianças do nascimento até 15 anos. Mas, em 23% dos episódios, tinha contagem inferior ou igual a 1 UFC/ml. (WASHINGTON, 1998).

Com o advento das técnicas em biologia molecular, surgiu a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica é baseada em uma reação de replicação *in vitro*, na qual se obtém o enriquecimento específico de DNA (ácido desoxirribonucleico) por meio de sua duplicação, em modo exponencial. A técnica de PCR é tão sensível que, em princípio, uma única molécula de DNA pode, em teoria, servir como molde para a amplificação. Assim, um gene presente no genoma de um patógeno pode ser amplificado, podendo ser posteriormente visualizado em gel de agarose e/ou poliacrilamida, dependendo do tamanho do fragmento (ALBERTS *et al.*, 2002). A escolha dos primers (pequenos fragmentos sintetizados, complementares a sequencias do fragmento do DNA a ser amplificado) determina a especificidade do teste e permite a amplificação dos ácidos nucleicos específicos. (MOLINA E TOBO, 2004).

Essa ferramenta na detecção e identificação de bactérias e de outros patógenos em diversas infecções tem sido aventada uma vez que a viabilidade dos microrganismos, bactérias ou fungos tem-se mostrado de difícil obtenção em cultura. Esse fato é visto, principalmente, em pacientes graves ou que fazem uso de antibioticoterapia.

Apesar da especificidade e da sensibilidade variarem bastante na literatura, estudos feitos por Michelow et al mostraram que estes testes apresentam alta sensibilidade (92%) e especificidade (88%). Apesar disso, é certo que a técnica da PCR trouxe enormes benefícios para o diagnóstico rápido e precoce de doenças infecciosas, tendo maior

precisão, produtividade, acurácia, velocidade na análise, melhor controle de qualidade e menor risco de contaminação. (NOVAIS et al., 2004; MICHELOW et al, 2002).

Os métodos de amplificação do DNA oferecem grande vantagem do aumento da sensibilidade para identificação de patógenos virais, bacterianos e fúngicos. Por esse fato, ele é de grande utilidade no diagnóstico etiológico das pneumonias. Vários métodos de PCR foram avaliados para a detecção de *S.pneumoniae* em amostras, como sangue total, plasma, líquido pleural e aspirado pulmonar, mas os resultados são muito discrepantes. (RODRIGUES et al, 2002).

Quando o patógeno a ser identificado é uma bactéria, a região do genoma escolhida para análise (reconhecida pela comunidade internacional de microbiologistas) é a que codifica o gene 16S do RNA (ácido ribonucléico) ribossomal (rRNA) bacteriano. Este gene é um ótimo marcador genético por estar presente na grande maioria das espécies bacterianas e não acumular mutações dentro de uma mesma espécie com o passar do tempo.

A sequência de nucleotídeos de uma infinidade de espécies vem sendo disponibilizada para utilização pública (JANDA & ABBOTT, 2007). Sendo assim, a detecção de bactérias pode ser feita pelo isolamento, por PCR, da região 16S rRNA de amostras de DNA bacteriano, extraído de amostras biológicas humanas infectadas. Uma vez que a presença do patógeno foi detectada, a região 16S rRNA isolada é clivada com enzimas de restrição específicas, gerando fragmentos de tamanhos singulares para cada bactéria, possibilitando, assim, sua identificação devido ao padrão de clivagem obtido. A técnica de PCR associada com a digestão enzimática por enzimas de restrição é designada de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase associada ao Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição). (JANDA & ABBOTT, 2007).

A determinação da suscetibilidade bacteriana a um antimicrobiano em um paciente é importante para o êxito na terapia desses, quando infectados. Essa necessidade surgiu com o aumento da resistência bacteriana e com o aparecimento de bactérias multirresistentes a vários antimicrobianos. Os testes são necessários não apenas para a terapia, mas para acompanhar o desenvolvimento dos microrganismos resistentes e dos genes de resistência na comunidade e nos hospitais.

Os sistemas de detecção baseados nos ácidos nucléicos oferecem métodos rápidos e sensíveis para detectar a presença dos genes de resistência e desempenhar um papel crítico na elucidação dos mecanismos de resistência. Dentre os métodos moleculares úteis na detecção da resistência, temos a hibridização molecular, a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) com diversos tipos de oligonucleotídeos e marcadores, o polimorfismo de conformação de fita simples do PCR (PCR-SSCP), Branched DNA, PCR em Tempo Real e eletroforese em gel com campo pulsado (PFGE). A variedade das técnicas moleculares utilizadas em aplicações diagnósticas demonstra que não há técnica universal que seja ótima para detecção de ácidos nucléicos.

Os principais problemas nas emergências hospitalares, quando o assunto é o diagnóstico de infecções bacterianas, são a falta de rapidez, de especificidade e de eficiência no processo. Isso se dá devido ao fato do quadro clínico ser inespecífico e a análise laboratorial ser demorada, uma vez que o padrão-ouro para o diagnóstico é a cultura microbiana, procedimento este que pode levar até duas semanas, quando há sucesso. A necessidade de se iniciar o tratamento do paciente com antimicrobianos antes mesmo da coleta do material para análise pode também contribuir para a falta de êxito destas metodologias nos diagnósticos.

Com o advento das técnicas do DNA recombinante, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) associada à ação das enzimas de restrições (RFLP), assim como outras metodologias de hibridizações moleculares permitiram o aumento da sensibilidade (detectando menos que 10 organismos por mililitro de líquido) e da rapidez (aproximadamente 48 horas) dos diagnósticos em infecções bacterianas e fúngicas.

Desta forma, metodologias moleculares associadas ao quadro clínico dos pacientes, juntamente com técnicas bioquímicas e microbiológicas já existentes, podem propiciar uma rápida e eficaz identificação bacteriana, favorecendo um diagnóstico mais preciso e um tratamento mais específico de diversas patologias.

3. METODOLOGIA

3.1. Descrição da amostra

Trata-se de um estudo prospectivo que foi desenvolvido no Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB), no período de março de 2017 a julho de 2017. Foram incluídos cinquenta pacientes internados na unidade de pediatria, com suspeita clínica de pneumonia adquirida na comunidade. A esses pacientes, familiares ou responsáveis foram apresentados o projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios de Inclusão: Foram incluídos na pesquisa os pacientes com suspeita clínica de pneumonia adquirida na comunidade internados na unidade de pediatria e paciente cujo responsável preencheu o Termo de Livre Consentimento Esclarecido aceitando participar da pesquisa.

Critério de Exclusão: Paciente cujo responsável não aceitou participar da pesquisa; e pacientes que não preencherem os critérios de inclusão anteriormente citados.

3.2. Coleta e estocagem das amostras biológicas

O primeiro critério para a inclusão de pacientes neste estudo foi a idade, que incluiu as seguintes faixas etárias: recém-nascido (até 28 dias); lactente (29 dias até 24 meses); pré-escolar (24 meses e 1 dia até 5 anos); e escolar (5 anos e 1 dia até 12 anos completos). A segunda etapa de escolha do espectro amostral foi a avaliação do quadro clínico dos pacientes, realizada no pronto-socorro (PS) do HMIB. Após a anamnese e avaliação médica dos pacientes, foram considerados aqueles com quadro sugestivo de pneumonia adquirida na comunidade, para prosseguimento da coleta de dados para a pesquisa.

Foram considerados pacientes que não tinham iniciado antibioticoterapia, assim como os que já tinham iniciado o tratamento.

A sintomatologia esperada para inclusão do paciente no estudo devia compreender os seguintes sinais/sintomas: em recém-nascidos e lactentes (febre ou hipotermia, tosse seca ou produtiva, coriza, taquipneia e/ou dispneia); em pré-escolares e escolares (tosse seca ou produtiva, febre, exacerbação dos sintomas e manutenção da febre em período superior a 48 horas, sinais semiológicos como submacicez à percussão, crepitações,

diminuição de murmúrios vesiculares fisiológicos).

Também estão inclusos os seguintes achados radiológicos para que o paciente faça parte do espaço amostral, independente da idade, por ser extremamente útil ao diagnóstico: consolidações alveolares, opacificação de borda cardíaco, velamento de seio costofrênico e opacificações reticulares.

Por fim, a terceira etapa de escolha do espectro amostral para seleção de pacientes foi a realização dos exames de hemocultura, nas dependências do Laboratório Bios, ocorrendo o mesmo para a reação de cadeia da polimerase e o processo de digestão enzimática do DNA amplificado (PCR-RFLP), para a confirmação do diagnóstico etiológico de pneumonia adquirida na comunidade.

Foram colhidos sangue periférico para realizações de exames pelos métodos de hemocultura em frascos específicos pediátricos da marca BD e com anticoagulante (EDTA), para realização do PCR-RFLP descrita por Jang-Jih Lu e colaboradores (2000).

As amostras seguiram para o laboratório de microbiologia para realização de hemocultura, enquanto, as amostras de sangue em EDTA seguiram para extração de DNA total. Em seguida, o DNA total extraído (DNA do paciente possivelmente misturado com o DNA bacteriano) foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos (*primers*) específicos para a região 16S rRNA bacteriana. Neste procedimento foram usados dois controles: (i) controle positivo: DNA obtido de amostras bacterianas após cultura *in vitro* em meio líquido do espécime bacteriano *Escherichia coli*; (ii) controle negativo: reação realizada sem a presença de DNA de nenhuma espécie.

Na metodologia PCR-RFLP, o produto de PCR obtido foi analisado inicialmente em gel de agarose 2 %, sendo que em seguida foi digerido com a enzima de restrição *Hae* III (*Haemophilus aegypticus*), procedimento capaz de identificar os seguintes espécimes bacterianos: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*. Para identificação dos espécimes *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae* se faz necessária a digestão com as enzimas de restrição *Mnl* I (*Moraxella nonliquefaciens*), *Alu* I (*Arthrobacter luteus*),

Dde I (Desulfovibrio desulfuricans) e *BstB I (Bacillus stearothermophilus B225)* uma vez que este grupo de bactérias apresenta espécies com o mesmo perfil de digestão para a região 16S rRNA. Por fim, os perfis de digestões das amostras e do controle positivo foram visualizados e analisados em gel de poliacrilamida 6%.

Análise Estatística: Foi realizada estatística descritiva com frequências e proporções. Aspectos Éticos: Este estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB), tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS.

3.3. Extração de DNA

Nas amostras de sangue, foi utilizado o método conhecido como “Salting Out” modificado. Este método consiste das seguintes etapas: **(1)** Alíquota de 300 μL da amostra de sangue em microtubo estéril e identificado; **(2)** adicionar 1,0 mL de tampão de lise de células vermelhas (SLR), agitar em vórtex, centrifugar a 4000 G durante 3 minutos, desprezar o sobrenadante; **(3)** Repetir a etapa 2 até completar a lise das hemácias; **(4)** Adicionar 500 μL de tampão de lise de células brancas (SLB), juntamente com 4,0 μL da solução de proteinase K, submeter ao vórtex e centrifugação durante 10 segundos; **(5)** Incubação a 56°C durante 2 horas ou 42°C durante 18 horas; **(6)** Adicionar 200 μL de NaCl 6,0 M; **(7)** Vórtex até obtenção de uma solução de aspecto claro; **(8)** Centrifugar durante 3 minutos a 12000 G; **(9)** Transferir o sobrenadante para outro microtubo; **(10)** Adicionar 700 μL de isopropanol; **(11)** Agitar por inversão do tubo, até obtenção do DNA; **(12)** Centrifugação durante 5 minutos a 7000 G; **(13)** Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com solução de etanol 70%; **(14)** Descartar o etanol e deixar as amostras secando à temperatura ambiente ou em centrífuga à vácuo; **(15)** Diluir a amostra em 50 a 100 μL de TE^{-4} ou água conforme a intenção de conservar o DNA extraído por mais tempo. O DNA diluído em água permanece por mais tempo sem sofrer degradação.

3.4. Quantificação do DNA

Feito gel de agarose 0,8%. Foi utilizado cuba GNA 200 (Pharmacia): preparado 150 mL de agarose, suficiente para amostras de até 15 μL , três pentes de 22 poços (5 x 1mm). As amostras foram diluídas com água deionizada na proporção 1:40.

Preparação das amostras de DNA: 8 μL amostras diluídas, 4 μL do tampão de amostra 5X. O volume total da amostra aplicado no gel foi de 12 μL . O tampão de corrida utilizado foi TBE 1X. As condições de corrida foram 75 V/115 mA durante um período de 1 a 2 h.

Após realização da eletroforese, o gel foi colocado dentro de uma solução aquosa com brometo de etídio (10 mg/mL) durante 30 min. Posteriormente, o gel foi lavado com H_2O deionizada, as amostras foram analisadas em um transiluminador UV e depois fotografadas em máquina polaroid. Durante a exposição ao UV, as amostras de DNA foram comparadas com um padrão de quantificação obtido em espectrofotômetro.

As amostras quantificadas foram diluídas e feitas alíquotas inicialmente em concentrações de 250 ng/ μL , sendo que após essa etapa foram feitas sub-alíquotas de 25 ng/ μL , como solução-trabalho. Com isso, foi dado início às amplificações das amostras, porém, foi estabelecida a condição ideal para realizações das PCR para cada loco, verificando a qualidade e concentração do DNA obtido após as extrações com a finalidade de utilizar DNA não-degradado, assim como padronizar a quantidade de DNA em cada reação.

3.5. Preparo de amostras para reação de PCR

H_2O = 1 μL

Primer= 3 μL

Pré Mix= 2 μL

DNA= 4 μL (100ng/ μL)

3.6. Técnica de PCR

Para realizar a PCR, primeiramente, teve que considerar quatro etapas distintas: coleta da amostra de maneira adequada; extração do DNA da amostra; realização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em si; avaliar o resultado em eletroforese. Pois bem, para coleta do material usou-se sangue periférico. Entretanto, para evitar a coagulação e hemólise, com posterior presença do grupo heme, que é um potente inibidor da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi utilizado como anticoagulante para as amostras EDTA (ácido etilenodiamino tetracético). Portanto, o sangue de volume inicial

de cerca de 2 ml foi colhido com o EDTA e armazenado por 24 a 48 horas a -4°C , sendo posteriormente encaminhado para extração do DNA.

Em sequência, para a extração do DNA foi também utilizado um protocolo da empresa Qiagen para avaliar o rendimento e qualidade do DNA obtido dos pacientes. Nesse protocolo, após realizar a limpeza do fluxo laminar com etanol 70%, é mantido por 15 minutos sob luz ultravioleta para destruir DNA residual de outras espécies que estejam presentes.

Foi utilizado 200 μL de amostra de sangue total, com adição posterior de 20 μL de proteinase K. Após isso, foi adicionado 200 μL de tampão AL (kit Qiagen), e submetido ao vórtex durante 15 segundos.

A amostra foi incubada a 56°C por no mínimo 10 minutos, sendo centrifugado por 2 segundos, logo após, foi adicionado 200 μL de Etanol P.A. na amostra, sendo submetida ao vórtex por 15 segundos e à centrifugação novamente por 2 segundos.

Após essas etapas, as amostras foram aplicadas nas colunas do kit. A seguir foram centrifugadas a 8.000 rpm durante 3 minutos (até o líquido passar completamente pela coluna).

Os tubos coletores foram descartados, sendo que as colunas foram transferidas para outros tubos coletores. Foi adicionado 750 μL de tampão AW1, sendo que a seguir as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm durante 3 minutos. Descartaram-se os tubos coletores, sendo as colunas transferidas para outros tubos. Foi adicionado 750 μL de tampão AW2 a cada amostra, sendo centrifugadas a 8.000rpm por 3 minutos. Os tubos coletores foram descartados e as colunas transferidas para novos tubos coletores.

A seguir as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 min, até secarem as membranas, os produtos foram transferidos a colunas para depois serem colocadas em um novo tubo de 1,5 mL.

As tampas foram abertas cuidadosamente, sendo adicionados 25 μL de tampão AE (ou água destilada levemente aquecida a aproximadamente 37°C durante 1 hora, para aumentar o rendimento da eluição do DNA).

Posteriormente, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto, sendo centrifugadas a 8.000 rpm durante 1 minuto. Foram repetidas as últimas etapas no sentido de obter maior quantidade de material.

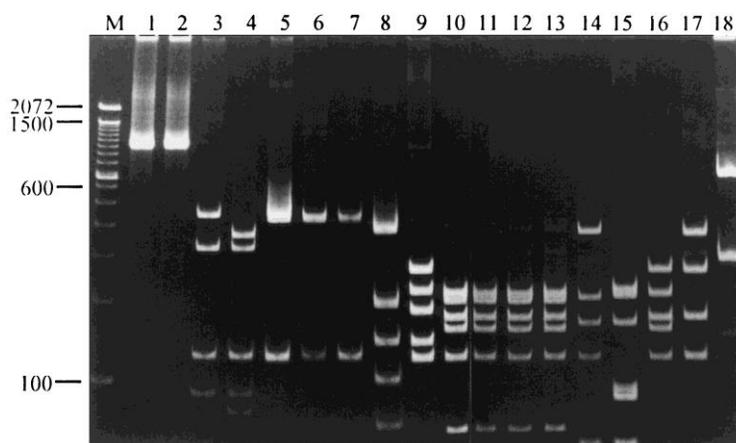
Ao final da extração o fluxo laminar foi limpo com hipoclorito a 2%. Em seguida foi utilizado etanol 70% e deixado a luz ultravioleta ligada por aproximadamente 1 hora.

As amostras contendo em princípio DNA foram dispostas em géis de agarose a 2 % com o corante brometo de etídio. As amostras de DNA foram colocadas em poços no gel, em seguida, foi aplicada uma voltagem durante 30 minutos para proporcionar a separação ideal das amostras. Ao desligar a corrente, as sequências que tinham incorporado o corante, apresentavam o DNA visível na presença de luz UV. Esse DNA foi comparado com outra amostra utilizada como padrão com a finalidade de avaliar a qualidade e concentração do DNA.

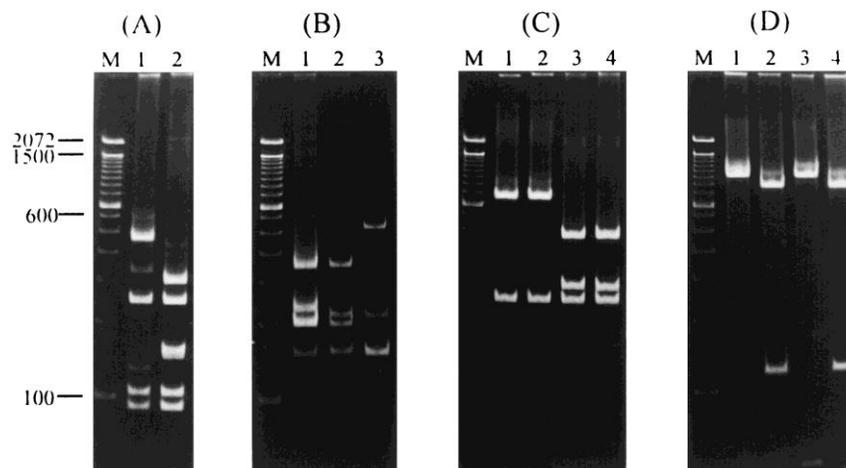
3.7. Digestão – Utilizando as enzimas de restrição

Nas figuras 1 e 2 têm-se gel de agarose a 2 %, demonstrando estudos prévios utilizando DNA bacteriano e as diversas enzimas de restrições que foram utilizadas, como referências para curva de conhecimento do perfil enzimático para as diversas amostras.

Figura 1: Padrão de digestão da enzima de restrição *Hae* III



Nota: Coluna 1, *S. aureus*; Coluna 2, *S. epidermidis*; Coluna 3, *S. pyogenes*; Coluna 4, *S. agalactiae*; Coluna 5, *S. pneumoniae*; Coluna 6, *E. faecium*; Coluna 7, *E. faecalis*; Coluna 8, *M. tuberculosis*; Coluna 9, *L. pneumophila*; Coluna 10, *E. coli*; Coluna 11, *K. pneumoniae*; Coluna 12, *S. marcescens*; Coluna 13, *E. cloacae*; Coluna 14, *P. aeruginosa*; Coluna 15, *A. baumannii*; Coluna 16, *P. mirabilis*; Coluna 17, *H. influenzae*; Coluna 18, *N. meningitidis*; Coluna M significa marcador de massa molecular em pares de base (pb).

Figura 2: Padrão de digestão do produto de PCR dos primers universal

Nota: Coluna M é o marcado molecular em pares de base (pb);

- (A) Enzima de restrição *Mnl* I para: coluna 1 - *S. aureus*; coluna 2 - *S. epidermidis*.
 (B) Enzima de restrição *Alu* I para: coluna 1 - *S. pneumoniae* ; coluna 2 - *E. faecium*; coluna 3 - *E. faecalis*.
 (C) Enzima de restrição *Dde* I para: coluna 1 - *E. coli*; coluna 2 - *K. pneumoniae*; coluna 3 - *S. marcescens*; coluna 4 - *E. cloacae*.
 (D) Enzima de restrição *Bst*BI para: coluna 1 - *E. coli*; coluna 2 - *K. pneumonia*; coluna 3 - *S. marcescens*; coluna 4 - *E. cloacae*.

Ao retirar, cuidadosamente, o óleo mineral dos tubos com a inscrição Bac 1 e Bac2, juntou-se as amostras (produtos da PCR) em um único tubo. Foram identificados cinco tubos com o nome das cinco enzimas (*Hae* III, *Dde* I, *Alu* I, *Mnl* I e *Bst*B I) e outro com CP (controle positivo).

ENZIMA	TAMPÃO
<i>Hae</i> III	Restriction Endonuclease Buffer SM (Sigma; tampa verde)
<i>Dde</i> I	Restriction Endonuclease Buffer SH (Sigma; tampa vermelha)
<i>Alu</i> I	Buffer SA (Sigma; tampa roxa)
<i>Mnl</i> I	Buffer G (tampa verde; com G em cima)
<i>Bst</i> B I	NEBuffer 4 (tampa branca com 4 em cima)

Nos tubos identificados com o nome das enzimas adicionou-se:

- | | | |
|--|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 10μL do DNA amplificado (produto da PCR). 2. 7μL de H₂O MilliQ. 3. 2μL do tampão (correspondente a cada tipo de enzima). 4. 1μL da enzima de restrição. | } | <p>Volume total da
digestão = 20μL</p> |
|--|---|---|

No tubo identificado com CP (Controle Positivo) adicionou-se:

- | | | |
|--|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 5μL do DNA amplificado (produto da PCR). 2. 12μL de H₂O MilliQ. 3. 2μL do tampão (correspondente a cada tipo de enzima). 4. 1μL da enzima de restrição. | } | <p>Volume total da
digestão = 20μL</p> |
|--|---|---|

3.8. Limpeza das placas para eletroforese de poliacrilamida

- Deixado em solução de NaOH 1M por 12 horas;
- Lavado as placas em uma pia apropriada, sempre na posição vertical, utilizando uma esponja reservada apenas para limpeza das mesmas com detergente neutro (Alconox), esfregando com o lado macio da esponja (lado amarelo);
- Deixado no escorredor e jogar água fervendo;
- Deixado secar a temperatura ambiente.

3.9. Montagem das placas no cassete

- Observar os lados das placas: o lado numerado das placas deve ser o externo
- Posicionamento das placas: placa grande: corte para baixo, placa pequena: chanfradura para cima.

As sequências de primers utilizadas foram:

(1) Primer U1: (F) 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' (Corresponde aos nucleotídeos de 518 a 537 do gene da *E. coli* 16S rRNA gene)

(2) Primer U2: (R) 5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3', correspondendo aos nucleotídeos 1513 a 1491 do mesmo gene.

3.10. Condições para amplificação por PCR

Foi usado 50 ng de DNA genômico, com tampão para PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 2.5 mM MgCl₂; 0.001% gelatina; concentração de 0.2 µM de cada primer; concentração de 0, 2 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato; 2,5 U of *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) para um volume final de 50 µl de reação.

O Programa para PCR foi: (a) Desnaturar a 94°C por 10 minutos; (b) 35 ciclos de desnaturação de 1,0 minutos a 94°C; (c) Temperatura de anelamento a 55°C durante 1,0 minutos; (d) Extensão durante 2 minutos a 72°C; (e) Incubação por 10 minutos a 72°C; (f) Temperatura de 4,0 °C para repouso.

Para evitar a contaminação de DNA externo ou residual as amostras foram pré-incubadas com 50 U de DNase I durante 30 min a 37°C. DNase I foi posteriormente desnaturada pelo aquecimento a 95°C por 10 minutos. Foram visualizados fragmentos entre 287 pb para o primer interno e outro com 709 pb para o primer externo. Testes foram realizados com outras combinações dos primers entre si.

Para a PCR é preciso identificar os tubos eppendorf com as seguintes inscrições:

- Bac 1 (amostra para identificação de bactéria);
- Bac 2 (amostra para identificação de bactéria);
- CP (controle positivo: *E. coli*);

Obs: Para fazer a digestão é necessário 60µL de amostra, sendo assim, é necessário preparar 3 amostras para identificação bacteriana para cada paciente.

Pipetar nos tubos:

1. DNA extraído: 5 μ L de em cada tubo (6 tubos para cada paciente) e 5 μ L do Controle Positivo (Meningite) em outro tubo.
2. Primers: 3 μ L (Primer F - 1,5 μ L e Primer R - 1,5 μ L); H₂O MilliQ (ou Nuclease water free): 5 μ L;
3. Go taq polimerase: 12,5 μ L ;
4. Adicionar uma gota de óleo mineral em cada tubo.

Volume
total da PCR
em cada
tubo = 25 μ L

Foram utilizados tubo para PCR de 500 μ L. Foi preparado um volume de mistura de reação para o total de amostras considerando uma amostra extra para margem de segurança devido à possível variação de volume ao pipetar.

Foi utilizado uma gota de óleo mineral em cada tubo contendo a reação de amplificação.

Todos os tubos foram mantidos no gelo durante o procedimento. O termociclador foi da marca PTC 100 da empresa MJ Research.

Após as reações as amostras eram removidas e estocadas a 4°C, tendo sido separadas das amostras de pré - PCR e reagentes.

3.11. Quantificação dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0%

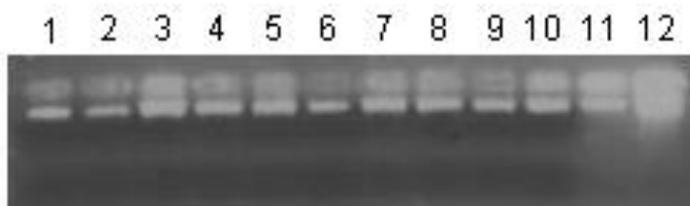
Antes de iniciarmos o processo de verificação da amplificação as amostras que estavam estocadas a 4 ° C, foram deixadas à temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos, homogeneizadas no vórtex por 15 segundos e centrifugadas a 13000 rpm por 5 segundos. Após isso, foi adicionado 6 μ L de cada produto de PCR relacionado a cada amostra, em tubos separados a 4 μ L de tampão de amostra, homogeneizados e centrifugados a 13000 rpm por 5 segundos, imediatamente antes da aplicação no gel. A eletroforese ocorreu em gel de agarose 2,0%, preparado conforme SAMBROOK (1989). Foi adicionado 5 μ L de brometo de etídio [10 mg/mL] para cada 100 mL de gel, o volume preparado variou conforme o número de amostras analisadas.

A eletroforese foi iniciada com uma voltagem de 40 V e após as amostras terem

penetrado no gel a voltagem foi aumentada para 100V. O tampão utilizado foi TBE 1X. Após aproximadamente 30 minutos, eletroforese foi interrompida e o gel foi submetido à visualização em transiluminador de luz UV (Ultra-Violeta) para verificar se tinha ocorrido amplificação das amostras. Aquelas que se apresentavam amplificadas foram separadas para serem submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida. As amostras não amplificadas foram desprezadas e oportunamente foi realizada nova amplificação a partir da alíquota de DNA estoque.

Antes de realizar a eletroforese em poliacrilamida, as amostras foram analisadas em agarose para certificar se haviam sido amplificadas (figura 3).

Figura 3: Verificação de resultado de amplificação de microssatélites em gel de agarose 2%, demonstrando três bandas, que correspondem a três locos (Sistema Multiplex). Esse tipo de gel não permite discriminar os alelos. Preparação das placas de vidro para eletroforese em gel de poliacrilamida



A placa maior foi preparada com uma solução repelente (Repel) para prevenir a aderência do gel a esta. A placa menor foi tratada com metacrilóxi-propil-trimetoxissilane para aderir o gel à placa.

As placas foram mantidas separadas para evitar a contaminação cruzada entre elas; identificadas do lado não-tratado com as soluções de aderência e repelente. A placa menor foi tratada todas às vezes antes de ser utilizada e a maior, a cada 3 géis. Para limpeza, foram submersas em solução de hidróxido de sódio 0,2M durante 2h.

Após o que as placas eram enxaguadas em água corrente e, a seguir, com água deionizada. Antes do uso imediato das placas o procedimento realizado era o seguinte:

1) Todas as placas foram limpas com etanol 95% utilizando-se papel toalha antes do uso;

2) Na preparação da placa maior foi aplicado 5 mL de solução Repel sobre a superfície não-identificada. A solução foi espalhada sobre toda a superfície com papel toalha. Após secar durante cinco minutos, foram removidos os excessos com papel toalha úmido com água deionizada e secada com papel toalha seco. Retirado o excesso repetindo o procedimento três vezes;

3) A placa menor foi preparada utilizando uma solução aderente. Essa foi preparada no interior da capela adicionando 3 μ L de metacriloxipropiltrimetoxisilane a 3 mL de ácido acético 0,5% em etanol 95% (15 μ L de ácido acético em 2985 μ L de etanol). A solução foi homogeneizada e aplicada sobre a superfície da placa que não estava identificada. Espalhada a solução com papel toalha sobre toda a superfície. Foi deixado secar durante cinco minutos. As placas foram limpas por três vezes com papel toalha úmida com etanol 95% para remover o excesso da solução de aderência;

4) As placas foram separadas com espaçadores de 0,4 mm colocados entre a placa maior e menor. Inicialmente, os espaçadores foram fixados na extremidade com fita. Foram colocados grampos de metal no meio e em uma das extremidades para manter os espaçadores no lugar. O gel em fase líquida era colocado sobre a superfície da placa maior, à medida que o gel era adicionado à superfície da placa maior, este era espalhado com a placa menor sendo empurrada contra a maior, e de maneira rápida e sem levantar para evitar a formação de bolhas.

3.12. Preparação de gel de poliacrilamida

Para a realização da eletroforese foi preparado gel de poliacrilamida devido ao seu elevado nível de resolução para fragmentos na faixa de 100 até 1000 pb. Como foi utilizada uma cuba de eletroforese própria para seqüenciamento manual e análise de polimorfismos de microssatélites e minissatélites, o volume final de gel preparado para cada placa foi de 75 mL para uma dimensão de 31,0 cm de largura, por 38,5 cm de altura e 0,4 mm de espessura.

A preparação do gel com característica desnaturante e concentração a 4% foi com 7,50 mL de solução de acrilamida:bis-acrilamida 40% (19:1), 3,75 mL de TBE 10X, 31,5 g de Uréia e q.s.p para 75 mL com água miliQ.

A preparação do gel com característica desnaturante e concentração a 6% foi com

11,25 mL de solução de acrilamida:bis-acrilamida 40% (19:1), 3,75 mL de TBE 10X, 31,5 g de Uréia e q.s.p para 75 mL com água miliQ.

A preparação do gel com característica desnaturante e concentração a 8% foi com 15 mL de solução de acrilamida:bis-acrilamida 40% (19:1), 3,75 mL de TBE 10X, 31,5 g de Uréia e q.s.p para 75 mL com água miliQ. Todas as soluções foram misturadas e homogeneizadas tomando-se cuidado para não ocorrer a formação de bolhas no momento de aplicar o gel sobre a placa de vidro. Para ocorrer a polimerização de cada gel foi adicionado 40 μ L de TEMED e 400 μ L de persulfato de amônio 10% preparado no momento de utilizá-lo, sendo que o tempo médio para essa reação foi de 2 h.

Após a polimerização e remoção dos grampos, as placas foram colocadas na cuba de eletroforese. A câmara superior foi preenchida com aproximadamente 700 mL e a inferior com aproximadamente 300 mL do tampão de corrida TBE 1X. Cuidadosamente, os pentes foram colocados, sendo removidas as impurezas utilizando uma pipeta de 1,0 mL.

As condições de pré-corrída foi de uma potência inicial de 60W, durante 10 minutos.

3.13. Preparação das amostras

A preparação das amostras foi de 3,0 μ L do produto de PCR e 3,0 μ L do tampão de amostra (loading buffer). Em média a cada 10 amostras foi utilizado 1,5 μ L de escada alélica misturada a 1,5 μ L de tampão de amostra.

3.14. Eletroforese

Foram utilizados géis desnaturante 6%, sendo que foi aplicado uma potência inicial de 80W durante 5 min. até as amostras entrarem no gel, logo após a potência foi reduzida para 40W. O tempo de corrida foi em média de 55 min.

3.15. Coloração com Nitrato de Prata

A coloração do DNA por nitrato de prata é um método considerado rápido e sensível (BASSAM *et alli* 1991). Logo após o término da eletroforese as placas contendo o gel eram colocadas em repouso por alguns minutos para as placas esfriarem, sendo que a seguir estas desmontadas e colocadas em uma solução de fixação com ácido acético 10%.

Foi utilizada para coloração uma solução de prata 0,1% (2,0 g de nitrato de prata em 2000 mL de água).

Imediatamente antes do uso, adicionou-se 3 mL de formaldeído e 400 μ L de tiosulfato de sódio (10mg/mL) à solução de revelação (60g de carbonato de sódio em 2000 mL de água), a qual estava guardada em geladeira entre 4 °C e 8 °C.

Assim que as placas foram separadas a placa pequena contendo o gel aderido sobre sua superfície foi colocada no interior de uma bandeja de plástico contendo a solução fixadora de ácido acético 10% e mantida em um agitador orbital durante 20 min ou, se necessário, durante a noite. Em todos os passos houve necessidade de leve agitação.

O gel foi lavado com água durante 2 min, essa etapa foi repetida por 3 vezes, descartando todas às vezes a água utilizada. Após o descarte da última água adicionada, foi colocada a solução de coloração de prata; o gel foi, então, deixado em uma sala escura de fotografia durante 30 min, após o que a solução de coloração foi descartada em um recipiente para coleta de material tóxico. A reação da solução com o gel foi interrompida com água, tendo sido lavado brevemente durante 5 a 10 segundos, sendo em seguida colocada à solução reveladora, e o gel mantido novamente em uma sala escura de fotografia; o gel ficou em agitação em plataforma orbital até as bandas correspondentes aos alelos aparecerem, tendo isso ocorrido em média entre 2 e 5 min.

A solução reveladora foi substituída por solução de fixação e o gel foi aí mantido por pelo menos durante 5 minutos, antes de ser colocado em água.

Outro método de coloração com prata e revelação com NaOH foi utilizado:

- 1 – solução fixadora – 10% etanol, 0,5 % ácido acético por 3 minutos
- 2 – solução fixadora + 0,2% de nitrato de prata (2 g/l) por 5 minutos
- 3 – Lavar uma vez, por 20 segundos e 1 vez por 1 minuto em água mQ
- 4 – solução reveladora (3% NaOH + 0,5% formaldeído) até aparecer bandas (cerca 5 minutos)
- 5 – solução fixadora pro 5 minutos
- 6 – H₂O por 10 minutos

Solução Fixadora (500 ml)

50 ml etanol

2,5 ml de ácido acético glacial

447,5 ml de H₂O mQ

Solução Fixadora + Prata (250 ml)

25 ml de etanol

1,25 ml de ácido acético

223,7 ml H₂O mQ

0,5 g de AgNO₃ (prata) - adicionar por último

Solução Reveladora

7,5 g NaOH

248,75 ml de H₂O mQ

1,25 ml de formaldeído – colocar por último

3.16. Técnica de hemocultura

Para a realização da hemocultura, primariamente será dividida em duas etapas: a primeira a da coleta do material e a segunda o cultivo da amostra em culturas específicas para os agentes etiológicos.

Primeiramente, a técnica da coleta é subdividida em seis etapas, como abaixo, seguindo-se (ELMOR et al, 2012):

- 1) Identificação no frasco contendo o nome do paciente, leito, hora, data e sítio anatômico da coleta, imediatamente ao procedimento.
- 2) Escolher o melhor local de punção para a coleta de sangue, levando em consideração acessibilidade do sítio anatômico, estado geral do paciente e ausência de comorbidades cutâneas no local do procedimento.
- 3) Fazer a antissepsia, preferencialmente, com clorexidine alcoólico 0,5%, friccionando a pele em círculos semi-abertos a partir do ponto a ser puncionado e em direção as bordas, de forma contínua. Deixar secar por 30 segundos.
- 4) Colocar o garrote e puncionar a veia mais calibrosa e menos móvel. Em seguida soltar o garrote. Isso pode ser realizado com uma seringa ou dispositivo para coleta a vácuo, tomando cuidado para não tocar diretamente no local de punção.
- 5) Coletar, preferencialmente, 1 a 4ml de sangue (crianças) para cada frasco.
- 6) Transferir a amostra coletada para os frascos de hemocultura, colocando o sangue no frasco anaeróbio (sem troca de agulhas).

4. DISCUSSÃO E RESULTADOS

No que concerne o quadro clínico, (TABELA 1) dos pacientes analisados observamos que 76% apresentaram tosse e 72% apresentaram febre, o que, por sua vez, corrobora com o que foi proposto por MICHELOW et al. Durante o exame de inspeção do aparelho respiratório foi observado que 68% dos pacientes apresentaram taquipneia e a dispneia como as alterações semiológicas de maior frequência. No quesito desconforto respiratório reconhecido por: retração intercostal; utilização da musculatura acessória e batimento de asa de nariz, somente 22% dos pacientes foram acometidos. Além disso, vômitos e diarreia presentes em 4% dos pacientes, também, foi ao encontro do preconizado por BRAMAN sendo esses os sintomas menos usuais.

Tabela 1

QUADRO CLÍNICO							
Idade	Tosse	Febre	Vômitos/ Diarreia	Desconforto Respiratório	Taquipneia/ Dispneia	Queda de Estado Geral	Saturação < 95%
0-1	9 (18%)	9 (18%)	1 (2%)	4 (8%)	9 (18%)	4 (8%)	3 (6%)
1-2	11 (22%)	10 (20%)	1 (2%)	6 (12%)	9 (18%)	1 (2%)	2 (4%)
2-3	6 (12%)	7 (14%)	0	5 (10%)	4 (8%)	4 (8%)	0
3-4	3 (6%)	2 (4%)	0	3 (6%)	3 (6%)	2 (4%)	1 (2%)
4-5	3 (6%)	3 (6%)	0	3 (6%)	3 (6%)	2 (4%)	1 (2%)
5-6	0	1 (2%)	0	0	1 (2%)	1 (2%)	0
6-7	0	0	0	1 (2%)	1 (2%)	0	0
7-8	0	0	0	0	0	0	0
8-9	4 (8%)	2 (4%)	0	0	2 (4%)	2 (4%)	0
9-10	0	0	0	0	0	0	0
10-11	2 (4%)	1 (2%)	0	0	1 (2%)	0	0
11-12	0	1 (2%)	0	0	1 (2%)	0	0

Durante a fase da ausculta do aparelho respiratório (TABELA 2) o murmúrio vesicular foi identificado como diminuído em 38% dos pacientes. Enquanto as alterações nos ruídos adventícios foram: 34% de crepitações; 22% de sibilos e 8% de roncos. Nesse quesito as alterações eram esperadas, mas em uma proporção maior como dito por PARLAFOX. Podemos inferir que essa proporção foi menor devido a dois principais fatores. O primeiro de que a maioria todos os pacientes apresentava uma infecção em um estágio mais início, no qual tais alterações na ausculta seriam menos comuns. O segundo fator seria que essa semiotécnica é examinador dependente o que pode favorecer ou desfavorecer um achado.

Tabela 2

EXAME DO APARELHO RESPIRATÓRIO				
Idade	Murmúrio Vesicular Diminuído	Creptos	Sibílos	Roncos
0-1	4 (8%)	4 (8%)	3 (6%)	2 (4%)
1-2	5 (10%)	3 (6%)	4 (8%)	0
2-3	2 (4%)	3 (6%)	0	2 (4%)
3-4	3 (6%)	4 (8%)	3 (6%)	0
4-5	0	0	0	0
5-6	2 (4%)	1 (2%)	1 (2%)	0
6-7	0	0	0	0
7-8	0	0	0	0
8-9	2 (4%)	0	0	0
9-10	0	0	0	0
10-11	1 (2%)	2 (4%)	1 (2%)	0
11-12	0	0	1 (2%)	0

De acordo com KORPPI as pneumonias bacterianas podem apresentar alterações radiológicas tanto de condensação alveolar quanto de infiltrado intersticial. CARVALHO, por sua vez, descreve na mesma vertente de pensamento que o padrão radiológico pode ser variável e vai além ao afirmar que é influenciado, também, pela idade, possivelmente em decorrência de diferenças nas respostas inflamatórias dos indivíduos mais jovens quando comparados com os mais velhos. Sendo assim, a presença de sinais radiológicos como infiltrado intersticial, derrame pleural e condensação alveolar podem ser vistos como tendo associação com etiologias bacterianas, mas a ausência deles não significa que a etiologia não seja bacteriana. Nossos dados (TABELA 3) vão ao encontro desse raciocínio, tendo em vista as alterações radiológicas de 34% de condensações e de 36% de infiltrados. Confirmando uma pré-disposição a um diagnóstico de pneumonia bacteriana.

Tabela 3

RADIOGRAFIA						
Idade	Condensação	Infiltrado	Derrame Pleural	Derrame Pleural/ Condensação	Derrame Pleural/ Infiltrado/ Condensação	Condensação e Infiltrado
0-1	5 (10%)	5 (10%)	0	1 (2%)	0	1 (2%)
1-2	4 (8%)	6 (12%)	1 (2%)	1 (2%)	0	2 (4%)
2-3	4 (8%)	1 (2%)	0	0	0	0
3-4	1 (2%)	3 (6%)	0	0	1 (2%)	1 (2%)
4-5	1 (2%)	0	1 (2%)	0	0	0
5-6	1 (2%)	1 (2%)	0	0	0	0
6-7	0	1 (2%)	0	0	0	0
7-8	0	0	0	0	0	0
8-9	1 (2%)	0	0	0	1 (2%)	0
9-10	0	0	0	0	0	0
10-11	0	0	0	0	0	0
11-12	0	1 (2%)	0	0	0	0

Quanto à questão da antibioticoterapia (TABELA 4) observamos que 94% dos pacientes não tinham sido submetidos a tratamento. Houve duas situações comumente encontradas que levaram a esse número. Primeiro, os pacientes que se encontravam em um quadro grave de pneumonia e vinham encaminhados de outro hospital do Sistema Público de Saúde do DF ou até mesmo do Brasil, por conseguinte já haviam sido submetido a tratamento por outros médicos. Segundo, os próprios pais ou responsáveis já haviam administrado algum tipo de antibiótico. Durante o dado estudo observamos, então, que a variável de pacientes sem utilizar algum tratamento seria virtualmente impossível visto essas práticas de uso de medicamentos sem orientação pelos pais ou mesmo aquela realizada por outros médicos antes de encaminharem os pacientes.

De acordo com GUSMAN-BLANCO esse artifício de direcionamento do tratamento empírico se deve pelo conhecimento dos patógenos, mais comumente encontrados nas comunidades, que infectam o trato respiratório. Tendo isso em vista foi elencado que cada espécime possui um espectro com sensibilidade e um com resistência. Por exemplo, os pneumococos são resistentes, principalmente, à penicilina e, em menor frequência, aos macrolídeos e ao cotrimoxazol. Sendo esses sensíveis às cefalosporinas de terceira geração. Por sua vez, os *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus agalactiae*, os microorganismo encontrados nesse trabalho são sensíveis à penicilina G cristalina.

Tendo esse último dado em mente observamos que na prática médica do HMIB esse fato acabou não sendo pertinente. Na rotina desse hospital o antibiótico de escolha foi a Ampicilina/Sulbactam com 64% dos pacientes sob seu uso. Isso se deve principalmente pela falta de insumos disponibilizados pelo Sistema de Saúde Público e também pela dificuldade de aquisição desse material no mercado mundial. Isso pode ser averiguado na nota informativa conjunta nº 68/2016 do Ministério da Saúde, dessa forma ficou acordado que a partir de 31 de março de 2017 o uso desse medicamento seria prioritariamente para sífilis seja em adultos ou em recém-nascidos.

Tabela 4

Idade	ANTIBIOTICOTERAPIA PRÉVIA				Nã	TOTAL
	Sim					
	Ceftriaxona/Oxacilina	Amoxicilina/Clavulonato	Ampiciliana/Sulbactam	Outros		
0-1	0	0	10 (20%)	1 (2%)	3 (6%)	14 (28%)
1-2	0	1 (2%)	6 (12%)	3 (6%)	0	10 (20%)
2-3	1 (2%)	0	7 (14%)	0	0	8 (16%)
3-4	1 (2%)	1 (2%)	1 (2%)	0	0	3 (6%)
4-5	1 (2%)	0	3 (6%)	1 (2%)	0	5 (10%)
5-6	0	1 (2%)	1 (2%)	0	0	2 (4%)
6-7	0	0	2 (4%)	0	0	2 (4%)
7-8	0	0	0	0	0	0
8-9	0	1 (2%)	1 (2%)	1 (2%)	0	3 (6%)
9-10	0	0	0	0	0	0
10-11	0	0	1 (2%)	1 (2%)	0	2 (4%)
11-12	0	1 (2%)	0	0	0	1 (2%)
TOTAL	3 (6%)	5 (10%)	32 (64%)	7 (14%)	3 (6%)	50

As figuras 4 e 5 demonstram as amostras amplificadas que foram submetidas a processo de digestão com as enzimas de restrições *Hae III*, *Mnl I*, *Alu I*, *Dde I* e *BstB I*.

Figura 4: Análise do perfil de digestão com a enzima de restrição *Hae III* do produto de amplificação bacteriano contido no sangue periférico de pacientes com suspeita de pneumonia adquirida na comunidade.

Nota:

Amostra (1) Controle Positivo com DNA bacteriano não digerido com enzima de restrição *Hae III*;

Amostras (3), (5), (7) produto de PCR intacto para os pacientes com 0ano e 6 meses, 2 anos e 6 meses e 8 anos e 0 m;

Amostras (2) e (4) com DNA da bactéria *Neisseria meningitidis* utilizado como controle;

Amostra (6) de paciente demonstrando a presença de *Streptococcus agalactiae*;

Amostra (8) com DNA da bactéria *Streptococcus pyogenes*;

(CP) controle positivo (*Escherichia coli*); **(MM)** marcador de peso molecular (New England Biolabs).

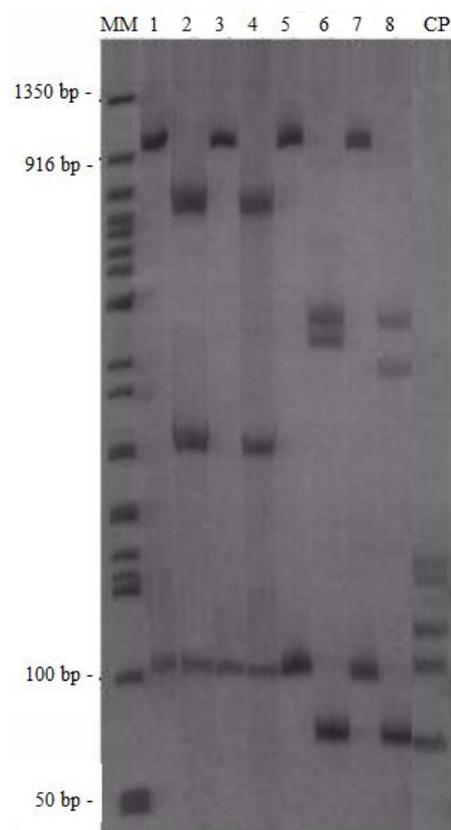


Figura 5: Análise do perfil de digestão com as enzimas de restrições *Mnl*, *Alu I*, *Dde I* e *BstB I* do produto de amplificação bacteriano contido no sangue periférico de pacientes com suspeita de pneumonia adquirida na comunidade.

Nota:

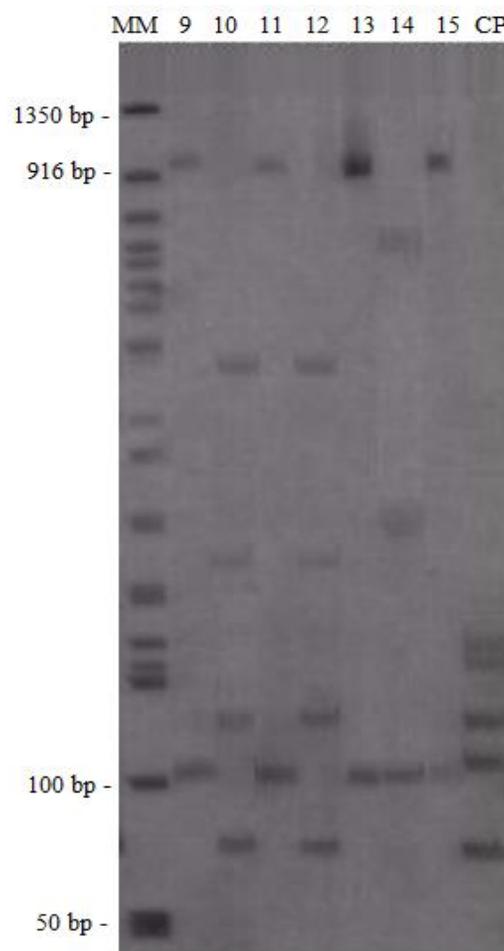
Amostra (9) Controle Positivo com DNA bacteriano não digerido com enzimas de restrições *Mnl*, *Alu I*, *Dde I* e *BstB I*;

Amostras (11), (13) e (15) produto de PCR intacto para os pacientes com 1 ano e 8 meses, 4 anos e 6 meses e 6 anos e 6 m;

Amostras (10) e (12) *Streptococcus pneumoniae*;

Amostras (14) com DNA da bactéria *Neisseria meningitidis* utilizado como controle;

(CP) controle positivo (*Escherichia coli*); **(MM)** marcador de peso molecular (New England Biolabs).



Foi constatado, assim como na literatura, que um dos principais problemas nas emergências hospitalares, quando se trata de diagnóstico de infecções bacterianas, é a falta de eficiência, de rapidez e de especificidade no processo. Isso se deve, principalmente, a não especificidade do quadro clínico e a uma análise laboratorial demorada. Tendo em vista que o padrão-ouro para o diagnóstico das pneumonias adquiridas na comunidade seria a cultura microbiana, o qual, por sua vez, demorou de três a duas semanas para se obter um resultado.

Entretanto, na TABELA 5 ficou evidente que todas as hemoculturas deram negativas. Isso realmente é esperado e condiz com o esperado por ELMO já que ele delimita que para a obtenção de uma amostra positiva de hemocultura deve-se utilizar um frasco para

pacientes pediátricos de até 13 kg e coletar uma ou mais amostras acima desse peso, visto que os contaminantes geralmente crescem somente em mais de uma amostra. Portanto, demonstrando que o número substancial de bactérias necessárias para a discriminação de possíveis contaminantes é verdadeiramente maior do que o realizado no Sistema Público de Saúde.

Além disso, como a maioria dos pacientes estava em vigência de antimicrobianos, as hemoculturas podem ter resultado falso-negativos.

Em contra partida a técnica de PCR/RFLP permitiu um aumento da sensibilidade (detectando menos que 10 organismos por mililitro de sangue) e da rapidez (aproximadamente 48 horas) dos diagnósticos em infecções bacterianas. Apesar da especificidade e da sensibilidade variarem bastante na literatura, estudos feitos por Michelow et al mostraram que estes testes apresentam alta sensibilidade (92%) e especificidade (88%). Nesse presente trabalho como demonstrado nas TABELA 5 e 6, demonstraram que 42% *Streptococcus pneumoniae* e 46% *Streptococcus agalactiae*, ou seja, 88% de resultados positivos para a busca de bactérias. Fato esse que corrobora ainda mais na escolha mais assertiva da técnica de PCR/RFLP em detrimento da hemocultura.

Tabela 5

METODOLOGIA DE DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

Idade	PCR/RFLP		Hemocultura		
	Amplificado		Não amplificado	Positiva	Negativa
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>			
0-1	6 (12%)	7 (14%)	1 (2%)	0	14 (28%)
1-2	3 (6%)	5 (10%)	2 (4%)	0	10 (20%)
2-3	5 (10%)	2 (4%)	1 (2%)	0	8 (16%)
3-4	3 (6%)	0	0	0	3 (6%)
4-5	0	4 (8%)	1 (2%)	0	5 (10%)
5-6	1 (2%)	1 (2%)	0	0	2 (4%)
6-7	0	1 (2%)	1 (2%)	0	2 (4%)
7-8	0	0	0	0	0
8-9	1 (2%)	2 (4%)	0	0	3 (6%)
9-10	0	0	0	0	0
10-11	1 (2%)	1 (2%)	0	0	2 (4%)
11-12	1 (2%)	0	0	0	1 (2%)
TOTAL	21 (42%)	23 (46%)	6 (12%)	0	50

Tabela 6

ANÁLISES MOLECULARES DAS AMOSTRAS				
Paciente (Idade)	Hemocultura	Extração	PCR	RFLP
0 anos e 2 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
0 anos e 2 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
0 anos e 4 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
0 anos e 5 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
0 anos e 6 meses	Negativa	Dna presente	Não Amplificado**	Não digerido***
0 anos e 8 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
0 anos e 8 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
0 anos e 9 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
0 anos e 10 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
0 anos e 11 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
0 anos e 11 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
0 anos e 11 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
0 anos e 11 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
0 anos e 11 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1 ano e 0 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1 ano e 0 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1 anos e 6 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1 anos e 8 meses	Negativa	Dna presente	Não Amplificado**	Não digerido***
1 anos e 8 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1 anos e 8 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1 anos e 8 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1 anos e 10 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1 anos e 10 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1 anos e 11 meses	Negativa	Dna presente	Não Amplificado**	Não digerido***
1 anos e 11 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>

(Continuação da Tabela 6...)

2 anos e 0 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
2 anos e 0 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
2 anos e 5 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
2 anos e 6 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
2 anos e 6 meses	Negativa	Dna presente	Não Amplificado**	Não digerido***
2 anos e 7 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
2 anos e 11 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
3 anos e 4 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
3 anos e 10 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
4 anos e 1 mês	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
4 anos e 3 meses	Negativa	Dna presente	Não Amplificado**	Não digerido***
4 anos e 3 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
4 anos e 5 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
4 anos e 9 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
5 anos e 4 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
5 anos e 10 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
6 anos e 3 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
6 anos e 6 meses	Negativa	Dna presente	Não Amplificado**	Não digerido***
8 anos e 0 meses	Negativa	Dna presente	Não Amplificado**	Não digerido***
8 anos e 3 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
8 anos e 4 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
10 anos e 9 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus agalactiae</i>
10 anos e 11 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
11 anos e 6 meses	Negativa	Dna presente	Amplificado*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Nota:

*Utilizado *primer* de sequência bacteriana universal.

**Havia presença do DNA na amostra. Porém, não houve amplificação deste com a sequência de *primer* universal para bactéria.

***A amostra não foi digerida com as enzimas de restrições Hae III, Dde I, Alu I, Mnl I e BstBI.

5. CONCLUSÃO

A hemocultura, que possui grau de evidência C para diagnóstico etiológico, apesar de ter menor custo e mais fácil acesso, pode apresentar menor sensibilidade e especificidade que a PCR/RFLP, a qual, por sua vez, é mais cara inicialmente devido à infraestrutura e treinamento dos recursos humanos, porém, o custo tende a diminuir após essas etapas serem atingidas, ocorrendo uma diminuição essencial desses dados.

Tendo isso em vista, por muitas vezes a metodologia escolhida é a hemocultura, o que pode comprometer o diagnóstico etiológico da PAC infantil.

Neste trabalho nos 50 pacientes analisados foi verificado que em nenhuma amostra (0 %) teve crescimento bacteriano nas hemoculturas coletadas.

Utilizando a metodologia molecular (PCR/RFLP) nos 50 pacientes foi verificada a presença bacteriana em 44 pacientes (88 %) das amostras, sendo em 21 pacientes (42 %) a presença de *Streptococcus pneumoniae* e 23 pacientes (46 %) de *Streptococcus agalactiae*.

Em 6 pacientes (12 %) não houve alteração do DNA extraído seja por amplificação, seja por restrição enzimática, podendo sugerir desde a ausência de bactéria, assim como, pode existir DNA de outros espécimes, tais como vírus, fungos entre outros.

Além do acesso e da acurácia, o fator tempo até a definição do diagnóstico etiológico é extremamente importante para o prognóstico do paciente, visto que, quanto mais específica e direcionada a terapia for, maior será a probabilidade de resposta do paciente.

Nesse caso a PCR/RFLP possui vantagens sobre a hemocultura, visto que essa última pode demorar até duas semanas. Assim, é importante estabelecer a melhor metodologia diagnóstica do agente etiológico para poder aumentar as chances de bom prognóstico do paciente, além de viabilizar o uso de uma terapêutica direcionada e específica, o que pode favorecer o paciente e diminuir o custo de internações, podendo diminuir a seleção de microrganismos mais resistentes.

Desta forma, ficou evidente que as metodologias moleculares associadas ao quadro clínico dos pacientes podem de forma substancial proporcionar uma rápida e eficaz identificação bacteriana, favorecendo um diagnóstico mais preciso e um tratamento mais específico dessa patologia.

6. REFERÊNCIAS

NEVES, V. T., et al. Perfil epidemiológico de pacientes pediátricos internados com pneumonia. *Scientia Medica*. v.20, p. 277-281, Dec, 2010.

AHMAD, O.B.; LOPEZ, A.D.; INOUE, M. The decline in child mortality: a reappraisal. *Bull World Health Organ.*; v.78, p.1175-1191, 2000.

MONTEIRO, C.A., BENÍCIO, M. H. A. Estudo das condições de saúde das crianças do Município de São Paulo, SP (Brasil), 1984/1985: VI. Doença respiratória. *Rev. Saúde Pública*. v.21, p.380-3866, 1987.

MCINTOSH, K. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med* , v.346, p.429-437, 2002.

GUZMAN-BLANCO, M., CASELLAS, J. M.; SADER, H. S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. *Infect Dis Clin North Am*, v.14, p.67-82, 2000.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico. *Einstein*, 2(2), p. 139, 2004.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P.; SILVA, F. F. PCR em Tempo Real: Uma Inovação da Tecnológica da Reação em cadeia da Polimerase (PCR). *Revista Biotecnologia e Desenvolvimento*. Ed. n.33 – julho/dezembro, 2004.

MICHELOW, I.C., et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing, and urinary antigen detection. *Clin Infect Dis*, v.34(1), p.1-11, 2002.

RODRIGUES J. C., FILHO L. V. F. S., BUSH A. Diagnóstico etiológico das Pneumonias – uma visão crítica. *J Pediatr. Rio de Janeiro*. V. 78, Supl.2, 2002.

MICHELOW, I.C.; et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics*, v.113(4), p.701-707, 2004.

HEISKANEN-KOSMA, T.; KORPPI, M.; JOKINEN, C.; KURKI, S.; HEISKANEN, L.; JUVONEN, H.; et al. Etiology of childhood pneumonia: serologic results of a prospective, population-based study. *Pediatr Infect Dis J.*, v.17(11), p.986-91, 1998.

BRAMAN, S. S. Chronic cough due to acute bronchitis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. v.129(1 Suppl), p.95S-103S, 2006.

PALAFOX, M.; GUISCAFRE, H., REYES, H.; et al. Diagnostic value of tachypnoea in pneumonia defined radiologically. *Arch Dis Child*. V.82(1), p.41–45, 2000.

Korppi M, Kiekara O, Heiskanen-Kosma T and Soimakallio S. Comparison of radiological findings and microbial aetiology of childhood pneumonia. *Acta Paediatr*. 1993;82(4): 360–3.

Nascimento-Carvalho CM, Alves NN, Athayde LA, Caldas RM, Barberino MGMA, Duarte J, et al. Is there any association of a specific chest x-ray pattern and bacteremia in children with pneumonia? *J Trop Pediatr*. 2002;48(4):253–4.

THOMSON JR, R. B.; EVANS B.L.; SOUTHERLAND J.L. Collecting of Blood Culture. *Generalist Microbiology Tech Sample N°G-1*. American Society of Clinical Pathologist, Northfield, Ill, 1991.

LI, J.; PLORDE J.J.; CARLSON L.C. Effects of volume and periodicity on blood cultures *J. Clin. Microbiol.* Vol.32, p.2829-2831, 1994.

DUNNE, W. M.; LAROCCO. Blood culture systems. In: Cimolai, N. (ed.), *Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections*. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y. 2001.

CAMPBELL, J.; WASHINGTON II J.A. Evaluation of the necessity for routine terminal subcultures of previous negative blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* vol.12, p.576-587, 1980.

GILL, V.J. Lack of clinical relevance in routine terminal subculturing of blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 14, p.116-118, 1981.

WASHINGTON, J.A.; II. Bloodcultures: principles and techniques.. *Mayo Clin. Proc.* vol.50, p.91-98, 1975.

MELO, M. R. et al. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. *J Bras Patol Med Lab*, v. 46, n. 5, p. 375-381. Outubro, 2010.

BAREA J. A.,PARDINI M. I. M. C., GUSHIKEN T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* vol.26 no.4 São José do Rio Preto. Outubro, 2004.

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA/ DF-BRASÍLIA. Protocolo de extração de DNA de Sangue Total- Método "Salting Out". Disponível em:<http://164.41.147.224/fs/viromol/images/pdf/protocolos/extracaodnasoutingout.pdf>

COCKERILL, F.R.; WILSON, J.W.; VETTER, E.A.; GOODMAN, K.M.; TORGERSON, C.A.; HARMSSEN, W.S.; SCHLECK, C.D.; ILLSTRUP D.M.; WASHINGTON, J.A.; WILSON W.R. Optimal test parameters for blood cultures. *Clin. Infect. Dis.* vol. 38, p. 1724-1730, 2004

ARAUJO, M. R. E. Hemocultura: Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *J. Infect Control*, São Paulo, vol.1, p.08-19, 2012.

BRYANT, P.A. et al. Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, Specific and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. *Journal of Clin. Microbiol.* v.42, p.2919-25, 2004.

CASTELO, G.B. Meningites e meningoencefalites. In: *Pediatria: pronto-socorro*. São Paulo : Manole, 2009. p.321-328.

DARINI ALC; MAGALHÃES VD & CROTT LSP. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. *Medicina*, Ribeirão Preto, 30: 73-80, jan./mar. 1998.

FEIGIN, R.D. ;MCCRACKEN, G.H. Jr, KLEIN, J.O. Diagnosis and management of meningite. *Pediatric Infect Dis J*. v.11, p.785, 1992.

HOLLOWAY, Y. et al. Minimum number of pneumococci required for capsular antigen to be detected by latex agglutination. *J. of Clin. Microbiol.*, v. 30, p. 517–519, 1992.

KARANIKA, M. et al. Diagnostic clinical and laboratory findings in response to predertermining bacterial pathogen: data from the meningitis registry. *Plos One*, v.4, n.7, p.6426, 2009.

KENNEDY, W.A. et al. Incidence of bacterial meningitis in Asia using enhanced CSF testing: polymerase chain reaction, latex agglutination and culture. *Epid. Infect.* v.135, 2007. 135 p.1217-26, 2005.

KLEIN, J.; FEIGIN, R.D. MCCRACKEN, G.H. JR. Report of the task force on the diagnosis and management of meningitis. *Pediatrics*, v.78, p. 959, 1986.

PETTI, Cathy A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, v.44, p.1108-14, 2007.

RADSTROM, P. et al. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus Influenzae*, and streptococci using a seminested PCR strategy. *J. of Clin. Microbiol.* v.32, p.2738–2744, 1994.

SÁFADI, M.A.P.; FARHAT, C.K. Meningites bacterianas.. *Infectologia pediátrica*. p. 155-179. São Paulo. Atheneu, 2007

TELÓ, E. P. et al. Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de PCR seminested para *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. *RBAC*, v.39, n.3, p.197-200, 2007.

DISTRITO FEDERAL. Nota Informativa conjunta N°68/2016 DDAHV/SVS/MS e DAPES/SAS/MS, Orienta sobre o tratamento de sífilis congênita e neurosífilis em recém-nascidos somente na indisponibilidade de penicilina G cristalina ou potássica. *Diário Oficial do Estado*, Brasília, 19 ago, 2016.

7. ANEXO 1



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
BRASÍLIA- DF - BRASIL

Convidamos o (a) _____, cujo responsável legal é o (a) Sr (a). _____, para participar da Pesquisa *Comparação da Acurácia Entre os Métodos de Diagnóstico Etiológico por Hemocultura e PCR em Pacientes Pediátricos com Pneumonia Adquirida na Comunidade*, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Nivaldo Pereira Alves, a qual pretende definir um método de diagnóstico etiológico mais adequado para pacientes pediátricos com Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC), visto que a acurácia do PCR é maior e seu tempo de resultado é menor em relação ao usualmente utilizado, hemograma.

O paciente com caso clínico suspeito de infecção de vias aéreas inferiores e sem antibioticoterapia será escolhido para coleta de material para realização dos exames de PCR e hemocultura. Com base nos resultados, terá uso de tratamento mais adequado. A realização dos exames não atrasará no início do tratamento.

Além de melhorar o tratamento, os resultados visam uma coleta de dados para reavaliação do perfil epidemiológico e etiológico da PAC no cenário do Hospital Materno Infantil de Brasília - HMIB (visto que atende pacientes de vários estados). Isso, por sua vez, auxiliará na escolha de uma antibioticoterapia mais eficiente e menos onerosa para o estado, visto que, irá definir melhor os agentes causadores da PAC no HMIB.

Sua participação na pesquisa inclui disponibilizar o seu prontuário para verificação dos dados clínicos e epidemiológicos, além da concessão de material biológico (sangue periférico) para realização dos exames laboratoriais hemocultura e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Visto isso, o (a) sr (a) pode modificar a sua decisão de participar, em qualquer momento da pesquisa, se assim o desejar, sem nenhum ônus vinculado a isso.

Para tanto, iremos triar os pacientes em quatro momentos distintos, os quais serviram de pré-requisito para participação na pesquisa. Na primeira etapa de inclusão dos pacientes na pesquisa consiste na faixa etária, ou seja, paciente de 0 dias até 12 anos completos. Esses pacientes serão divididos, portanto, em grupos, segundo suas faixas etárias:

1. Neonatos – até 28 dias
2. Lactentes – de 29 dias até 24 meses
3. Pré-escolares – de 24 meses e um dia até cinco anos
4. Escolares – de cinco anos e um dia até 12 anos

Rubrica do responsável legal do participante _____

Rubrica do pesquisador: _____

Essa distinção será feita para comparar os métodos diagnósticos nas diferentes faixas etárias.

A segunda etapa de inclusão será feita semanalmente no pronto socorro do HMIB, sendo escolhidos aqueles pacientes com anamnese e quadro clínico sugestivo de PAC e virgens de tratamento.

A sintomatologia esperada para inclusão do paciente no estudo deve compreender os seguintes sintomas: em recém-nascidos e lactentes (febre ou hipotermia, tosse seca ou produtiva, falta de ar e dor ao respirar); em pré-escolares e escolares (tosse seca ou produtiva, febre, falta de ar e dor ao respirar por um período de tempo mais prolongado (superiores a 48 horas). Também estão inclusos achados radiológicos, como áreas de enegrecimento dos pulmões ou diminuição de seu tamanho usual. Isso será levado em consideração independente da idade, por ser extremamente útil ao diagnóstico.

A terceira etapa de inclusão será a verificação e a avaliação, por meio da entrevista clínica e exame físico de doenças relacionadas ou não a PAC, por exemplo: crianças com diabetes, pressão alta, alergias, asma ou outras doenças. Esta etapa servirá apenas para a catalogação dos diferentes resultados encontrados.

Por fim, a quarta etapa de escolha do espectro amostral será a realização dos exames de hemocultura e reação de cadeia da polimerase (PCR), confirmando o diagnóstico etiológico de pneumonia adquirida na comunidade (PAC).

Os riscos relacionados com este trabalho são: extravasamento de sangue para a pele, infecção local e espasmo venoso. Todos esses riscos estão relacionados com o método de coleta de uma amostra de sangue periférico através do antebraço, utilizando para tal uma agulha acoplada a uma seringa. A fim de minimizar tais riscos, utilizaremos luvas de procedimento, faremos a antisepsia do local da coleta com álcool 70% e algodão, além de utilizar agulhas, seringas e tubos estéreis. Ao final do procedimento colocaremos um curativo para evitar contaminações do ponto de acesso venoso.

O desfecho primário dessa pesquisa seria a comparação entre os métodos diagnósticos (Hemocultura e Reação de cadeia da polimerase), confirmando a eficácia de cada um dos métodos.

O desfecho secundário seria tanto o tratamento mais direcionado para cada paciente, uma vez confirmado o agente etiológico; quanto os dados adquiridos para a reavaliação do perfil epidemiológico para a pneumonia adquirida da comunidade (PAC).

Todas as despesas tidas com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável/ patrocinador, isto é, o participante da pesquisa não arcará com nenhum custo referente ao estudo.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, e o Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Se você aceitar participar, estará contribuindo para o aperfeiçoamento do conhecimento sobre esta doença, bem como um melhor conhecimento do seu perfil

Rubrica do responsável legal do participante _____

Rubrica do pesquisador: _____

epidemiológico vigente no HMIB e também uma escolha mais segura e específica para o tratamento dessa doença.

Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço SGAS 915, Edifício Office Center Bloco D, Salas 101 e 11 Asa Sul, Brasília/DF. Cep: 70.390-150, pelo telefone (61) 3443-4480, por email: nipeal@gmail.com.

Poderá ainda entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa/FEPECS-SES-DF, SMHN – Quadra-03 – Conjunto A Bloco 1 – Edifício FEPECS, Brasília-DF. CEP: 70710-907, telefone (061) 3325-4955. E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com. Horário de atendimento: período matutino das 8h30 às 11h30.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP UNICEUB, SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar, UNICEUB, Setor Universitário, Brasília/DF. E-mail: comite.bioetica@uniceub.br. Tel: (61)3966-1200. Fax: (61)3966-1511. Horário de atendimento: segunda à quinta-feira das 8h30 às 11h30 - 14h30 às 17h30; quinta e terça feira, das 18h30 às 20h30; sexta-feira: não há atendimento ao público.

Vale ressaltar que o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP é um colegiado multi e transdisciplinar independente que deve existir nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde)

As atribuições do CEP são de papel consultivo e educativo visando contribuir para a qualidade das pesquisas bem como a valorização do pesquisador, que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada.

Consentimento Pós Informação

Eu, _____, portador do documento de identidade _____, responsável legal de _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração no estudo “*Comparação da Acurácia Entre os Métodos de Diagnóstico Etiológico por Hemocultura e PCR em Pacientes Pediátricos com Pneumonia Adquirida na Comunidade*”, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar a minha decisão de participar se assim o desejar.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós. Sendo que cada página deverá conter minha rubrica e a rubrica do pesquisador responsável.

Brasília, DF

Data: ___/___/___

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador Responsável

Rubrica do responsável legal do participante _____

Rubrica do pesquisador: _____

8. ANEXO 2



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB
TERMO DE ASSENTIMENTO
BRASÍLIA- DF - BRASIL

A presente pesquisa se acha *Comparação da Acurácia Entre os Métodos de Diagnóstico Etiológico por Hemocultura e PCR em Pacientes Pediátricos com Pneumonia Adquirida na Comunidade*, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Nivaldo Pereira Alves, médico, com ajuda dos seus alunos, estudantes de medicina, Henrique de Lacerda Pereira, Gustavo Albergaria Brízida Bächtold, Gabriel do Amaral Cavalcante e Matheus Moreno de Oliveira.

Você sabe o que é assentimento? Significa que você concorda com algo. No caso desse documento, significa que concorda em participar dessa pesquisa.

Antes de decidir se quer ou não participar, é importante que entenda o estudo que está sendo feito e o que ele envolverá para você.

Apresentamos esta pesquisa aos seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo sua concordância. Você é livre para fazer parte ou não desta pesquisa, mesmo se seus pais ou responsáveis concordarem. Não tenha pressa de decidir.

Também poderá conversar com seus pais, amigos ou qualquer um com quem se sinta à vontade para decidir se quer participar ou não, e não é preciso decidir imediatamente. Pode haver algumas palavras que não entenda ou situações que você queira que eu explique mais detalhadamente, porque ficou mais interessado(a) ou preocupado(a). Nesse caso, por favor, peça mais explicações.

Natureza, objetivos e procedimentos do estudo

O objetivo dessa pesquisa é saber qual é o melhor exame para definir qual é o microorganismo que está causando a doença que você tem, assim poderemos tratá-lo mais rápido e com menos remédios. Além disso, definir quais os microorganismo mais comuns nessa doença. A sua participação será nos deixar coletar um pouco de sangue e avaliar seus dados do hospital.

A partir dessa amostra de sangue, nós iremos fazer dois exames. O primeiro se chama hemocultura a outra se chama PCR. Além disso, a partir dos seus dados do hospital poderemos ver qual é o perfil de crianças que tem a mesma doença que você e relacionar com os resultados dos exames antes citados. A amostra de sangue que vamos coletar deverá ser pelo braço, serão somente dois ou três pequenos tubos.

Os riscos relacionados com este trabalho são: extravasamento de sangue para a pele e infecção local. Para minimizar esses riscos, vamos utilizar luvas de procedimento, limpar bem o local da coleta com álcool 70% e algodão, além de usar agulhas, seringas e tubos estéreis. Ao final colocaremos um curativo para evitar contaminações do ponto de acesso venoso.

Essa pesquisa vai acontecer no Hospital Materno e Infantil de Brasília, o exame hemocultura vai ser realizado no próprio hospital, porque já é uma rotina. Mas, o exame PCR vai ser realizado em um laboratório particular, porque esse exame precisa de equipamentos e pessoas especializadas que possam fazê-lo.

Rubrica do responsável legal do participante _____

Rubrica do pesquisador: _____

Você não fará nada além do que estamos explicando.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo

Sua participação poderá ajudar que outras crianças tenham seus tratamentos mais rápidos, além de definir quais os microorganismos mais comuns para essa doença.

Sua participação é voluntária, ou seja, você só participa se quiser e, de acordo com as leis brasileiras, não receberá dinheiro nem presentes pela sua participação neste estudo. Ninguém vai cobrar dinheiro de você ou de seus pais/responsável, ou vai tratá-lo(a) mal se não quiser participar. Você poderá deixar a pesquisa a qualquer momento, bastando para isso falar com um dos pesquisadores responsáveis.

Conforme as normas brasileiras sobre pesquisa com a participação de seres humanos, você não receberá dinheiro nem presentes pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade

Seus dados ficarão somente com os pesquisadores e não será permitido o acesso a outras pessoas.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas. Entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador pelo telefone (61) 3443-4480, por email: nipeal@gmail.com.

Poderá ainda entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa/FEPECS-SES-DF, SMHN – Quadra-03 – Conjunto A Bloco 1 – Edifício FEPECS, Brasília-DF. CEP: 70710-907, telefone (061) 3325-4955. E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com. Horário de atendimento: período matutino das 8h30 às 11h30.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP UNICEUB, SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar, UNICEUB, Setor Universitário, Brasília/DF. E-mail: comite.bioetica@uniceub.br. Tel: (61)3966-1200. Fax: (61)3966-1511. Horário de atendimento: segunda à quinta-feira das 8h30 às 11h30 - 14h30 às 17h30; quinta e terça-feira, das 18h30 às 20h30.

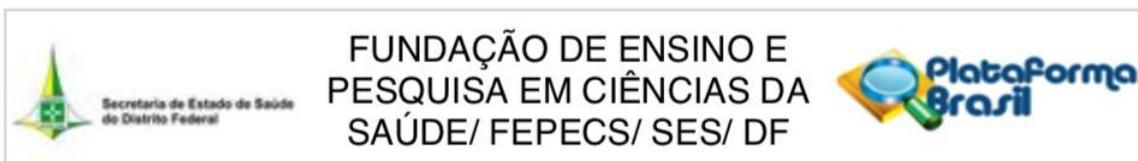
Vale lembrar que o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP é um colegiado multidisciplinar independente que deve existir nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil.

Eu, _____,
 RG _____, (se já tiver o documento), fui esclarecido(a) sobre a presente pesquisa, de maneira clara e detalhada. Fui informado(a) que posso solicitar novas informações a qualquer momento e que tenho liberdade de abandonar a pesquisa quando quiser, sem nenhum prejuízo para mim. Tendo o consentimento do meu(minha) responsável já assinado, eu concordo em participar dessa pesquisa. Os(As) pesquisadores(as) deram-me a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Participante

Pesquisador responsável

9. ANEXO 3



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DA ACURÁCIA ENTRE OS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO POR HEMOCULTURA E PCR EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE

Pesquisador: Nivaldo Pereira Alves

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 63462116.6.0000.5553

Instituição Proponente: Hospital Materno Infantil de Brasília - HMIB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Centro Universitário de Brasília - UNICEUB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.961.013

Apresentação do Projeto:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Objetivo da Pesquisa:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Recomendações:

Pendências anteriores:

1. Elaborar um Termo de assentimento (utilizando uma linguagem muito simples, pois esse será apresentado as crianças que participarão da pesquisa). No TCLE apresentado aos pais ou

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

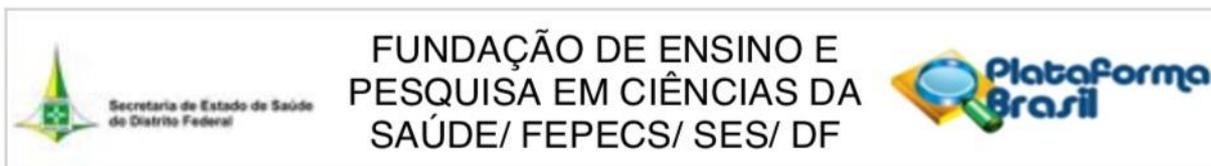
UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.961.013

responsáveis, também evitar termos técnicos da medicina traduzindo-os para uma linguagem compreensível aos pais (ex: taquipnéia, dispnéia, murmúrio vesicular, crepitações e submacicez à percussão podem ser referidas como anormalidades na respiração da criança quando o médico a avalia, ou cansaço, ou chiado no peito, entre outros... Fazer isso em todo o texto apresentado no TCLE). Também acrescentar o contato do CEP FEPECS nesse termo, uma vez que a SES-DF também estará também envolvida no projeto.

2. Pesquisador informa que haverá retenção de amostras para armazenamento em bancos. Se assim for o pesquisador deverá informar na metodologia do projeto: A INTENÇÃO DA COLETA, A INTENÇÃO DO ARMAZENAMENTO APÓS PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO, O PROPRIETÁRIO DA AMOSTRA, O RESPONSÁVEL PELA GUARDA DO MATERIAL BIOLÓGICO, O RESPONSÁVEL PELO GERENCIAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO, O PRAZO DE ARMAZENAMENTO, A INFORMAÇÃO DE QUE HAVERÁ CONSENTIMENTO PARA USO DO MATERIAL BIOLÓGICO (E APRESENTAÇÃO DESSE CONSENTIMENTO NA PLATAFORMA BRASIL) E O COMPROMISSO DE SUBMISSÃO DE PROTOCOLO DE PESQUISA À ANÁLISE DO CEP A CADA NOVA PESQUISA VISANDO ESTUDOS FUTUROS (Resolução CNS nº 441 de 2011, itens 2.II e 6; Portaria MS nº 2201 de 2011, Capítulo II, artigos 5º, capítulo III, artigo 8º e capítulo IV, seção II, artigos 17, 18 e 22)

3. Os riscos devem ser descritos adequadamente conforme a resolução CNS nº 466 de 2012. Eles não devem ser apenas informados, ou seja, o pesquisador também deverá descrever a forma como esses poderão ser minimizados.

Recomendações anteriores:

1. Preenchimento do formulário da plataforma Brasil informa que "HAVERÁ RETENÇÃO DE AMOSTRAS no campo de conclusões.
2. No orçamento indica-se que "os materiais necessários para a PCR foram custeados pelo UniCeub através do seu financiamento para o PIC e os equipamentos e mão de obra especializada para realização da técnica será feita pelo laboratório Tecnogene Diagnósticos Moleculares". Nesse caso, apresentar também o termo de Co-participação do UNICEUB assim como se fez com o Termo apresentado pelo Laboratório Tecnogene. No entanto, se o UNICEUB for a instituição proponente e a SES a instituição Co-participante, corrigir o formulário da plataforma Brasil, pois nesse se indica o UNICEUB como instituição Co-participante (passando então a ser a proponente).
3. Como haverá recurso financeiro proveniente de fonte externa, corrigir o campo no formulário da plataforma Brasil (uma vez que foi indicado que se trata de financiamento próprio, ou seja, da

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

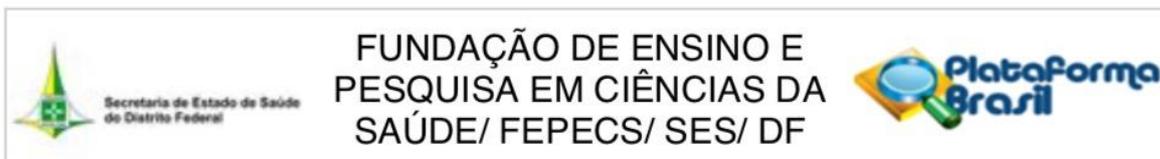
UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.961.013

equipe de pesquisa) PARA ARMAZENAMENTO EM BANCOS". Se assim for, responder as pendências citadas

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Termo de Concordância do UNICEUB como co-participante apresentado
2. Apresentou Termo de assentimento em conformidade com o preconizado pelo sistema CEP-CONEP
3. Novo TCLE foi apresentado e também está em conformidade com o preconizado
4. Informações básicas do projeto foi reavaliada e anexada com as devidas correções.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_823747.pdf	02/02/2017 20:49:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PIC_Pneumonia_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	02/02/2017 20:47:34	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PAC_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	02/02/2017 20:43:27	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Assentimento_PAC_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	02/02/2017 20:43:12	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Declaração do Patrocinador	Termo_de_concordancia_UniCeub_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	02/02/2017 20:40:32	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Outros	Curriculum_Vitae_Nivaldo_Alves.pdf	08/12/2016 21:04:33	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_anuencia_de_coparticipacao.pdf	27/11/2016 18:36:05	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_concordancia_Tecnogene.pdf	27/11/2016 18:35:03	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_do_Pesquisador.pdf	27/11/2016 18:29:48	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	27/11/2016 18:27:08	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_PAC.pdf	16/11/2016	Nivaldo Pereira	Aceito

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

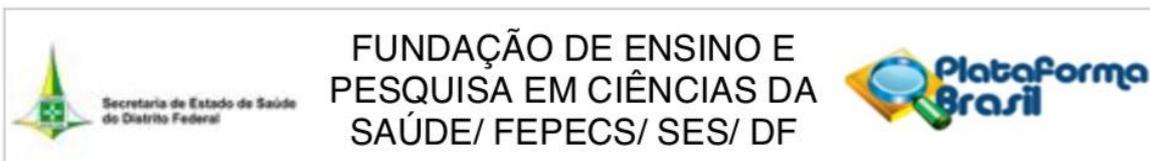
UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.961.013

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PAC.pdf	11:04:10	Alves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MODELO_PIC_2016_Pneumonia_FINA L.pdf	16/11/2016 11:03:29	Nivaldo Pereira Alves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 13 de Março de 2017

Assinado por:
Helio Bergo
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

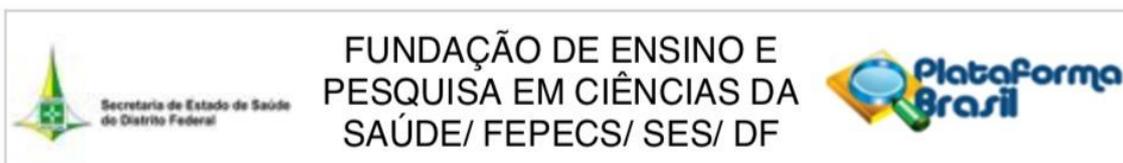
UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DA ACURÁCIA ENTRE OS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO POR HEMOCULTURA E PCR EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE

Pesquisador: Nivaldo Pereira Alves

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 63462116.6.0000.5553

Instituição Proponente: Hospital Materno Infantil de Brasília - HMIB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Centro Universitário de Brasília - UNICEUB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.961.013

Apresentação do Projeto:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Objetivo da Pesquisa:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme Parecer nº: 1.896.815

Recomendações:

Pendências anteriores:

1. Elaborar um Termo de assentimento (utilizando uma linguagem muito simples, pois esse será apresentado as crianças que participarão da pesquisa). No TCLE apresentado aos pais ou

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

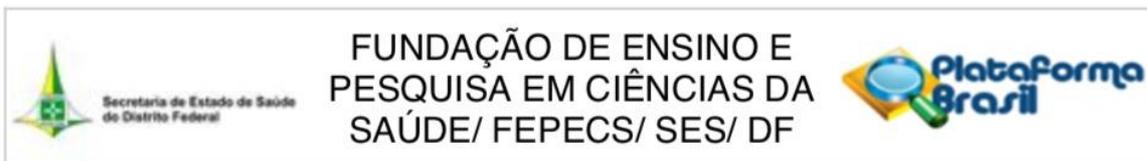
UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.961.013

responsáveis, também evitar termos técnicos da medicina traduzindo-os para uma linguagem compreensível aos pais (ex: taquipnéia, dispnéia, murmúrio vesicular, crepitações e submacicez à percussão podem ser referidas como anormalidades na respiração da criança quando o médico a avalia, ou cansaço, ou chiado no peito, entre outros... Fazer isso em todo o texto apresentado no TCLE). Também acrescentar o contato do CEP FEPECS nesse termo, uma vez que a SES-DF também estará também envolvida no projeto.

2. Pesquisador informa que haverá retenção de amostras para armazenamento em bancos. Se assim for o pesquisador deverá informar na metodologia do projeto: A INTENÇÃO DA COLETA, A INTENÇÃO DO ARMAZENAMENTO APÓS PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO, O PROPRIETÁRIO DA AMOSTRA, O RESPONSÁVEL PELA GUARDA DO MATERIAL BIOLÓGICO, O RESPONSÁVEL PELO GERENCIAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO, O PRAZO DE ARMAZENAMENTO, A INFORMAÇÃO DE QUE HAVERÁ CONSENTIMENTO PARA USO DO MATERIAL BIOLÓGICO (E APRESENTAÇÃO DESSE CONSENTIMENTO NA PLATAFORMA BRASIL) E O COMPROMISSO DE SUBMISSÃO DE PROTOCOLO DE PESQUISA À ANÁLISE DO CEP A CADA NOVA PESQUISA VISANDO ESTUDOS FUTUROS (Resolução CNS nº 441 de 2011, itens 2.II e 6; Portaria MS nº 2201 de 2011, Capítulo II, artigos 5º, capítulo III, artigo 8º e capítulo IV, seção II, artigos 17, 18 e 22)

3. Os riscos devem ser descritos adequadamente conforme a resolução CNS nº 466 de 2012. Eles não devem ser apenas informados, ou seja, o pesquisador também deverá descrever a forma como esses poderão ser minimizados.

Recomendações anteriores:

1. Preenchimento do formulário da plataforma Brasil informa que "HAVERÁ RETENÇÃO DE AMOSTRAS no campo de conclusões.
2. No orçamento indica-se que "os materiais necessários para a PCR foram custeados pelo UniCeub através do seu financiamento para o PIC e os equipamentos e mão de obra especializada para realização da técnica será feita pelo laboratório Tecnogene Diagnósticos Moleculares". Nesse caso, apresentar também o termo de Co-participação do UNICEUB assim como se fez com o Termo apresentado pelo Laboratório Tecnogene. No entanto, se o UNICEUB for a instituição proponente e a SES a instituição Co-participante, corrigir o formulário da plataforma Brasil, pois nesse se indica o UNICEUB como instituição Co-participante (passando então a ser a proponente).
3. Como haverá recurso financeiro proveniente de fonte externa, corrigir o campo no formulário da plataforma Brasil (uma vez que foi indicado que se trata de financiamento próprio, ou seja, da

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

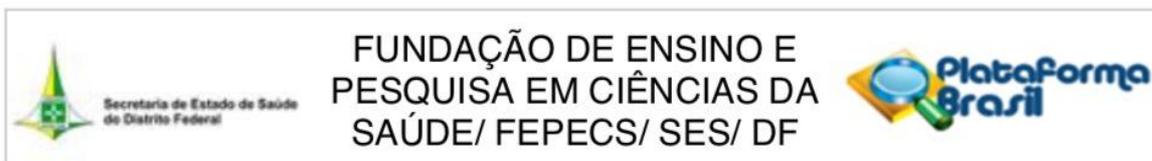
UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.961.013

equipe de pesquisa) PARA ARMAZENAMENTO EM BANCOS". Se assim for, responder as pendências citadas

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Termo de Concordância do UNICEUB como co-participante apresentado
2. Apresentou Termo de assentimento em conformidade com o preconizado pelo sistema CEP-CONEP
3. Novo TCLE foi apresentado e também está em conformidade com o preconizado
4. Informações básicas do projeto foi reavaliada e anexada com as devidas correções.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_823747.pdf	02/02/2017 20:49:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PIC_Pneumonia_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	02/02/2017 20:47:34	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PAC_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	02/02/2017 20:43:27	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Assentimento_PAC_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	02/02/2017 20:43:12	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Declaração do Patrocinador	Termo_de_concordancia_UniCeub_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	02/02/2017 20:40:32	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Outros	Curriculum_Vitae_Nivaldo_Alves.pdf	08/12/2016 21:04:33	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_anuencia_de_coparticipacao.pdf	27/11/2016 18:36:05	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_concordancia_Tecnogene.pdf	27/11/2016 18:35:03	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_do_Pesquisador.pdf	27/11/2016 18:29:48	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	27/11/2016 18:27:08	Nivaldo Pereira Alves	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_PAC.pdf	16/11/2016	Nivaldo Pereira	Aceito

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

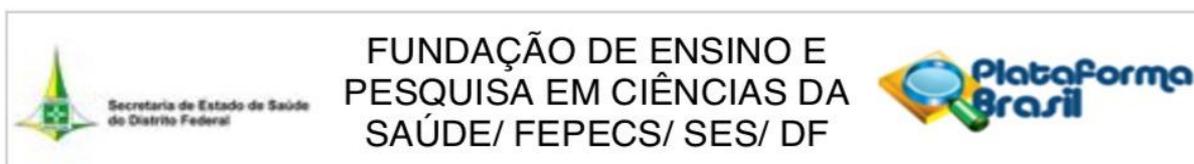
UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.961.013

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PAC.pdf	11:04:10	Alves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MODELO_PIC_2016_Pneumonia_FINA L.pdf	16/11/2016 11:03:29	Nivaldo Pereira Alves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 13 de Março de 2017

**Assinado por:
Helio Bergo
(Coordenador)**

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com