
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA
MESTRADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

Teste das microbolhas estáveis e
contagem dos corpos lamelares no
líquido amniótico para predição da
síndrome do desconforto respiratório
no recém-nascido prematuro.

Gustavo Steibel
gustavosteibel@terra.com.br

Dissertação de Mestrado apresentado à
faculdade da PUCRS para obtenção do
título de Mestre em Medicina,
concentração em Pediatria.

Orientador: Dr. Humberto Holmer Fiori

Porto Alegre, 2008

S818t Steibel, Gustavo.

Teste das microbolhas estáveis e corpos lamelares no líquido amniótico para predição da síndrome do desconforto respiratório no recém-nascido prematuro / Gustavo Steibel; orient. Humberto Holmer Fiori. Porto Alegre: PUCRS, 2008.

80 f.:il. tab.

Dissertação(Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Pediatria.

1. Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém-Nascido/diagnóstico. 2. Doenças do Prematuro/diagnóstico. 3. Surfactantes Pulmonares. 4. Neonatologia. I. Fiori, Humberto Holmer. II. Título.

CDD 618.92011
NLM WS 410

Sabrina Caimi Silva da Costa
Bibliotecária Responsável:
CRB10/1606

Dedicatória

A Nicole, minha alma gêmea.

Aos meus pais, os melhores que poderia ter e os que sempre me serviram de exemplo.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Humberto H. Fiori** pela oportunidade de desenvolver uma dissertação de mestrado, pela sua orientação e pela idéia do projeto de pesquisa que aproximou os serviços de Neonatologia e Obstetrícia.

Ao **Dr. Renato Machado Fiori** chefe do serviço de Neonatologia, meu pediatra quando criança e quem sempre me recebeu com muita atenção.

Aos **plantonistas do centro obstétrico e residentes** que sempre estiveram disponíveis para a coleta dos líquidos amnióticos.

As **enfermeiras e técnicas de enfermagem** que ajudaram nas coletas e identificaram as amostras.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (**CAPES**) pela oportunidade de realizar o mestrado como bolsista.

Ao **Laboratório** de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS, pela ajuda na realização das contagens dos corpos lamelares.

As secretárias **Carla e Ana**, sempre muito prestativas nestes dois anos de mestrado.

As **mães** que participaram da pesquisa e contribuíram com o material de meu estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém-nascido	4
1.2 O Sistema Surfactante	7
1.3 Líquido Amniótico.....	14
1.4 Testes para Avaliação da Maturidade Pulmonar	16
1.4.1 Testes quantitativos	17
1.4.1.1 Contagem de Corpos Lamelares	17
1.4.1.2 Relação entre Lecitina e Esfingomielina	20
1.4.1.3 Dosagem de Fosfatidil-glicerol	21
1.4.1.4 Dosagem da Fosfatidil-colina Saturada	21
1.4.1.5 Dosagens de Proteínas Específicas do Surfactante	22
1.4.1.6 Absorbância do Líquido Amniótico em 650 nm.....	22
1.4.2 Testes qualitativos	23
1.4.2.1 Teste das Microbolhas Estáveis.....	23
1.4.2.2 Teste de Clements	25
1.4.2.3 Teste do Clique	26
1.5 JUSTIFICATIVA	27
1.6 OBJETIVOS	29
1.6.1 Objetivo Geral	29

1.6.2 Objetivos Específicos	29
1.7 REFERÊNCIAS	30

CAPÍTULO II

2 PACIENTES E MÉTODOS	41
2.1 Delineamento	41
2.2 População e amostra	41
2.3 Critério de inclusão	42
2.4 Critérios de exclusão	42
2.5 Tamanho da amostra	43
2.6 Variáveis	43
2.7 Definição operacional das variáveis	44
2.8 Descrição dos procedimentos	46
2.8.1 Contagem dos corpos lamelares	46
2.8.2 Teste das Microbolhas Estáveis	47
2.8.3 Coleta do material	47
2.9 Análise estatística	48
2.10 Aspectos éticos	49
2.11 Referências	50

CAPÍTULO III

(ARTIGO) Português	53
RESUMO	54
ABSTRACT	55
INTRODUÇÃO.....	56
PACIENTES E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS	61
DISCUSSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	68

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES DETALHADAS	73
------------------------------------	-----------

ANEXO

ANEXO I– Termo de consentimento livre e esclarecido.....	75
ANEXO II- Banco de dados dos pacientes.....	78

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1-** Estrutura do alvéolo e da disposição do surfactante na sua superfície. O surfactante é sintetizado, a partir dos seus percussores (1), no retículo endoplasmático (2), transportado pelo aparelho de Golgi (3) até os corpos lamelares (4), onde é armazenado. Os corpos lamelares são secretados para a camada líquida que reveste os alvéolos, onde se transformam em mielina tubular (5). A mielina tubular libera a dipalmitoil-fosfatidilcolina e proteínas hidrofóbicas para a formação da monocamada na interface ar-líquido (6). O surfactante é reutilizado pelos pneumócitos tipo II através da captação dos pequenos agregados celulares (7). Essas vesículas de surfactante são transformadas, pelo endossoma (8), em corpos multivesiculares (9). Esses agregados de fosfolípidios são armazenados nos corpos lamelares (4). Uma pequena fração do surfactante é fagocitada pelos macrófagos alveolares (10). 9
- Figura 2-** Disposição espacial do alinhamento do surfactante na interface ar-líquido, na inspiração e a expiração. 10
- Figura 3-** Corpos lamelares formando mielina tubular em um espaço aéreo (cheio de líquido) de um feto de rato..... 12
- Figura 4-** Representação esquemática do ciclo biológico do surfactante pulmonar. O surfactante pulmonar é sintetizado nos pneumócitos tipo II e estocado em corpos lamelares. Após a excitose, os corpos lamelares formam a mielina tubular. Esta vai formar a monocamada da superfície, responsável por reduzir a tensão
-

superficial. RE= retículo endoplasmático; CL = corpos lamelares;
MT = mielina tubular..... 13

Figura 5- Contagem microscópica das microbolhas. As setas indicam microbolhas com menos de 15 μm 23

Figura 6- Pipeta de Paster e lâmina de Neubauer utilizados na contagem das microbolhas estáveis.....24

Figura 7- Foto de um analisador hematológico Sysmex XT-1800I usado para contagem de Corpos Lamelares. Este aparelho utiliza a Citometria de Fluxo Fluorescente46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1- Variáveis em estudo	43
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1- Características da amostra nos grupos de pacientes com e sem SDR. Resultados expressos em média e desvio padrão nas variáveis contínuas ou em número de pacientes (percentual)	61
Tabela 2- Medidas de desempenho dos testes associados em diferentes pontos de corte	62

LISTA DE ABREVIATURAS

CCL	contagem de corpos lamelares
CL	corpos lamelares
CL/ μ L	corpos lamelares por microlitro
CPAP	continuous positive airway pressure (pressão positiva contínua na via aérea)
DMG	Diabete melito gestacional
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HSL	Hospital São Lucas
IC	Intervalo de confiança
IG	Idade gestacional
L/E	Lecitina/esfingomielina
LA	Líquido amniótico
μ b/ mm^2	microbolhas estáveis por milímetro quadrado
PE	pré-eclâmpsia
PS	Proteína do surfactante
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RN	Recém-nascido
RNPT	Recém-nascido pré-termo
ROC	receiver operator characteristic curve
G-force	(RCF)= $0.00001118 \times$ o raio da centrifuga \times RPM ₂
SDR	síndrome do desconforto respiratório
TME	teste das microbolhas estáveis
UTIN	unidade de tratamento intensivo neonatal

RESUMO

Introdução: à medida que o tratamento profilático ou precoce com surfactante mostrou-se vantajoso nos recém-nascidos prematuros com imaturidade pulmonar, renovou-se o interesse na busca de testes diagnósticos nesta área. A contagem dos corpos lamelares (CCL) e o teste das microbolhas estáveis (TME) no líquido amniótico são exames rápidos e de baixo custo que podem ser realizados durante o trabalho de parto. Possivelmente, o uso combinado destes exames pode aumentar seus desempenhos diagnósticos, porém esta hipótese ainda não foi testada.

Objetivo: avaliar o desempenho do TME e da CCL no líquido amniótico, na predição da síndrome do desconforto respiratório (SDR) em recém-nascidos prematuros.

Métodos: foi coletado líquido amniótico durante a cesárea ou por via vaginal, em partos prematuros ocorridos no Hospital São Lucas da PUCRS no período de março de 2006 a novembro de 2007. A CCL foi realizada logo após a coleta do material pelo contador de plaquetas Sysmex XT-1800I e o TME foi realizado posteriormente, pelo autor, cego para o desfecho. O diagnóstico de SDR foi estabelecido pela apresentação clínica e um raio-x de tórax característico ou por recém-nascido que recebeu surfactante profilático e apresentava uma contagem de microbolhas no aspirado traqueal $< 120 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ e/ou necessitou da segunda dose de surfactante.

Resultados: dos 111 pacientes estudados, 20 (18%) apresentaram SDR. A média do peso foi 2062 ± 639 gramas enquanto que a idade gestacional média foi 32.8 ± 3 semanas. Para um ponto de corte ≤ 12.000 corpos lamelares/ μL a sensibilidade, a especificidade e a razão de verossimilhança positiva da CCL foram 90% (IC95%: 68-99%), 81% (IC95%: 72-89%) e 4.8 (IC95%: 3.2 – 7.4%) respectivamente. Para um ponto de corte ≤ 5 microbolhas/ mm^2 , o TME apresentou uma sensibilidade de 90% (IC95%: 68-99%), uma especificidade de 79% (IC95%: 69-87%) e uma razão de verossimilhança positiva de 4.3 (IC95%: 2.8-6.6%). Usando os testes em conjunto (TME $< 7 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ E CCL ≤ 12000 corpos lamelares/ μL , para definir imaturidade pulmonar), a razão de verossimilhança positiva aumentou para 10.2 (IC95%: 5.2-20.2) e a especificidade aumentou para 91% (IC95%: 83-96%), enquanto que a sensibilidade permaneceu inalterada em 90% (IC95%: 68-99%).

Conclusão: a CCL e o TME no líquido amniótico possuem desempenho diagnóstico similar quando usados em separado para predizer a SDR. O uso combinado dos dois testes pode aumentar a especificidade e a razão de verossimilhança positiva sem modificar a sensibilidade.

Palavras-chave: testes diagnósticos; imaturidade pulmonar; surfactante; prematuridade.

ABSTRACT

Background: There is a renewed interest in very early diagnosis of surfactant deficiency in immature infants as the advantage of indiscriminate surfactant prophylaxis or very early treatment became clear. Lamellar body count (LBC) and stable microbubble test (SMT) in amniotic fluid are quick and inexpensive tests that can be done even during labor or delivery. Its combined use may increase accuracy, although this hypothesis has not been tested yet.

Objective: To evaluate the performance of LBC and SMT in amniotic fluid in order to predict respiratory distress syndrome (RDS) in preterm infants.

Design/Methods: Amniotic fluid was collected during cesarean section or from vaginal pool in preterm births on São Lucas Hospital from March/2006 to November/2007. Lamellar bodies were counted in fresh amniotic fluid using the platelet counter Sysmex XT-1800I, and SMT was performed later in a blind way. The diagnosis of RDS was established by clinical picture and chest X-ray or, alternatively, in those infants that received prophylactic therapy and presents with microbubble count in the tracheal aspirate below 120 microbubbles /mm² or/and needed a second dose of surfactant.

Results: From the 111 patients analyzed, twenty (18%) infants had the diagnosis of RDS. Mean birth weight was 2062 ± 639g and gestational age 32.8 ± 3 weeks. At the cutoff point of ≤12.000 lamellar bodies/μL the sensitivity, specificity and positive likelihood ratio of the LBC were 90% (95%CI: 68-99), 81% (95%CI: 72-89%) and 4.8 (95%CI: 3.2 -7.4 %) respectively. At the cutoff point of ≤5 microbubbles/mm² the SMT showed a sensitivity of 90% (95%CI: 68-99), a specificity of 79% (95%CI: 69-87) and a positive likelihood ratio of 4.3 (95%CI: 2.8 – 6.6 %). Using both tests combined (SMT < 7 microbubbles/mm² and LBC ≤12000 lamellar bodies/μL to define lung immaturity), the positive likelihood ratio and specificity increased to 10.2 (95%CI: 5.2-20.2) and 91% (95%CI: 83-96) respectively, while the sensitivity remained 90% (95%CI: 68-99).

Conclusions: LBC and SMT in the amniotic fluid have similar performance to predict RDS in preterm infants. The combined use of the tests may improve positive likelihood ratio and specificity without change the sensitivity.

Key-words: diagnostics tests; lung immaturity; surfactant; preterm birth

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR), decorrente da deficiência de surfactante pulmonar, acomete recém-nascidos pré-termo, levando a um quadro de insuficiência respiratória progressiva. O tratamento com surfactante pulmonar, principalmente quando usado nos primeiros minutos de vida, está diretamente ligado à melhora do atendimento desses recém-nascidos. Assim, no momento de um parto prematuro, o conhecimento por parte da equipe assistente sobre o grau de deficiência de surfactante no pulmão do recém-nascido torna-se uma informação valiosa para uma assistência neonatal adequada.

Neste contexto, testes rápidos e acurados que determinem a maturidade pulmonar, através da constatação do surfactante presente no líquido amniótico (LA), tornam-se ferramentas importantes no manejo do recém-nascido pré-termo. O teste das microbolhas estáveis (TME) e a contagem dos corpos lamelares (CCL) foram desenvolvidos com este fim. Estudos demonstram que

esses testes apresentam desempenho diagnóstico para SDR similar ao de testes consagrados, como a relação lecitina/esfingomielina (L/E) e o teste de Clements.

1.1 Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém-nascido

No início do século XX a aspiração do vérnix era apontada como a causa da SDR. Porém, entre as décadas de 1920 e 1950 descreveu-se melhor a fisiopatologia da doença, através dos estudos de Neegard, Pattle e Clements, que destacaram a importância da tensão superficial alveolar no processo respiratório, e de Avery e Mead, que salientaram a importância de substâncias surfactantes para a ventilação alveolar, estabelecendo os fundamentos fisiopatológicos da SDR reconhecidos até os dias de hoje.¹

A SDR afeta quase que exclusivamente os prematuros, sendo que quanto menor a idade gestacional, maior a prevalência da doença.² Aproximadamente 2/3 dos recém-nascidos com idade gestacional inferior a 30 semanas apresentam a SDR,³ que raramente acomete recém-nascidos a termo. Além da prematuridade, a diabetes materna⁴ e a cesariana sem trabalho de parto⁵ aumentam o risco da ocorrência da SDR. Em contrapartida, o uso de corticóide pré-natal atua como principal fator protetor.^{6, 7}

A SDR apresenta-se como um quadro de insuficiência respiratória progressiva: a deficiência de surfactante pulmonar, juntamente com um pulmão estruturalmente imaturo e uma caixa torácica complacente, desencadeia um processo que evolui, após o nascimento, para dificuldade ventilatória.² O surfactante pulmonar é fundamental na redução da tensão superficial dos alvéolos e, conseqüentemente, para uma ventilação adequada.⁸ A ausência dessa substância leva a um quadro de colapso alveolar, sendo que a atelectasia progressiva ocasiona hipóxia tecidual e acidose sistêmica. Subseqüentemente, ocorre extravasamento de proteínas séricas para dentro do alvéolo, as quais inibem mais ainda a produção e a função do surfactante, lesando o epitélio responsável por sua produção e pelas trocas gasosas. Desse modo, estabelece-se um círculo vicioso que culmina em falência respiratória.⁹ Os achados anátomo-patológicos classicamente descritos em prematuros com SDR mostram atelectasia difusa, alguns alvéolos dilatados, presença de membranas eosinofílicas e lesão epitelial evidente nos bronquíolos terminais.¹

O diagnóstico de SDR é feito geralmente nas primeiras horas de vida, pela presença de um quadro de sofrimento respiratório progressivo em um recém-nascido prematuro, associado a um raio-X de tórax compatível. Critérios laboratoriais como hipóxia, hipercapnia e acidose metabólica usualmente não são necessários para a confirmação diagnóstica. O quadro clínico inclui taquipnéia, batimento de asas de nariz, retrações da caixa torácica, gemido expiratório e cianose. Os sinais de hipertensão pulmonar muitas vezes fazem parte do quadro clínico, e a evolução para falência respiratória pode ocorrer em

poucas horas. Radiologicamente, a síndrome caracteriza-se por infiltrado retículo-granular difuso, broncogramas aéreos e, na maioria dos casos, diminuição do volume pulmonar.^{2, 9} O diagnóstico diferencial da SDR na prática médica pode ser desafiador, uma vez que pneumonia, sepse, taquipnéia transitória, síndrome de aspiração de mecônio e hipertensão pulmonar podem apresentar os mesmos achados. Entretanto, um diagnóstico preciso e rápido é fundamental para um tratamento adequado.^{2, 9}

A evolução típica da SDR descrita acima é atualmente modificada pelo uso precoce de surfactante exógeno e de pressão positiva contínua (CPAP).¹⁰ O primeiro relato de uso exitoso de surfactante exógeno no tratamento da SDR foi publicado por Fujiwara et al. em 1980.¹¹ Desde então, outros estudos evidenciaram diminuição de até 40% na mortalidade quando o surfactante era comparado ao placebo^{12, 13} A resposta ao surfactante pode ser afetada por outras patologias associadas, pela composição do surfactante, ou pelo momento (profilático ou terapêutico) em que a terapia é administrada. Esta última variável têm sido foco dos principais estudos randomizados realizados após 1990.¹⁴⁻¹⁷

O uso terapêutico do surfactante pressupõe o diagnóstico prévio de SDR. Como nessa síndrome ocorre uma atelectasia progressiva, muitas vezes leva algum tempo para que o diagnóstico se torne evidente. Assim, quando o diagnóstico clínico é estabelecido, o surfactante é administrado. A principal vantagem desta modalidade terapêutica é a de que praticamente só os recém-nascidos que realmente necessitam de surfactante são tratados. Por outro lado,

a administração profilática do surfactante evitaria a lesão pulmonar precoce secundária à ventilação deficiente, uma vez que preveniria a atelectasia do alvéolo.¹⁶

Uma metanálise realizada em 2000¹⁸ mostrou uma redução da incidência de pneumotórax, de enfisema intersticial pulmonar e da mortalidade, principalmente nos prematuros abaixo de 32 semanas, quando o surfactante foi usado de modo profilático. Assim, a instilação precoce de surfactante em todos os recém-nascidos com risco de SDR é uma estratégia efetiva, porém de elevado custo e não isenta de riscos. Desse modo, faz-se necessário utilizar testes capazes de identificar os pacientes que se beneficiariam dessa prática. Em nossa UTIN os recém-nascidos com menos de 32 semanas recebem surfactante profilático quando o TME no aspirado gástrico é inferior a 25 $\mu\text{b}/\text{mm}^2$. Esta rotina foi estabelecida conforme os estudos de Fiori et. al.¹⁹ Esse exame demora 20 minutos, em média, para ser realizado e evita a administração desnecessária de surfactante em uma proporção significativa dos recém-nascidos com menos de 32 semanas.

1.2 O Sistema Surfactante

Para que ocorram as trocas gasosas necessárias à sobrevivência humana, é necessária uma grande superfície de contato entre o ar inspirado e o

tecido pulmonar. Assim, durante o processo de formação da árvore brônquica, existe uma contínua segmentação que se inicia na traquéia, segue pelos brônquios e bronquíolos terminais e acaba no alvéolo. Os alvéolos pulmonares são estruturas saculares recobertas de células epiteliais (pneumócitos tipo I) interpostas por células cubóides (pneumócitos tipo II) que, juntamente com a membrana basal e o endotélio capilar, formam a barreira seletiva de ar-sangue dos pulmões.²

O alvéolo é uma estrutura instável devido a uma fina camada líquida presente em sua superfície, que gera uma tensão superficial inversamente proporcional ao diâmetro alveolar. No final da expiração, com o aumento da tensão superficial, o alvéolo tende ao colapso, o que leva à dificuldade de inspiração nos ciclos respiratórios subseqüentes e, em última análise, à insuficiência respiratória.⁸

Entretanto, os pneumócitos tipo II produzem substâncias surfactantes, capazes de diminuir essa tensão superficial alveolar. A palavra surfactante vem do inglês “surfactant” forma reduzida de “surface active agent”.²⁰ A produção de surfactante inicia-se em torno da vigésima semana, porém o processo de maturação pulmonar em seres humanos é muito variável. Essa variabilidade explica, em parte, a maturidade pulmonar vista em alguns prematuros com 26-30 semanas e a imaturidade de alguns recém-nascidos a termo (figura 1).²

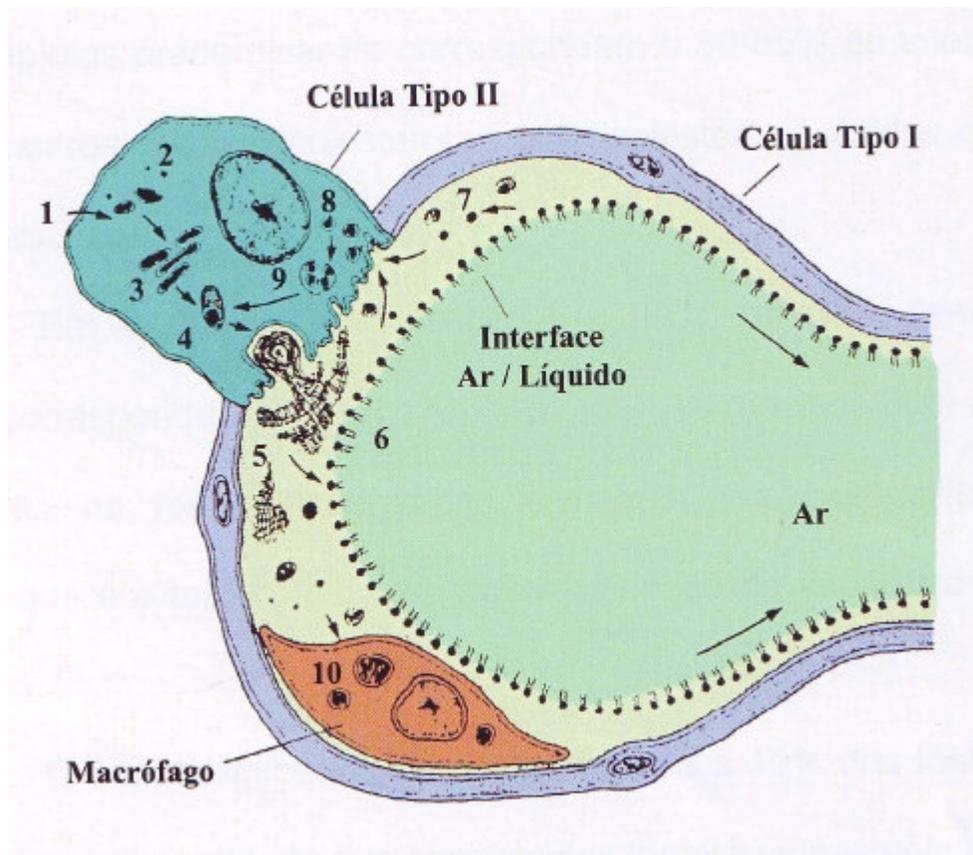


Figura 1 – Estrutura do alvéolo e disposição do surfactante na sua superfície. O surfactante é sintetizado, a partir dos seus percussores (1), no retículo endoplasmático (2), transportado pelo aparelho de Golgi (3) até os corpos lamelares (4), onde é armazenado. Os corpos lamelares são secretados para a camada líquida que reveste os alvéolos, onde transformam-se em mielina tubular (5). A mielina tubular libera a dipalmitoil-fosfatidilcolina e proteínas hidrofóbicas para a formação da monocamada na interface ar-líquido (6). O surfactante é reutilizado pelos pneumócitos tipo II através da captação dos pequenos agregados celulares (7). Essas vesículas de surfactante são transformadas, pelo endossoma (8), em corpos multivesiculares (9). Esses agregados de fosfolipídios são armazenados nos corpos lamelares (4). Uma pequena fração do surfactante é fagocitada pelos macrófagos alveolares (10). (Traduzido e adaptado de Kattwinkel J. Surfactant: Evolving Issues. Clin Perinatol 1998;25: 17-32).

O surfactante pulmonar dos seres humanos é muito potente, e suas moléculas interpõem-se entre as moléculas de água localizadas logo abaixo da superfície alveolar. Esta interposição interfere nas ligações de hidrogênio entre

as moléculas de água, e desta forma, a tensão superficial diminui. Além disso, o sistema não é estático: quando os alvéolos diminuem de volume, o surfactante fica mais concentrado na superfície e a atração entre as moléculas da água diminui, a tal ponto que a tensão superficial aproxima-se de zero, evitando, assim, o colapamento. O inverso ocorre no final da inspiração, quando a tensão superficial é maior, colaborando diretamente com o início do processo de expiração passiva (Figura 2).²¹

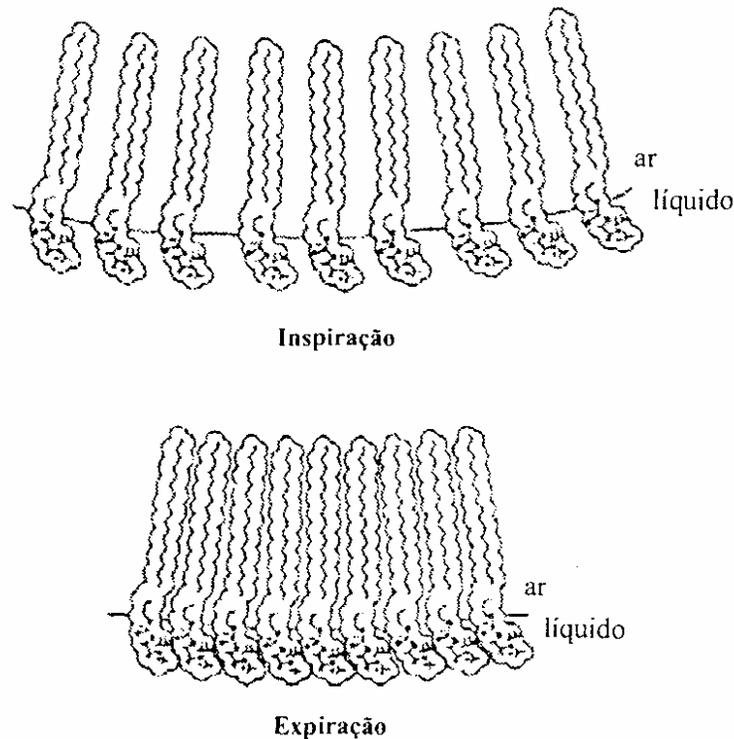


Figura 2 – Disposição espacial do alinhamento do surfactante na interface ar-líquido, na inspiração e na expiração. (Adaptado de Kotas R. Surface tension forces and liquid balance in the lung. In: Thibeault DW, Gregory GA, Chernick V, editors. Neonatal Pulmonary Care. Menlo Park (CA): Addison-Wesley; 1979. p.35-53).

O surfactante pulmonar, produzido principalmente nos pneumócitos tipo II dos alvéolos, é “empacotado” em estruturas chamadas corpos lamelares (CL), cujo diâmetro é de 1-5 μm , semelhante ao das plaquetas. Os CL servem, aparentemente, de reservatórios intracelulares, que vão sendo secretados para a superfície alveolar por exocitose. Acredita-se que o estiramento do alvéolo pela insuflação de ar pode ser um estímulo fisiológico relevante para a secreção dessas organelas.²² Uma vez fora da célula, os CL desenrolam-se para tomar a forma da mielina tubular responsável pela diminuição da tensão superficial dos alvéolos.^{22, 23} Sanders et al.²³ isolaram CL intactos de pulmões de ratos, verificando a sua conversão *in vitro* para mielina tubular (figura 3). Concluíram que os CL são organelas instáveis, que se dissociam rapidamente em mielina tubular a 37°C, sendo que esta dissociação pode ser desacelerada com a resfriamento.

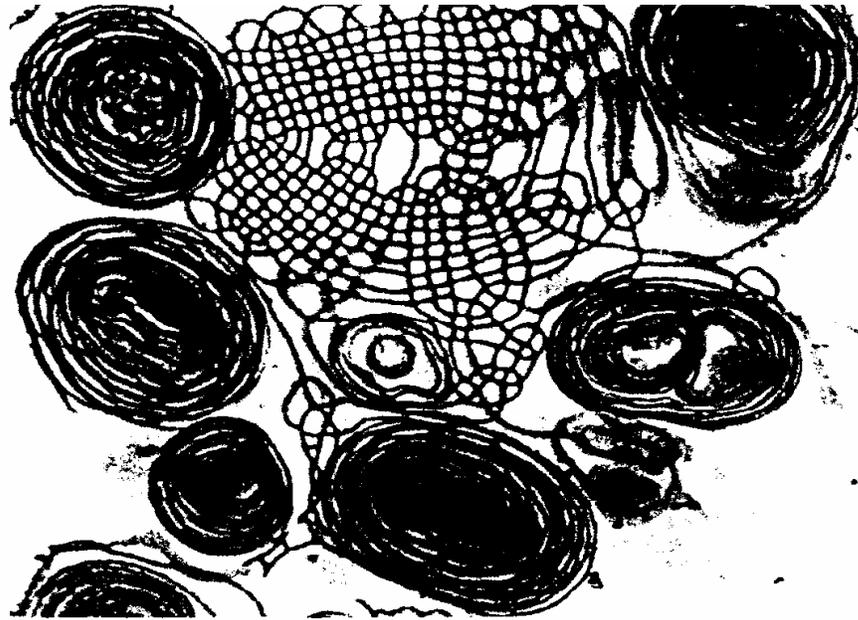


Figura 3 –Corpos lamelares formando mielina tubular em um espaço aéreo (cheio de líquido) de um feto de rato. (Fotografia extraída de Randell SH, Young SL. In: Polin RA, Fox WW (Ed). *Fetal and neonatal physiology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p.1275-83.)

A manutenção do equilíbrio entre surfactante alveolar e CL depende de um complicado equilíbrio entre síntese “de novo”, secreção, reciclagem e depuração (figura 4). Este equilíbrio é atingido de forma diferente no adulto e no recém-nascido: neste último, a maior parte do surfactante alveolar é reciclado. A administração exógena de surfactante pode influenciar a produção de surfactante pela célula, fornecendo substrato para reciclagem ou alterando a síntese “de novo”.²⁴

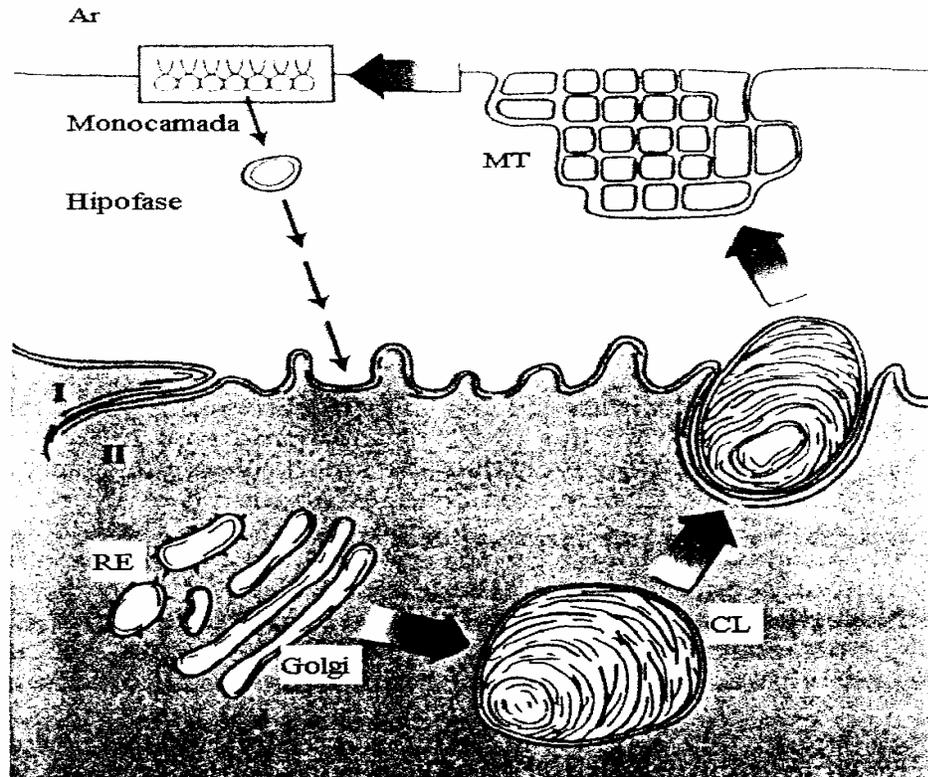


Figura 4 –Representação esquemática do ciclo biológico do surfactante pulmonar. O surfactante pulmonar é sintetizado nos pneumócitos tipo II e estocado em corpos lamelares. Após a excitose, os corpos lamelares formam a mielina tubular. Esta vai formar a monocamada da superfície, responsável por reduzir a tensão superficial. RE retículo endoplasmático; CL = corpos lamelares; MT = mielina tubular. (Traduzido e adaptado de Possmayer F. In: Polin RA, Fox WW (Ed). *Fetal and neonatal physiology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p.1259-75).

Os surfactantes encontrados nos pulmões humanos são compostos principalmente de fosfolípidios (80%), proteínas (10%) e lipídeos neutros (10%). A fosfatidilcolina (lecitina), o fosfatidilglicerol e a esfingomiélna são os fosfolípidios principais. Em relação à fração protéica, são relacionadas pelo menos quatro proteínas, chamadas de Proteínas do Surfactante (PS): PS-A, PS-B, PS-C e PS-D^[25]. As PS-B e PS-C estão mais relacionadas à diminuição da tensão superficial propriamente dita, sendo que a deficiência genética de

PS-B pode levar a um quadro de insuficiência respiratória progressiva invariavelmente letal. As PS-A e PS-D auxiliam no mecanismo de defesa do pulmão e no equilíbrio entre surfactante extracelular e intracelular.²⁵

A produção de surfactante e a maturação pulmonar é afetada por vários hormônios.²⁶ Os glicocorticóides são os principais agentes estimuladores da produção de surfactante de que se tem conhecimento.²⁷ A utilização desses hormônios antes do nascimento têm o objetivo de imitar o efeito dos picos de concentração de corticóide endógeno que ocorrem durante o estresse fetal. Há atualmente um consenso de que o corticóide deve ser administrado para as mães, com raras exceções, antes do nascimento de prematuros com menos de 34 semanas.⁶ Outros hormônios, como o hormônio da tireóide²⁸ e os beta-agonistas,²⁹ têm funções menos definidas, não havendo conhecimento suficiente sobre sua utilidade clínica. A hiperinsulinemia materna pode inibir o efeito do glicocorticóide na maturação pulmonar, tornando os recém-nascidos de mães diabéticas mais susceptíveis à SDR.⁴ Outras substâncias, como plasma, sangue, fibrina e mecônio, quando presentes no espaço alveolar, também podem apresentar efeitos inibitórios sobre o surfactante.^{30, 31}

1.3 Líquido Amniótico

O LA desempenha papel fundamental na manutenção da homeostase fetal, com diversas funções que favorecem o desenvolvimento e o crescimento

do feto. Atua como um amortecedor, protegendo o feto de traumatismos externos, principalmente sobre o abdome materno; permite a movimentação fetal, o que contribui para o seu desenvolvimento; promove o desenvolvimento adequado dos pulmões fetais; funciona como barreira contra infecções; mantém estável e constante a temperatura fetal; e contribui para a nutrição fetal.³²

Ao longo da gestação, os mecanismos de regulação do volume de LA são distintos. Nas fases iniciais, o mecanismo de formação de LA é o transporte ativo de solutos através do âmnio para o espaço amniótico, favorecendo o transporte passivo de água em função da diferença do gradiente químico. Após a vigésima semana, a urina fetal passa a ser a principal fonte. Sabe-se que esse não é um acúmulo estático de líquido, mas uma circulação ativa que sofre renovação em curto espaço de tempo. A manutenção do volume ocorre através das fontes de produção e absorção do LA.³³

Constituem fontes de produção o fluxo intra-membranoso (trocas entre o LA e o sangue fetal), o fluxo transmembranoso (trocas entre o LA e o sangue materno) e a diurese fetal (principal fonte de LA a partir da segunda metade da gestação). Os fluidos pulmonares também contribuem para a formação de LA durante a gestação. Embora os pulmões secretem um volume grande de fluidos a quantidade que chega à cavidade amniótica é de, aproximadamente, 50% da produção, uma vez que, ao deixar a traquéia, parte do fluido é deglutido pelo feto. Parkinson et al.³⁴ encontraram semelhanças nas propriedades das bolhas do LA comparando com as bolhas do fluido pulmonar, sugerindo que o surfactante do pulmão fosse encontrado no LA. Acredita-se que os movimentos

respiratórios intra-útero representem um dos mecanismos responsáveis pela mistura das secreções pulmonares com o LA.³⁵

A absorção do LA ocorre, principalmente, através do trato gastrointestinal, por meio da deglutição fetal. É importante lembrar que o desequilíbrio entre as fontes de produção e de absorção do LA pode resultar em alterações no volume e na composição do LA, diminuindo o desempenho dos testes diagnósticos para maturidade pulmonar na presença de polidrâmnios e oligodrâmnios.³⁶

1.4 Testes para Avaliação da Maturidade Pulmonar

McGinnis et al.³⁷ mostraram que no decorrer da última década houve um declínio na utilização dos testes de avaliação de maturidade pulmonar pré-natal, possivelmente relacionado ao uso de corticosteróide pré-natal, surgimento dos surfactantes exógenos comerciais e melhora da assistência neonatal. Entretanto, os padrões mais recentes de uso de surfactante pulmonar exógeno e a necessidade de identificar precocemente os recém-nascidos que necessitarão do tratamento profilático com o surfactante, renovaram o interesse por testes capazes de prever a imaturidade pulmonar em recém-nascidos pré-termo, através da aferição quantitativa ou qualitativa do surfactante nos diferentes fluidos orgânicos (LA, secreção gástrica e aspirado traqueal).

Ao longo da história, o grande número de exames propostos e testados para esse fim reflete a insatisfação com seu desempenho, relacionada principalmente à baixa especificidade, às dificuldades técnicas e aos custos dos exames. Assim, não há uma clara definição da utilidade prática de cada teste disponível.

Os testes que avaliam a maturidade podem ser agrupados em dois grandes grupos: aqueles que quantificam a presença do surfactante (quantitativos) e aqueles que avaliam a função surfactante indiretamente (qualitativos). A seguir, serão descritos os testes mais conhecidos.

1.4.1 Testes quantitativos

1.4.1.1 Contagem de Corpos Lamelares

A CCL, teste descrito primeiramente em 1989 por Dubin,³⁸ produz uma estimativa objetiva da quantidade de surfactante presentes no LA. O autor mostrou que quanto maior a quantidade de CL presente no LA, maior era a chance do recém-nascido apresentar maturidade pulmonar. Desde então, a CCL no LA tem demonstrado forte concordância com os testes mais consagrados para avaliar a maturidade pulmonar fetal.

Os CL podem ser contados no microscópio ou no canal de plaquetas da maioria dos contadores eletrônicos de células. Assim, quando realizamos a

contagem de células do LA, o aparelho interpreta os corpos lamelares como plaquetas, devido ao seu tamanho similar. Trata-se de um método rápido, que não requer interpretação subjetiva, e com custo semelhante ao de um hemograma. Como o LA não contém sangue, a totalidade de plaquetas que o aparelho conta refere-se aos CL. No caso de haver sangue no LA, as plaquetas entram na contagem. Alguns estudos dizem que a contaminação com sangue aumentaria falsamente a CCL, outros dizem que diminuiria e outros ainda dizem que não alteraria.

Os resultados dos estudos de Roiz-Hernandez et al.³⁹ sobre a CCL no LA processado no momento do parto foram comparados com a evolução clínica da SDR. O autor encontrou sensibilidade de 92,3% e especificidade de 70,9%. A área sob a curva ROC foi 0,883, mostrando ser um bom teste diagnóstico. Ashwood et al.⁴⁰ encontraram um coeficiente de correlação de 0,75 entre relação L/E e CCL. Um estudo multicêntrico, com diferentes pontos de corte, enfatizou a capacidade do teste em definir a ausência de SDR (alto valor preditivo negativo).⁴¹ Dalence et al.⁴² sugerem a associação da razão lecitina/esfingomielina para a identificação da imaturidade pulmonar nos casos em que a CCL ficar entre 10000 e 30000 CL/ μ L. Uma metanálise em 2001⁴³ indicou que a CCL no LA tem um desempenho similar ao relação L/E para predizer o desenvolvimento de SDR. Esse estudo considerou a CCL como um teste de primeira escolha na avaliação da maturidade pulmonar fetal, por ser um teste mais rápido e mais barato que a relação L/E. Outra possível vantagem da utilização da CCL foi demonstrada por De Roche et al.⁴⁴ Estes autores

utilizaram a CCL em pacientes com gestação complicada por diabetes mellitus e encontraram números de CL similares aos encontrados em gestações sem diabetes. Esses resultados sugerem que a CCL possa ser utilizadas em gestações complicadas por diabetes, o que não acontece com a relação L/E.

O desempenho similar em diferentes estudos, da predição da SDR pela CCL, sugere uma boa reprodutibilidade do método, porém os pontos de corte utilizados podem variar. Assim, cada laboratório deve estabelecer o melhor ponto de corte, de acordo com o contador de plaquetas utilizado para aumentar o poder discriminatório do exame.⁴¹

A centrifugação das amostras antes da CCL é motivo de controvérsia. Dubin³⁸ acredita que a centrifugação não alteraria significativamente os resultados do exame. Já Neerhof et al.⁴¹ sugerem que quanto maior o tempo de centrifugação menor seriam as contagens dos corpos lamelares. No estudo de Dubin,³⁸ a adição de sangue hemolisado aumentou a CCL em menos de 1.000 CL/ μ L; em contrapartida, Ashwood et al.⁴⁵ verificaram que a adição de sangue total às amostras reduziu significativamente o número de corpos lamelares. Neerhof et al.⁴¹ consideram bifásica a contaminação da amostra com sangue: nos primeiros minutos haveria um aumento do número de CL devido à presença de plaquetas, e após algumas horas haveria um coagulação da amostra, que uniria as plaquetas aos CL e, conseqüentemente, reduziria a CCL.

Quanto ao armazenamento, Dubin³⁸ sugere que amostras de LA poderiam ser armazenadas em temperatura ambiente por pelo menos 3 dias e

ainda ofereceriam precisão na CCL. Esses resultados não concordam com o estudo de Sanders et al.²³ realizado in vitro, onde os CL mostraram-se muito instáveis, dissociando-se em um período de minutos a poucas horas, mesmo em baixas temperaturas.

1.4.1.2 Relação entre Lecitina e Esfingomielina

Introduzido em 1971, a relação L/E passou a ser o teste de maturidade pulmonar mais aceito e o mais freqüentemente utilizado antes do surgimento da CCL. O estudo de Gluck et al.⁴⁶ sugeriu que o aumento da concentração de lecitina em relação à esfingomielina era indicativo de maturidade pulmonar. A relação entre os dois permite uma avaliação do surfactante que não depende do volume de LA.⁴⁷

Outros estudos avaliaram a acurácia desse teste no LA para predição de SDR.^{48,49} A maior dificuldade de interpretação ocorre com valores intermediários, o que se constitui um problema, especialmente nos recém-nascidos mais prematuros, que não costumam ter relações L/E elevadas.⁵⁰ Portanto, um considerável número de pacientes prematuros pode apresentar exames positivos para imaturidade pulmonar e não desenvolver a SDR. Outras dificuldades são provocadas pela presença de sangue ou mecônio, tempo

prolongado de realização do exame, custo elevado e necessidade de contar com pessoal treinado para a sua realização.⁵¹

1.4.1.3 Dosagem de Fosfatidil-glicerol

O fosfatidil-glicerol (FG) é um marcador do surfactante maduro e pode ser dosado através de cromatografia de camada fina. A presença deste fosfolípido no LA é quase uma confirmação de maturidade pulmonar. Entretanto, sua ausência não está relacionada à imaturidade na mesma proporção. Segundo Garite et al., este teste possui sensibilidade discretamente superior aos demais testes de maturidade pulmonar, mas com um elevado número de falsos positivos (baixa especificidade). Contaminantes, como sangue e mecônio, alteram pouco o resultado do exame.⁵²

1.4.1.4 Dosagem da Fosfatidil-colina Saturada

A fosfatidil-colina saturada (FCS) é o principal componente do surfactante e é encontrada em concentrações muito baixas em outros fluidos orgânicos que não o LA. A sua dosagem parece uma escolha lógica para a

avaliação da presença de surfactante. Quando comparada à razão L/E o teste mostrou-se mais acurado para o diagnóstico de SDR, segundo Alvarez et al.⁵³ Entretanto, sempre houve dificuldades no desenvolvimento de uma técnica simples e barata para quantificação deste componente.

1.4.1.5 Dosagens de Proteínas Específicas do Surfactante

As dosagens de proteínas específicas do surfactante também foram propostas para a avaliação do estado de maturidade pulmonar. Métodos como imunoenensaio foram descritos para dosar as apoproteínas PS-A e PS-B. A dosagem da PS-A tem acurácia aceitável, mas acrescenta pouco quando associada aos resultados das dosagens mais tradicionais (L/E + FG), além de tratar-se de um exame de custo elevado.⁵⁴

1.4.1.6 Absorbância do Líquido Amniótico em 650 nm

Este teste necessita de pessoal treinado e é sujeito à falta dos corantes específicos, tornando-o inviável em alguns serviços. Além disso, apesar da sensibilidade ser comparável à da L/E,^{55, 56} a pouca especificidade também é uma limitação do teste de Absorbância do Líquido Amniótico em 650nm.

1.4.2 Testes qualitativos

1.4.2.1 Teste das Microbolhas Estáveis

O TME foi desenvolvido por Pattle et al.⁵⁷ e apóia-se na capacidade das secreções que contêm surfactante de formar bolhas estáveis com menos de 15 micrômetros (figura 6). Após formar bolhas em uma lâmina de Neubauer através de agitação em uma pipeta de Pasteur (figura 7), o número de microbolhas é contado no microscópio.

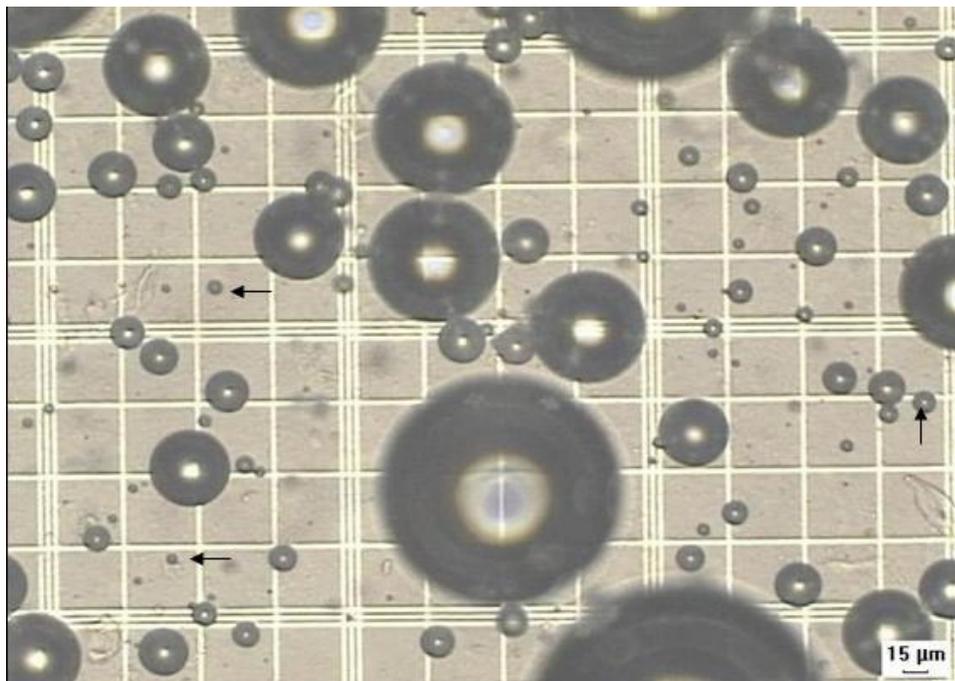


Figura 5 – Contagem microscópica das microbolhas. As setas indicam microbolhas com menos de 15 µm. Reprodução autorizada pelos autores Humberto H Fiori e Manuel A Ruttkey Pereira.



Figura 6 – Pipeta de Pasteur e Lâmina de Newbauer. Reprodução autorizada pelo autor Humberto H Fiori.

O primeiro estudo analisando os resultados do TME no LA em relação à SDR foi publicado em 1979 por Pattle et al.⁵⁷ Neste estudo a realização do teste mostrou-se simples e rápida, sendo que a presença de 20 microbolhas por milímetro quadrado ($\mu\text{b}/\text{mm}^2$) dispensava a determinação da Relação L/E, pois esse ponto de corte mostrou segurança em identificar a maturidade pulmonar. O estudo mostrou que a presença de sangue não alterava os resultados.

Chida et al.^{58,59} compararam o resultado do TME no LA com vários outros testes. Observaram que uma contagem menor que $5 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ no LA apresentava valores preditivos próximos aos obtidos com a relação L/E e com as dosagens de PS-B (acurácia de 83%). Além disso, o TME fornece, rapidamente, após o nascimento, um resultado quantitativo sobre a presença de

surfactante, sendo um teste apropriado para ser usado à “beira do leito”. Em outro estudo de Eckert Seitz et al.⁶⁰ realizado no aspirado traqueal, o TME apresentou elevada sensibilidade (96%) e especificidade (97%) para um corte de 120 $\mu\text{b}/\text{mm}^2$. Neste estudo os RN com TME < 120 $\mu\text{b}/\text{mm}^2$ desenvolveram a SDR quase que em sua totalidade.

1.4.2.2. Teste de Clements

Conhecido por este nome por ter sido proposto inicialmente por Clements et al,⁶¹ como forma de avaliar a maturidade pulmonar, este teste é realizado no LA, o qual é adicionado a 5 tubos de ensaio com etanol a 95% em concentrações progressivas. Após, as misturas são agitadas vigorosamente por um período de 15 segundos para formar bolhas. Depois de 15 minutos, conforme a distribuição das bolhas nos cinco diferentes tubos, o teste é considerado positivo ou negativo. Sua realização é fácil, leva alguns minutos e tem custo reduzido.

Estudos mostraram que existe uma boa correlação entre o teste de Clements no LA e o resultado da relação L/E. De uma maneira geral, a presença de bolhas é muito específica de maturidade pulmonar. Por outro lado, a ausência de bolhas, indicativa de imaturidade, tem especificidade baixa em relação à L/E, e a presença de sangue e mecônio interfere nos Resultados.^{62, 63} O teste não tem sido utilizado para fins de decisão quanto à terapia com

surfactante porque acrescenta pouco em relação à avaliação do risco de desenvolvimento da SDR pela idade gestacional.

1.4.2.3 Teste do Clique

O Teste do Clique (TC), desenvolvido a partir da descrição de Pattle et al.,⁵⁶ baseia-se no fenômeno pelo qual as bolhas formadas pelo surfactante pulmonar, quando em contato com água desaerada, expandem-se (achatam-se) pela baixa tensão superficial e, então, repentinamente, se contraem novamente (clique). Este fenômeno ocorre repetidas vezes e pode ser observado ao microscópio. É um teste de “sim ou não”.^{57, 64}

De um modo geral, apesar de ter sido descrito há anos, o teste é pouco utilizado e até mesmo pouco conhecido. Apesar de ser um teste rápido, barato e de fácil realização, a utilidade potencial no auxílio à decisão terapêutica com surfactante em pacientes prematuros não está definida. Segundo Fiori et al.⁶⁵ o TC na secreção gástrica é muito sensível mas pouco específico para diagnosticar precocemente a SDR em prematuros com menos de 35 semanas de gestação. Pela falta de especificidade, o teste resulta em uma proporção muito elevada de falsos diagnósticos de SDR.

1.5 JUSTIFICATIVA

Após o surgimento dos surfactantes exógenos e com a melhora da assistência neonatal, o interesse na avaliação da maturidade pulmonar pré-natal diminuiu. Entretanto, ensaios clínicos randomizados, sugerindo melhores resultados do tratamento com surfactante quanto mais precoce for sua administração, renovaram o interesse por testes capazes de determinar quais são os recém-nascidos que apresentam deficiência de surfactante pulmonar. Assim, no momento do parto, o conhecimento do neonatologista sobre o grau de maturidade pulmonar do recém-nascido pré-termo torna-se uma informação importante para a assistência neonatal adequada.

Tendo em vista a importância da avaliação da maturidade pulmonar para a identificação dos recém-nascidos que se beneficiarão do tratamento precoce com surfactante, urge que sejam estabelecidas novas técnicas e estratégias,

tanto ou mais eficientes que as já tradicionais e que os obstetras sejam estimulados a pesquisar o grau de maturidade pulmonar dos recém-nascidos pré-termo, através da coleta de líquido amniótico no momento do parto.

O Teste das Microbolhas Estáveis, que é um exame qualitativo, e a Contagem dos Corpos Lamelares, que é um exame quantitativo, são testes simples, baratos, rápidos e que podem ser realizados no líquido amniótico. Alguns estudos demonstram que esses testes apresentam desempenho diagnóstico satisfatório; no entanto, ainda não há estudos sobre a associação dos dois.

Este trabalho visa contribuir para a redução da morbidade e mortalidade de recém-nascidos prematuros que possam apresentar patologias associadas à imaturidade pulmonar, através do aperfeiçoamento de técnicas que avaliam o grau de maturidade pulmonar. Sua divulgação poderá ser um fator importante para a conscientização dos obstetras quanto à importância da coleta de líquido amniótico no momento do parto prematuro.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho do Teste das Microbolhas Estáveis (TME) e da Contagem dos Corpos Lamelares (CCL) no líquido amniótico (LA), na predição do risco de desenvolver a Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR).

1.6.2 Objetivos Específicos

- 1- Estabelecer o melhor ponto de corte dos testes em estudo.
 - 2- Comparar o desempenho do TME e do CCL na predição do risco de desenvolver a SDR.
 - 3- Avaliar o desempenho da associação do TME e CCL na predição do risco de desenvolver a SDR.
-

1.7 REFERÊNCIAS

1. Obladen M. History of surfactant up to 1980. *Biol Neonate*. 2005;87(4):308-16.
 2. Whitsett JA, Pryhuber GS, Rice WR, Warner BB, Wert SE. Acute respiratory disorder. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG, editors. *Neonatology: pathophysiology and management of the newborn*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 1999. p.494-7.
 3. Hack M, Wright LL, Shankaran S, Tyson JE, Horbar JD, Bauer CR, et al. Very-low-birth-weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Network, November 1989 to October 1990. *Am J Obstet Gynecol* 1995 Feb;172(2 Pt 1):457-64.
 4. Piper JM. Lung maturation in diabetes in pregnancy: if and when to test. *Semin Perinatol* 2002 Jun;26(3):206-9.
 5. Gerten KA, Coonrod DV, Bay RC, Chambliss LR. Cesarean delivery and respiratory distress syndrome: does labor make a difference? *Am J Obstet Gynecol* 2005 Sep;193(3 Pt 2):1061-4.
-

6. Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* (Online). 2006;3:CD004454.
 7. Crowley P. WITHDRAWN: Prophylactic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(3):CD000065.
 8. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child.* 1959 May;97(5, Part 1):517-23.
 9. Honrubia D, Stark A. Respiratory distress syndrome. In: Cloherty JP, Eichenwald EC, Stark A, editors. *Manual of neonatal care.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.341-8.
 10. Dani C, Bertini G, Pezzati M, Cecchi A, Caviglioli C, Rubaltelli FF. Early extubation and nasal continuous positive airway pressure after surfactant treatment for respiratory distress syndrome among preterm infants <30 weeks' gestation. *Pediatrics.* 2004 jun;113(6):e560-3.
 11. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet.* 1980 Jan 12;1(8159):55-9.
 12. Surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: an international randomized clinical trial. Collaborative European Multicenter Study Group. *Pediatrics.* 1988 Nov;82(5):683-91.
-

-
13. Soll RF. Prophylactic natural surfactant extract for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(2):CD000511.
 14. Stevens TP, Harrington EW, Blennow M, Soll RF. Early surfactant administration with brief ventilation vs. selective surfactant and continued mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007(4):CD003063.
 15. Plavka R, Kopecky P, Sebron V, Leiska A, Svihovec P, Ruffer J, et al. Early versus delayed surfactant administration in extremely premature neonates with respiratory distress syndrome ventilated by high-frequency oscillatory ventilation. *Intensive Care Med.* 2002 Oct;28(10):1483-90.
 16. Gortner L, Wauer RR, Hammer H, Stock GJ, Heitmann F, Reiter HL, et al. Early versus late surfactant treatment in preterm infants of 27 to 32 weeks' gestational age: a multicenter controlled clinical trial. *Pediatrics.* 1998 Nov;102(5):1153-60.
 17. Speer CP, Harms K, Herting E, Neumann N, Curstedt T, Robertson B. Early versus late surfactant replacement therapy in severe respiratory distress syndrome. *Lung.* 1990;168 Suppl:870-6.
 18. Soll RF, Morley CJ. Prophylactic versus selective use of surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(2):CD000510.
-

-
19. Fiori HH, Fritscher CC, Fiori RM. Selective surfactant prophylaxis in preterm infants born at < or =31 weeks' gestation using the stable microbubble test in gastric aspirates. *J Perinat Med.* 2006;34(1):66-70
 20. Boyden EA. Notes on the development of the lung in infancy and early childhood. *Am J Anat.* 1967 Nov;121(3):749-61.
 21. Enhorning G. Pulmonary surfactant function studied with the pulsating bubble surfactometer (PBS) and the capillary surfactometer (CS). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001 May;129(1):221-6.
 22. Weaver TE, Na CL, Stahlman M. Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin Cell Dev Biol.* 2002 Aug;13(4):263-70.
 23. Sanders RL, Hassett RJ, Vatter AE. Isolation of lung lamellar bodies and their conversion to tubular myelin figures in vitro. *Anat Rec.* 1980 Nov;198(3):485-501.
 24. Mason RJ, Voelker DR. Regulatory mechanisms of surfactant secretion. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):226-40.
 25. Whitsett J. Composition of pulmonary surfactant lipids and proteins. In: Polin RA, Fox WW, editors. *Fetal and neonatal physiology.* 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998. p.1251-9.
 26. Ballard PL. Hormonal control of lung maturation. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1989 Nov;3(3):723-53.
-

-
27. Ballard PL, Ballard RA. Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *Am J Obstet Gynecol.* 1995 Jul;173(1):254-62.
 28. Romaguera J, Zorrilla C, de la Vega A, Fromm R, Wallach RC, Rodriguez-Mariani A, et al. Responsiveness of L-S ratio of the amniotic fluid to intra-amniotic administration of thyroxine. Role of fetal age. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1990;69(2):119-22.
 29. Wang Y, Folkesson HG, Jayr C, Ware LB, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy. *J Appl Physiol.* 1999 Nov;87(5):1852-60.
 30. Oh MH, Bae CW. Inhibitory effect of meconium on pulmonary surfactant function tested in vitro using the stable microbubble test. *Eur J Pediatr.* 2000 Oct;159(10):770-4.
 31. Moses D, Holm BA, Spitale P, Liu MY, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Feb;164(2):477-81.
 32. Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obst Gynecol.* 1997 Jun;40(2):280-9.
 33. Moore TR. Clinical evaluation of amniotic fluid volume. *Semin Perinatol.* 1993 Jun;17(3):173-82.
 34. Parkinson CE, Harvey D, Talbert D. Surface properties of amniotic fluid bubbles. *Biology of the neonate.* 1974;25(5-6):289-99
-

-
35. Seeds AE. Current concepts of amniotic fluid dynamics. *Am J Obstet Gynecol.* 1980 Nov 1;138(5):575-86.
 36. Moore TR. Assessment of amniotic fluid volume in at-risk pregnancies. *Clin Obstet Gynecol.* 1995 Mar;38(1):78-90.
 37. McGinnis KT, Brown JA, Morrison JC. Changing patterns of fetal lung maturity testing. *J Perinatol.* 2008 Jan;28(1):20-3.
 38. Dubin SB. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem.* 1989 Apr;35(4):612-6.
 39. Roiz-Hernandez J, Navarro-Solis E, Carreon-Valdez E. Lamellar bodies as a diagnostic test of fetal lung maturity. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002 Jun;77(3):217-21.
 40. Ashwood ER, Palmer SE, Taylor JS, Pingree SS. Lamellar body counts for rapid fetal lung maturity testing. *Obstet Gynecol.* 1993 Apr;81(4):619-24.
 41. Neerhof MG, Dohnal JC, Ashwood ER, Lee IS, Anceschi MM. Lamellar body counts: a consensus on protocol. *Obstet Gynecol.* 2001 Feb;97(2):318-20.
 42. Dalence CR, Bowie LJ, Dohnal JC, Farrell EE, Neerhof MG. Amniotic fluid lamellar body count: a rapid and reliable fetal lung maturity test. *Obstet Gynecol.* 1995 Aug;86(2):235-9.
-

-
43. Wijnberger LD, Huisjes AJ, Voorbij HA, Franx A, Bruinse HW, Mol BW. The accuracy of lamellar body count and lecithin/sphingomyelin ratio in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *Bjog*. 2001 Jun;108(6):583-8.
44. DeRoche ME, Ingardia CJ, Guerette PJ, Wu AH, LaSala CA, Mandavilli SR. The use of lamellar body counts to predict fetal lung maturity in pregnancies complicated by diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Oct;187(4):908-12.
45. Ashwood ER, Oldroyd RG, Palmer SE. Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid. *Obstet Gynecol*. 1990 Feb;75(2):289-92.
46. Gluck L, Kulovich MV. Lecithin-sphingomyelin ratios in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1973 Feb 15;115(4):539-46.
47. Gluck L, Kulovich MV, Borer RC, Jr., Keidel WN. The interpretation and significance of the lecithin-sphingomyelin ratio in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 1974 Sep;120(1):142-55.
48. Nugent CE, Ayers JW, Menon KM. Comparison of amniotic fluid disaturated phosphatidylcholine and the lecithin-sphingomyelin ratio in the prediction of fetal lung maturity. *Obstet Gynecol*. 1986 Oct;68(4):541-5.
49. Hamilton PR, Hauschild D, Broekhuizen FF, Beck RM. Comparison of lecithin: sphingomyelin ratio, fluorescence polarization, and
-

phosphatidylglycerol in the amniotic fluid in the prediction of respiratory distress syndrome. *Obstet Gynecol.* 1984 Jan;63(1):52-6.

50. James DK, Tindall VR, Richardson T. Is the lecithin/sphingomyelin ratio outdated? *Br J Obstet Gynaecol.* 1983 Nov;90(11):995-1000.

51. Longo SA, Towers CV, Strauss A, Asrat T, Freeman RK. Meconium has no lecithin or sphingomyelin but affects the lecithin/sphingomyelin ratio. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Dec;179(6 Pt 1):1640-2.

52. Garite TJ, Yabusaki KK, Moberg LJ, Symons JL, White T, Itano M, et al. A new rapid slide agglutination test for amniotic fluid phosphatidylglycerol: laboratory and clinical correlation. *Am J Obstet Gynecol.* 1983 Nov 15;147(6):681-6.

53. Alvarez JG, Richardson DK, Ludmir J. Prediction of respiratory distress syndrome by the novel dipalmitoyl phosphatidylcholine test. *Obstet Gynecol.* 1996 Mar;87(3):429-33.

54. Pryhuber GS, Hull WM, Fink I, McMahan MJ, Whitsett JA. Ontogeny of surfactant proteins A and B in human amniotic fluid as indices of fetal lung maturity. *Pediatr Res.* 1991 Dec;30(6):597-605.

55. Turner RJ, Read JA. Practical use and efficiency of amniotic fluid OD 650 as a predictor of fetal pulmonary maturity. *Obstet Gynecol.* 1983 May;61(5):551-5.

56. Tsai MY, Josephson MW, Knox GE. Absorbance of amniotic fluid at 650 nm as a fetal lung maturity test: a comparison with the

- lecithin/sphingomyelin ratio and tests for disaturated phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol. *Am J Obstet Gynecol.* 1983 Aug 15;146(8):963-6.
57. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, et al. Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol.* 1979 Aug;86(8):615-22.
58. Chida S, Fujiwara T. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: I. Comparisons with other predictors of fetal lung maturity in amniotic fluid. *Eur J Pediatr.* 1993 Feb;152(2):148-51.
59. Chida S, Fujiwara T, Konishi M, Takahashi H, Sasaki M. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: II. Prospective evaluation of the test on amniotic fluid and gastric aspirate. *Eur J Pediatr.* 1993 Feb;152(2):152-6.
60. Eckert Seitz E, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM. Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Biol Neonate.* 2005;87(2):140-4.
61. Clements JA, Platzker AC, Tierney DF, Hobel CJ, Creasy RK, Margolis AJ, et al. Assessment of the risk of the respiratory-distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *N Engl J Med.* 1972 May 18;286(20):1077-81.
-

62. Harvey D, Parkinson CE, Campbell S. Letter: Risk of respiratory-distress syndrome. *Lancet*. 1975 Jan 4;1(7897):42.
 63. Roux JF, Nakamura J, Brown E. Assessment of fetal maturation by the foam test. *Am J Obstet Gynecol*. 1973 Sep 15;117(2):280-3.
 64. Parkinson CE, Supramaniam G, Harvey D. Bubble clicking in pharyngeal aspirates of newborn babies. *Br Med J*. 1978 Mar 25;1(6115):758-9.
 65. Fiori HH, Varela I, Justo AL, Fiori RM. Stable microbubble test and click test to predict respiratory distress syndrome in preterm infants not requiring ventilation at birth. *J Perinat Med*. 2003;31(6):509-14.
-

CAPÍTULO II

2 PACIENTES E MÉTODOS

2.1 Delineamento

Foi realizado um estudo observacional de coorte, para avaliar o desempenho de dois testes diagnósticos.

2.2 População e amostra

A população foi constituída por recém-nascidos pré-termo, definidos como tendo menos de 37 semanas de idade gestacional, nascidos no HSL.

2.3 Critério de inclusão

Através de uma amostra de conveniência, foram incluídos no estudo todos os recém-nascidos com idade gestacional inferior a 37 semanas, que nasceram no HSL no período de março de 2006 a novembro de 2007 e dos quais foi possível coletar LA no máximo 48 horas antes do nascimento.

2.4 Critérios de exclusão

- 1- Recém-nascidos com malformações congênitas incompatíveis com a vida, como síndromes genéticas, cardiopatias graves, hérnia diafragmática.
 - 2- Casos nos quais não foi possível definir o diagnóstico de SDR de acordo com os critérios diagnósticos utilizados no estudo.
 - 3- LA com mecônio espesso.
-

2.5 Tamanho da amostra

Fixando-se alfa em 5% e esperando-se obter uma margem de erro de \pm 10% na especificidade, foi calculado um valor amostral em torno de 100 pacientes.

2.6 Variáveis

Tabela 1- Variáveis

Variáveis de caracterização da amostra

1. Idade gestacional
2. Peso de nascimento
3. Sexo
4. Via de parto
5. Uso de corticóide pré-natal
6. Presença de diabetes materno gestacional
7. Presença de hipertensão arterial/pré-eclâmpsia

Variáveis em estudo

8. Teste das Microbolhas Estáveis
9. Contagem dos Corpos Lamelares

Variável de desfecho

10. Presença de critérios diagnósticos para Síndrome do Desconforto Respiratório
-

2.7 Definição operacional das variáveis

1. Idade gestacional (IG): foi obtida do prontuário da mãe ou através do exame físico do recém-nascido. Foi considerada correta a IG obtida através dos seguintes critérios, em ordem de preferência: 1) ultrassonografia no pré-natal realizada antes de 20 semanas; 2) data da última menstruação, desde que não fosse diferente em mais de 2 semanas em relação à IG obtida pela avaliação pós-natal; 3) através do exame físico do recém-nascido, pelos métodos de Capurro¹ ou New Ballard.²
 2. Peso do recém-nascido: obtido do prontuário (expresso em gramas).
 3. Sexo: obtido do prontuário.
 4. Via de parto: obtida do prontuário (vaginal ou cesárea).
 5. Uso de corticóide pré-natal: foi considerado como efetivo o uso, pela mãe, de pelo menos 1 dose de betametasona ou outro corticóide equivalente, durante o período compreendido entre 1 semana e 12 horas antes do nascimento.
 6. Informação sobre diabetes materno gestacional: obtida no prontuário.
 7. Informação sobre hipertensão arterial/pré-eclâmpsia materna: obtida no prontuário.
-

-
8. TME no LA: foi registrado o número de microbolhas (bolhas com menos de 15 μm) por milímetro quadrado ($\mu\text{b}/\text{mm}^2$) através da técnica descrita abaixo.
 9. CCL no LA: foi realizada pelo contador de plaquetas Sysmex XT-1800I conforme descrição a seguir.
 10. Variável de desfecho clínico: a presença dos critérios para SDR foi pesquisada no prontuário de cada paciente durante as primeiras 48-72 horas de vida e foram considerados como tendo diagnóstico de SDR os recém-nascidos com os critérios descritos a seguir:
 - Clínica sugestiva de SDR (taquipnéia, batimento de asas de nariz, retrações da caixa torácica, gemido expiratório, cianose, necessidade de oxigênio em concentração igual ou superior a 40%) e raio-X de tórax compatível com SDR, definido pela presença de infiltrado retículo-granular e broncogramas aéreos.
 - Recém-nascido que recebeu dose de surfactante profilática de acordo com a rotina da UTIN³ e que apresentava TME $<120 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ no aspirado traqueal⁴ e/ou desenvolveu quadro clínico após a primeira dose de surfactante, necessitando de segunda dose.
-

2.8 Descrição dos procedimentos

2.8.1 Contagem dos corpos lamelares

A amostra de LA, coletado por via vaginal ou durante a cesariana, era enviada ao laboratório, onde era centrifugada a 200 g-force (RCF) por 2 minutos e, posteriormente, realizada a contagem dos corpos lamelares. O contador de plaquetas utilizado foi o Sysmex XT-1800I, que utiliza a técnica de citometria de fluxo fluorescente. O número lido como plaquetas era registrado como corpos lamelares. A contagem foi dada por corpos lamelares por microlitro (CL/ μ L) e a calibragem do aparelho foi realizada conforme as orientações do fabricante.

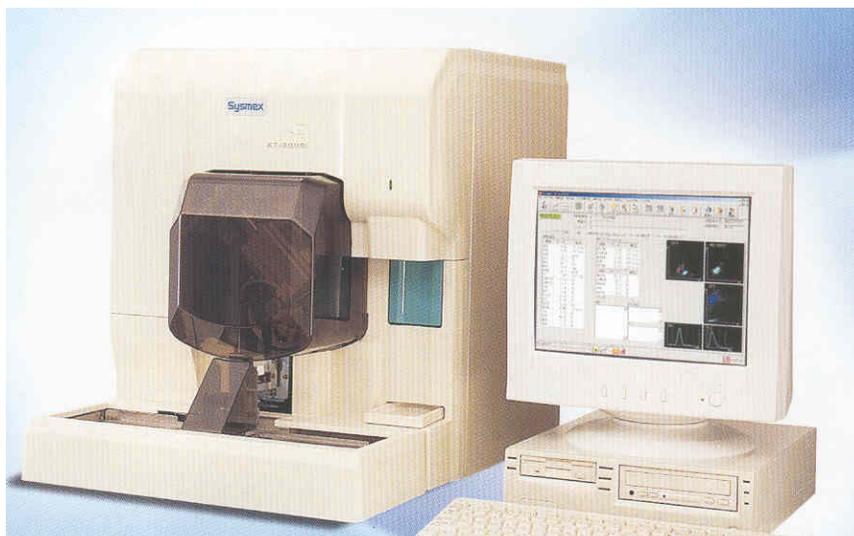


Figura 7 – Foto de um analisador hematológico Sysmex XT-1800I (Sysmex do Brasil, São José dos Pinhais/SP), um dos que pode ser utilizado para contagem de Corpos Lamelares. Este aparelho utiliza a Citometria de Fluxo Fluorescente. Figura extraída do manual de instruções do aparelho.

2.8.2 Teste das Microbolhas Estáveis

No momento do parto, parte do LA era congelada para posterior processamento do TME. A técnica utilizada foi similar à descrita por Pattle et al.^[5] O LA armazenado era descongelado e uma amostra aproximada de 1 μ l era aspirada e expelida em uma lâmina de Neubauer por 6 segundos (em torno de 20 vezes) através de uma pipeta de Pasteur de 22 cm de comprimento acoplada a uma borracha de pipetar. A lâmina micrométrica era imediatamente invertida, de modo a formar uma gota pendente. Esta gota era avaliada após 4 minutos utilizando microscopia de 100 aumentos e o número de microbolhas com menos de 15 μ m era contado numa área de 1 mm² com a ajuda de uma escala óptica. O TME foi realizado no Laboratório de Pesquisas do Hospital São Lucas, pelo próprio autor, de modo cego, ou seja, durante a realização dos testes não era possível saber a quem pertencia o material.

2.8.3 Coleta do material

A equipe de obstetrícia do HSL foi orientada a coletar LA de qualquer paciente com trabalho de parto prematuro. A coleta era feita por via vaginal, nos partos por via baixa, ou após a histerotomia nas cesarianas.

A CCL era realizada logo após a coleta do LA, e o TME era realizado posteriormente. O LA era armazenado em refrigerador por um período de até

24 horas e posteriormente transferido para o congelador a -20°C até a realização do TME. O processo de congelamento foi validado em estudo anterior.⁶

A presença ou ausência de SDR e os demais dados foram coletados pelo autor a partir dos prontuários dos pacientes.

2.9 Análise estatística

Para medir a capacidade diagnóstica dos testes estudados calculamos a sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*). Para determinar o melhor ponto de corte para o TME e a CCL, foi traçada uma curva ROC (*receiver operating characteristic curve*)⁷ sendo a área abaixo da curva utilizada como parâmetro de desempenho do teste.

Em seguida, os dois testes estudados foram combinados usando o operador booleano AND (que significa E), ou seja, o teste somente será positivo (imaturidade pulmonar) se os dois testes tiverem resultados positivos (TME $<7\mu\text{b}/\text{mm}^2$ "E" CCL ≤ 12.000 CL/L). Partindo-se dessa nova variável, foram calculadas as medidas de desempenho diagnóstico supracitadas.

O nível de significância adotado foi de 5% e os cálculos foram realizados com auxílio dos programas SPSS 11.5, PEPI 4.0 e Epi Info 6.0.

2.10 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Área da Saúde da PUCRS e pelas chefias dos serviços de Neonatologia e Obstetrícia do HSL. O estudo foi observacional e o resultado dos testes não foi conhecido pela equipe responsável pelo atendimento do paciente e, portanto, não influenciou na conduta da equipe médica. O termo de consentimento pós-informação (Anexo 1) foi obtido dos pais dos pacientes.

2.11 REFERÊNCIAS

1. Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J. pediatrics*. 1978 Jul;93(1):120-2.
 2. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J. pediatrics*. 1991 Sep;119(3):417-23.
 3. Fiori HH, Fritscher CC, Fiori RM. Selective surfactant prophylaxis in preterm infants born at $<$ or $=$ 31 weeks' gestation using the stable microbubble test in gastric aspirates. *J Perinat Med*. 2006;34(1):66-70.
 4. Eckert Seitz E, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM. Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Biol. of the neonate*. 2005;87(2):140-4.
 5. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, et al. Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *BJOG*. 1979 Aug;86(8):615-22.
-

6. Pereira M. Inter e intravariabilidade e o efeito do congelamento no teste das microbolhas estáveis realizado na secreção gástrica de recém-nascidos. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2002.
 7. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology*. 1983 Sep;148(3):839-43.
-

CAPÍTULO III

Artigo Original

(ARTIGO) Português

Teste das microbolhas estáveis e contagem de corpos lamelares no líquido amniótico para predição da síndrome do desconforto respiratório no recém-nascido prematuro.

Gustavo Steibel¹

Humberto Holmer Fiori²

1 - Mestrando do Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS.

2 - Professor da Faculdade de Medicina e do Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS.

RESUMO

Introdução: à medida que o tratamento profilático ou precoce com surfactante mostrou-se vantajoso nos recém-nascidos prematuros com imaturidade pulmonar, renovou-se o interesse na busca de testes diagnósticos nesta área. A contagem dos corpos lamelares (CCL) e o teste das microbolhas estáveis (TME) no líquido amniótico são exames rápidos e de baixo custo que podem ser realizados durante o trabalho de parto. Possivelmente, o uso combinado destes exames pode aumentar seus desempenhos diagnósticos, porém esta hipótese ainda não foi testada.

Objetivo: avaliar o desempenho do TME e da CCL no líquido amniótico, na predição da síndrome do desconforto respiratório (SDR) em recém-nascidos prematuros.

Métodos: foi coletado líquido amniótico durante a cesárea ou por via vaginal, em partos prematuros ocorridos no Hospital São Lucas da PUCRS no período de março de 2006 a novembro de 2007. A CCL foi realizada logo após a coleta do material pelo contador de plaquetas Sysmex XT-1800I e o TME foi realizado posteriormente, pelo autor, cegado para o desfecho. O diagnóstico de SDR foi estabelecido pela apresentação clínica e um raio-x de tórax característico ou recém-nascido que recebeu surfactante profilático e apresentava uma contagem de microbolhas no aspirado traqueal $< 120 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ e/ou necessitou da segunda dose de surfactante.

Resultados: dos 111 pacientes estudados, 20 (18%) apresentaram SDR. A média do peso foi 2062 ± 639 gramas enquanto que a idade gestacional média foi 32.8 ± 3 semanas. Para um ponto de corte ≤ 12.000 corpos lamelares/ μL a sensibilidade, a especificidade e a razão de verossimilhança positiva da CCL foram 90% (IC95%: 68-99%), 81% (IC95%: 72-89%) e 4.8 (IC95%: 3.2 – 7.4%) respectivamente. Para um ponto de corte ≤ 5 microbolhas/ mm^2 , o TME apresentou uma sensibilidade de 90% (IC95%: 68-99%), uma especificidade de 79% (IC95%: 69-87%) e uma razão de verossimilhança positiva de 4.3 (IC95%: 2.8-6.6%). Usando os testes em conjunto (TME $< 7 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ E CCL ≤ 12000 corpos lamelares/ μL , para definir imaturidade pulmonar), a razão de verossimilhança positiva aumentou para 10.2 (IC95%: 5.2-20.2) e a especificidade aumentou para 91% (IC95%: 83-96%), enquanto que a sensibilidade permaneceu inalterada em 90% (IC95%: 68-99%).

Conclusão: a CCL e o TME no líquido amniótico possuem desempenho diagnóstico similar quando usados em separado para predizer a SDR. O uso combinado dos dois testes pode aumentar a especificidade e a razão de verossimilhança positiva sem modificar a sensibilidade.

Palavras-chave: testes diagnósticos; imaturidade pulmonar; surfactante; prematuridade.

ABSTRACT

Background: There is a renewed interest in very early diagnosis of surfactant deficiency in immature infants as the advantage of indiscriminate surfactant prophylaxis or very early treatment became clear. Lamellar body count (LBC) and stable microbubble test (SMT) in amniotic fluid are quick and inexpensive tests that can be done even during labor or delivery. Its combined use may increase accuracy, although this hypothesis has not been tested yet.

Objective: To evaluate the performance of LBC and SMT in amniotic fluid in order to predict respiratory distress syndrome (RDS) in preterm infants.

Design/Methods: Amniotic fluid was collected during cesarean section or from vaginal pool in preterm births on São Lucas Hospital from March/2006 to November/2007. Lamellar bodies were counted in fresh amniotic fluid using the platelet counter Sysmex XT-1800I, and SMT was performed later in a blind way. The diagnosis of RDS was established by clinical picture and chest X-ray or, alternatively, in those infants that received prophylactic therapy and presents with microbubble count in the tracheal aspirate below 120 microbubbles /mm² or needed a second dose of surfactant.

Results: From the 111 patients analyzed, twenty (18%) infants had the diagnosis of RDS. Mean birth weight was 2062 ± 639g and gestational age 32.8 ± 3 weeks. At the cutoff point of ≤12.000 lamellar bodies/μL the sensitivity, specificity and positive likelihood ratio of the LBC were 90% (95%CI: 68-99), 81% (95%CI: 72-89%) and 4.8 (95%CI: 3.2 -7.4 %) respectively. At the cutoff point of ≤5 microbubbles/mm² the SMT showed a sensitivity of 90% (95%CI: 68-99), a specificity of 79% (95%CI: 69-87) and a positive likelihood ratio of 4.3 (95%CI: 2.8 – 6.6 %). Using both tests combined (SMT < 7 microbubbles/mm² and LBC ≤12000 lamellar bodies/μL to define lung immaturity), the positive likelihood ratio and specificity increased to 10.2 (95%CI: 5.2-20.2) and 91% (95%CI: 83-96) respectively, while the sensitivity remained 90% (95%CI: 68-99).

Conclusions: LBC and SMT in the amniotic fluid have similar performance to predict RDS in preterm infants. The combined use of the tests may improve positive likelihood ratio and specificity without change the sensitivity.

Key-words: diagnostics tests; lung immaturity; surfactant; preterm birth

INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório (SDR) é uma das principais causas de mortalidade em recém-nascidos prematuros.¹ Esta síndrome está relacionada à produção insuficiente de surfactante pulmonar e poderia ser sugerida por testes que avaliam a maturidade pulmonar. Nos últimos 50 anos, inúmeros testes foram desenvolvidos com este propósito, buscando avaliar a quantidade (testes quantitativos) ou avaliar a função (testes qualitativos) do surfactante presente nos diferentes fluidos fetais (líquido amniótico, secreção gástrica e secreção traqueal).²

Entre os testes que avaliam a maturidade pulmonar, a relação lecitina/esfingomielina (teste quantitativo) foi considerada por muito tempo como padrão ouro.³ No entanto, trata-se de um exame de custo elevado e que requer pessoal treinado para sua execução. A contagem dos corpos lamelares (CCL) e o teste das microbolhas estáveis (TME) são testes mais rápidos, econômicos e simples. A CCL quantifica a presença de surfactante através da contagem dessas estruturas, ricas em surfactante, por microlitro de líquido amniótico. O TME avalia indiretamente a função surfactante através da presença ou ausência de microbolhas estáveis (bolhas com diâmetro <15µm).

O primeiro autor a estudar a CCL como um exame capaz de diagnosticar a imaturidade pulmonar foi Dubin, em 1989.⁴ O autor comparou a CCL com a razão lecitina/esfingomielina (L/E) e concluiu que, assim como a L/E, a CCL

aumentava exponencialmente com o evoluir da gestação e que ambos se correlacionavam linearmente. Desse modo, sugeriu que a CCL era um teste de maturidade pulmonar de fácil execução e que poderia ser utilizado principalmente em hospitais onde não fosse possível realizar a L/E. Em 2001, foi realizada uma metanálise com seis estudos sobre a performance da CCL para o diagnóstico de imaturidade pulmonar. Os resultados demonstraram que a CCL teve uma performance igual ou discretamente superior à dosagem da L/E na predição da SDR. A partir de então, uma vez que a CCL é fácil execução e de menor custo, os autores o recomendaram como o teste de escolha para a avaliação da maturidade pulmonar.⁵

Em 1979, Pattle et al. propuseram que a maturidade dos pulmões de ovelhas poderia ser avaliada pela observação de microbolhas presentes no líquido amniótico, através de um microscópio com aumento de 100 vezes.⁶ Quanto menor a quantidade de microbolhas estáveis presentes na amostra, maior seria a possibilidade da presença de imaturidade pulmonar. Em 1992, Chida et al. concluíram que o teste era factível para a pesquisa da imaturidade pulmonar em neonatos, e que seu uso deveria ser encorajado, embora estudos multicêntricos deveriam testar sua real capacidade de selecionar prematuros que se beneficiariam do uso profilático do surfactante.⁷ Fiori et al.⁸ estudaram o aspirado gástrico de recém-nascidos prematuros e sugeriram que o TME poderia auxiliar na decisão clínica do uso profilático de surfactante.

Inúmeros estudos avaliaram a desempenho de testes alternativos para prever a imaturidade pulmonar em recém-nascidos.⁹⁻¹² Alguns

correlacionaram o teste em estudo com a dosagem da L/E e outros com o desfecho clínico. No entanto, a maioria dos testes apresenta uma baixa especificidade ou sensibilidade (dependendo do ponto de corte utilizado) ou sofre a interferência de contaminantes, como sangue e mecônio.

O objetivo deste estudo foi avaliar a desempenho da CCL e do TME no líquido amniótico em partos prematuros para o diagnóstico SDR, e verificar se a associação dos métodos implica no aumento do poder discriminatório sem aumentar o custo ou a complexidade do processo diagnóstico significativamente.

PACIENTES E MÉTODOS

Foi realizado um estudo observacional de coorte para avaliar o desempenho de dois testes diagnósticos em recém-nascidos prematuros que nasceram no Hospital São Lucas da PUCRS (HSL), em Porto Alegre/RS, no período entre março de 2006 a novembro de 2007. Através de uma amostra de conveniência, foram incluídos pacientes com idade gestacional inferior a 37 semanas de evolução, dos quais foi possível coletar líquido amniótico no máximo 48 horas antes do nascimento.

Foram excluídos do estudo prematuros com malformações congênitas incompatíveis com a vida (síndromes genéticas, cardiopatias graves, hérnia diafragmática); casos em que não foi possível definir o diagnóstico de SDR de acordo com os critérios diagnósticos utilizados no estudo; e líquido amniótico com mecônio espesso. O diagnóstico de SDR foi estabelecido pela apresentação clínica e um raio-x de tórax característico, ou por um recém-nascido que recebeu surfactante profilático e apresentava uma contagem de microbolhas no aspirado traqueal $<120 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ e/ou necessitou da segunda dose de surfactante.

Os membros da equipe de obstetrícia do HSL foram orientados a coletar líquido amniótico das pacientes com trabalho de parto prematuro, seja por via vaginal ou após a histerotomia nos partos cesáreos. A CCL foi realizada no contador de plaquetas Sysmex XT-1800I utilizando o canal de plaquetas e o

TME foi realizado posteriormente pelo autor, cego para o desfecho. O líquido amniótico foi armazenado em refrigerador por período de até 24 horas e transferido para congelador a -20°C até a realização do TME. O processo de congelamento foi validado em estudo anterior.¹³ A presença ou ausência de SDR e os demais dados foram coletados pelo autor a partir dos prontuários dos pacientes após 72 horas do nascimento.

Para medir o desempenho dos testes estudados para diagnosticar a SDR foi calculado a sensibilidade, especificidade e a razão de verossimilhança positiva (*positive likelihood ratio*). Para auxiliar a determinação do melhor ponto de corte para o TME e a CCL, foi obtida uma curva ROC (*receiver operating characteristic curve*). Em seguida os dois testes estudados foram combinados usando o operador booleano [AND] que significa [E], ou seja, o teste somente foi considerado positivo (imaturidade pulmonar) se os dois testes apresentassem resultado positivo: TME $<7\mu\text{b}/\text{mm}^2$ E CCL ≤ 12000 corpos lamelares por microlitro (CL/ μL). Partindo-se desta nova variável, foram calculadas as medidas de desempenho diagnóstico supracitadas.

O nível de significância adotado foi de 5% e os cálculos foram realizados com auxílio dos programas SPSS 11.5, PEPI 4.0 e o Epi Info 6.0. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS e pelas chefias de serviços de Neonatologia e Obstetrícia do HSL. O consentimento livre e esclarecido foi obtido com as mães que participaram do estudo.

RESULTADOS

Um total de 116 pacientes tiveram líquido amniótico coletado. Destes, quatro com dificuldade respiratória foram excluídos devido à falta de critérios diagnósticos para SDR e um devido à presença de mecônio espesso. Restaram 111 pacientes para análise, 40 (36%) com idade gestacional igual ou inferior a 32 semanas e 71 (64%) superior a 32 semanas. Vinte pacientes (18%) apresentaram critério diagnóstico para SDR. A média do peso e o desvio padrão foi 2062 ± 639 gramas e a idade gestacional média foi $32,8 \pm 3$ semanas. Em todas as amostras foi possível realizar a CCL e o TME. O resumo dos dados de caracterização da amostra é descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Características da amostra nos grupos de pacientes com e sem síndrome do desconforto respiratório. Resultados expressos em média (desvio padrão) nas variáveis contínuas ou em número de pacientes (percentual).

	SDR n = 20	Não SDR n = 91
Idade gestacional	$30,2 \pm 3$	$33,4 \pm 3$
Peso (g)	1523 ± 705	2854 ± 561
Sexo masculino	12 (60%)	45 (49,4%)
Cesariana	16(80%)	62(71,3%)
Corticóide pré-natal	12(60%)	43(47,2%)
Diabete Melitus	1(5%)	3(3,2%)
Hipertensão*	10(50%)	17(18,6%)

* Hipertensão, pré-eclâmpsia e eclâmpsia .

A curva ROC foi feita para auxiliar na avaliação do melhor ponto de corte para cada exame e para os dois exames em seqüência. Considerando-se

importâncias iguais para sensibilidade e especificidade, o corte de melhor desempenho para CCL foi de ≤ 12000 CL/ μ L e para o TME foi de ≤ 5 μ b/mm².

Quando os exames foram realizados de forma conjugada para sugerir o diagnóstico da SDR, ou seja, ambos deveriam estar positivos para determinar a SDR, o ponto de corte da CCL permaneceu o mesmo, enquanto que o ponto de corte para o TME elevou-se para < 7 μ b/mm². As diferentes medidas de desempenho obtidas em diferentes pontos de corte quando os testes foram utilizados em associação são descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Medidas de desempenho dos testes associados em diferentes pontos de corte (intervalo de confiança de 95%).

Exames	CCL ≤ 10000	CCL ≤ 12000	CCL ≤ 15000
TME ≤ 5	S 80% (56-94%)	S 85% (62-96%)	S 85% (62-96%)
	E 94,5% (87-98%)	E 93,4% (86-97%)	E 91,2% (83-96%)
TME < 7	S 85% (62-96%)	S 90% (68-99%)	S 90% (68-99%)
	E 92,3% (84-96%)	E 91,2% (83-96%)	E 89% (80-96%)
TME ≤ 10	S 85% (62-96%)	S 90% (68-99%)	S 90% (68-99%)
	E 90% (82-95%)	E 89% (80-96%)	E 86,8% (76-92%)

TME = teste das microbolhas estáveis (μ b/mm²).

CCL = Contagem dos corpos lamelares (CL/ μ L).

S = sensibilidade E = especificidade

OBS: em negrito ponto de corte utilizado em nosso estudo.

Considerando-se somente a CCL, com o melhor ponto de corte, que foi de ≤ 12000 CL/ μ L, a sensibilidade foi de 90% (IC95%: 68-99), a especificidade

foi de 81% (IC95%: 72-89) e a razão de verossimilhança positiva foi de 4,8 (IC95%: 3,2-7,4). Dois pacientes com SDR apresentaram resultados erroneamente positivos para maturidade pulmonar (falso negativo) e, no grupo que não desenvolveu SDR, 17 pacientes apresentaram teste erroneamente negativo para maturidade pulmonar (falso positivo).

Quando se utilizou somente o TME, com ponto de corte em $\leq 5 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ a sensibilidade foi de 90% (IC95%: 68-99%), a especificidade de 79% (IC95%: 69-87%) e a razão de verossimilhança positiva foi de 4,3 (IC95%: 2,8-6,6). Dois pacientes com SDR apresentaram resultados erroneamente positivos para maturidade pulmonar (falso negativo) e no grupo que não desenvolveu SDR 19 apresentaram teste erroneamente negativo para maturidade pulmonar (falso positivo).

Com a utilização dos testes combinados em seqüência (CCL ≤ 12000 CL/ μL e TME $< 7 \mu\text{b}/\text{mm}^2$) a sensibilidade foi de 90% (IC95%: 68-99), a especificidade foi de 91,2% (IC95%: 83-96%) e a razão de verossimilhança positiva foi de 10,2 (IC95%: 5,2-20,2). Dois pacientes com SDR apresentaram testes erroneamente negativos para maturidade pulmonar (falso negativo) enquanto que oito apresentaram testes erroneamente positivos (falsos positivos).

DISCUSSÃO

O TME e a CCL no líquido amniótico apresentaram medidas de desempenho similares às encontradas na literatura.^{7,13} Ambos tiveram sensibilidade e especificidade próximas a 90% e 80% respectivamente. A baixa especificidade é uma limitação significativa quando desejamos selecionar recém-nascidos para um tratamento profilático com surfactante, tendo em vista o custo elevado e os potenciais riscos do tratamento. Outros testes, como razão da L/E, dosagem do fosfadilglicerol e teste de Clements, também apresentam número elevado de falsos positivos.^{14, 15}

A associação dos dois testes elevou a especificidade e a razão de verossimilhança positiva, o que representou uma queda de quase 50% no número de falsos positivos, sugerindo que os testes podem ser complementares. Uma das explicações para esta melhora no desempenho pode ser a instabilidade descrita por Sanders et al.:¹⁶ quando houvesse mais mielina tubular que corpos lamelares na amostra, a CCL poderia estar baixa, sugerindo erroneamente ausência de surfactante, porém o TME acusaria a presença de surfactante através da presença de microbolhas estáveis. Outro fator é que substâncias que inativam o surfactante, como proteínas e mecônio podem falsamente diminuir a contagem das microbolhas no TME, o que não ocorreria com a CCL.¹⁷

Na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal do HSL, o TME no aspirado gástrico é utilizado como teste de escolha para determinar os prematuros que receberão surfactante profilático, conforme os dados publicados por Fiori et al.⁸ Uma vez confirmado o aumento da especificidade da associação da CCL com o TME, especialmente na população de recém-nascidos com idade gestacional inferior a 31 semanas, e considerando que o resultado dos exames podem estar disponíveis no momento do nascimento, dispensando a espera do resultado do TME na secreção gástrica, o que pode representar um retardo na utilização do surfactante. A utilização da CCL e do TME no líquido amniótico poderá substituir a atual prática, provavelmente diminuindo o número de pacientes submetidos à profilaxia desnecessária.

Outro fato relevante é que dos nove pacientes considerados como falsos positivos do teste em conjunto, ou seja, que tiveram testes indicando imaturidade pulmonar, porém não desenvolveram o quadro característico da SDR, quatro deles (44%) desenvolveram algum grau de disfunção respiratória necessitando, de pelo menos 24 horas de CPAP.

O líquido amniótico com mecônio espesso foi excluído do estudo, pois poderia danificar o contador de plaquetas. Quatro recém-nascidos prematuros com TME abaixo de $25 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ na secreção gástrica receberam surfactante profilático conforme rotina da Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal⁸ e foram excluídos da amostra, pois seria difícil determinar se estes realmente apresentavam deficiência de surfactante. Houve cinco pacientes considerados como apresentando SDR que receberam surfactante profilático e não

realizaram o RX de tórax. No entanto, foram considerados como casos, uma vez que apresentavam TME na secreção traqueal abaixo de $120 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ ou melhoraram após uma segunda dose de surfactante. Não excluimos estes pacientes, pois conforme um estudo realizado em nosso hospital, os pacientes que apresentavam TME na secreção traqueal abaixo de $120 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ desenvolviam a SDR quase que em sua totalidade.¹⁸

Nas pacientes em que o líquido foi coletado por via vaginal não foi possível identificar o número de horas entre a coleta do material e o momento da ruptura das membranas. Este dado pode ser objeto de análise em estudos futuros, uma vez que a mistura das secreções pulmonares com o líquido amniótico acontece em um sistema fechado, e o líquido amniótico coletado após um longo período de ruptura das membranas pode não ser representativo das secreções pulmonares.¹⁹ Mercer et al.²⁰ sugerem que a indução do parto deve ser considerada a partir de 32 e 33 semanas, nas gestações complicadas com membranas rotas onde seja comprovada a maturidade pulmonar. Assim, devem ser realizados estudos em pacientes com membranas rotas, para verificar o real benefício dos testes de maturidade pulmonar no manejo desses casos.

A maioria dos estudos publicados na literatura sobre testes de maturidade pulmonar, nos últimos anos, incluiu um número reduzido de pacientes e, conseqüentemente, os resultados são apresentados com amplos intervalos de confiança. Nosso estudo sofre da mesma limitação que os demais. No entanto, gostaríamos de ressaltar o potencial efeito aditivo da associação de

um teste qualitativo (TME) e um teste quantitativo (CCL) que podem ser realizados rapidamente (± 10 minutos), sem aumentar a complexidade e os custos da assistência do recém-nascido prematuro. É importante ressaltar que o uso profilático do surfactante é preconizado nos primeiros 15 minutos após o parto.

Assim, concluímos que o TME e a CCL no líquido amniótico apresentam um desempenho adequado para predizer a SDR, similar aos demais testes de maturidade pulmonar. Além disso, seu uso combinado pode aumentar a especificidade e a razão de verossimilhança positiva. Porém, seria recomendável a realização de estudos com um número maior de pacientes, que possam determinar com maior precisão os melhores pontos de corte e confirmar os reais benefícios do uso combinado desses testes.

REFERÊNCIAS

1. Hack M, Wright LL, Shankaran S, Tyson JE, Horbar JD, Bauer CR, et al. Very-low-birth-weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Network, November 1989 to October 1990. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1995 Feb;172(2 Pt 1):457-64.
 2. Obladen M. History of surfactant up to 1980. *Biology of the neonate*. 2005;87(4):308-16.
 3. Gluck L, Kulovich MV. Lecithin-sphingomyelin ratios in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1973 Feb 15;115(4):539-46.
 4. Dubin SB. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem*. 1989 Apr;35(4):612-6.
 5. Wijnberger LD, Huisjes AJ, Voorbij HA, Franx A, Bruinse HW, Mol BW. The accuracy of lamellar body count and lecithin/sphingomyelin ratio in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *Bjog*. 2001 Jun;108(6):583-8.
 6. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, et al. Maturity of fetal lungs tested by production of stable
-

- microbubbles in amniotic fluid. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1979 Aug;86(8):615-22.
7. Chida S, Fujiwara T. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: I. Comparisons with other predictors of fetal lung maturity in amniotic fluid. *European journal of pediatrics*. 1993 Feb;152(2):148-51.
 8. Fiori HH, Fritscher CC, Fiori RM. Selective surfactant prophylaxis in preterm infants born at < or =31 weeks' gestation using the stable microbubble test in gastric aspirates. *J Perinat Med*. 2006;34(1):66-70.
 9. Garite TJ, Yabusaki KK, Moberg LJ, Symons JL, White T, Itano M, et al. A new rapid slide agglutination test for amniotic fluid phosphatidylglycerol: laboratory and clinical correlation. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1983 Nov 15;147(6):681-6.
 10. Alvarez JG, Richardson DK, Ludmir J. Prediction of respiratory distress syndrome by the novel dipalmitoyl phosphatidylcholine test. *Obstetrics and gynecology*. 1996 Mar;87(3):429-33.
 11. Turner RJ, Read JA. Practical use and efficiency of amniotic fluid OD 650 as a predictor of fetal pulmonary maturity. *Obstetrics and gynecology*. 1983 May;61(5):551-5.
 12. Pryhuber GS, Hull WM, Fink I, McMahan MJ, Whitsett JA. Ontogeny of surfactant proteins A and B in human amniotic fluid as indices of fetal lung maturity. *Pediatric research*. 1991 Dec;30(6):597-605.
-

-
13. Roiz-Hernandez J, Navarro-Solis E, Carreon-Valdez E. Lamellar bodies as a diagnostic test of fetal lung maturity. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2002 Jun;77(3):217-21.
 14. Clements JA, Platzker AC, Tierney DF, Hobel CJ, Creasy RK, Margolis AJ, et al. Assessment of the risk of the respiratory-distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *The New England journal of medicine*. 1972 May 18;286(20):1077-81.
 15. Nugent CE, Ayers JW, Menon KM. Comparison of amniotic fluid disaturated phosphatidylcholine and the lecithin-sphingomyelin ratio in the prediction of fetal lung maturity. *Obstetrics and gynecology*. 1986 Oct;68(4):541-5.
 16. Sanders RL, Hassett RJ, Vatter AE. Isolation of lung lamellar bodies and their conversion to tubular myelin figures in vitro. *Anat Rec*. 1980 Nov;198(3):485-501.
 17. Moses D, Holm BA, Spitale P, Liu MY, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1991 Feb;164(2):477-81.
 18. Eckert Seitz E, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM. Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Biology of the neonate*. 2005;87(2):140-4.
-

19. Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clinical obstetrics and gynecology*. 1997 Jun;40(2):280-9.

20. Mercer BM, Crocker LG, Boe NM, Sibai BM. Induction versus expectant management in premature rupture of the membranes with mature amniotic fluid at 32 to 36 weeks: a randomized trial. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1993 Oct;169(4):775-82.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES DETALHADAS

1. O TME e a CCL no LA apresentaram desempenhos adequados para prever o risco de desenvolver a SDR, similares ao de testes já consagrados para avaliação da maturidade pulmonar em recém-nascidos pré-termo.
 2. Os melhores pontos de corte para prever o risco de desenvolver a SDR foram: de $\leq 5 \mu\text{b}/\text{mm}^2$ para o TME e de $\leq 12.000 \text{ CL}/\mu\text{L}$ para a CCL.
 3. Quando comparados entre si, os dois testes apresentaram desempenho semelhante para prever o risco de desenvolver a SDR.
 4. Quando o TME e a CCL foram usados em associação, houve um aumento da especificidade e da razão de verossimilhança positiva, sem modificar a sensibilidade.
-

ANEXO I

Anexo I – Termo de consentimento livre e esclarecido

“Teste das microbolhas estáveis e corpos lamelares no líquido amniótico para predição da síndrome do desconforto respiratório no recém- nascido”

Pesquisadores: Dr. Humberto Holmer Fiori, Dr. Gustavo Steibel

NOME DA PACIENTE:

Registro:

Você está sendo convidada, como voluntária, a participar desta pesquisa clínica, por estar grávida.

Objetivo: Avaliar a utilidade do teste diagnóstico (microbolhas estáveis e da contagem dos corpos lamelares) no líquido amniótico para predição de síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido pré-termo.

Procedimentos: Será coletado líquido amniótico no momento da cesárea ou no momento do rompimento da bolsa amniótica e o líquido coletado (2 ml) será examinado no laboratório.

Benefícios: Para você e seu filho não haverá benefício algum. Caso o teste mostre validade, outros recém- nascidos poderão se beneficiar.

Desconforto e Riscos: Nada será alterado na rotina do seu atendimento.

Sigilo: Seu médico irá tratar sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu prontuário irá permanecer confidencial. Os participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Participação/ Encerramento: Você é livre para recusar-se a participar ou retirar seu consentimento a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará em qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Custos da Participação: Todos os procedimentos e exames laboratoriais para esta pesquisa serão fornecidos gratuitamente.

Não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Declaração da Paciente:

Eu,..... fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada, tendo tempo para ler e pensar sobre a informação contida no termo de consentimento antes de entrar para o estudo. Recebi informação a respeito da investigação a ser realizada, esclareci minhas dúvidas e concordei voluntariamente em participar deste estudo. Além disso, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face de estas informações.

Fui informado que caso existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei.

Se necessitar de informações adicionais, o comitê de Ética em pesquisa da PUCRS está a disposição para perguntas no telefone 33203345, ou com Dr. Gustavo Steibel no telefone 33203000 (ramal 2222).

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome da paciente

Assinatura do paciente

____/____/____
Data

ANEXO II

Anexo II– Banco de Datos

registro	IG	Peso	CCL	TME LA	sufactante	nº doses
680974	28	960	4000	0	S	1
634196	27	985	8000	2	S	1
681263	32	1365	6000	0	S	1
592896	29	1680	32000	160	S	1
592896	29	1910	3000	0	S	1
682853	26	625	3000	0	S	1
681282	30	1655	5000	2	S	1
682789	35	3020	22000	4	S	1
502203	35	1960	10000	0	S	2
651975	35	2520	6000	3	S	1
699764	26	775	9000	2	S	2
692105	33	2465	3000	5	S	1
679783	32	2230	4000	0	S	3
681898	33	1950	6000	0	S	2
532657	28	765	4000	0	S	1
687247	27	640	3000	0	S	2
698780	33	1505	12000	0	S	2
699365	30	1650	5000	5	S	1
691118	30	1166	8000	7	S	1
680405	26	650	3000	0	S	3
614153	34	2230	0	9	N	0
677762	31	1495	0	90	N	0
644524	34	2225	2000	80	N	0
692131	32	1440	3000	0	N	0
690710	33	1970	3000	80	N	0
679909	30	710	5000	3	N	0
502620	32	2010	6000	0	S	0
681292	27	1205	7000	0	S	0
690958	27	715	7000	6	N	0
702602	29	1090	7000	30	N	0
691180	24	645	8000	7	S	0
680973	36	2500	8000	20	N	0
563650	37	2690	9000	0	N	0
m694873	35	1870	10000	6	N	0
684827	35	2920	11000	1	N	0
681282	30	1515	12000	280	S	0
684652	33	1790	13000	16	N	0
679148	33	2555	14000	0	N	0
537256	30	1580	14000	35	N	0
694324	31	1705	14000	60	N	0
683773	37	2860	15000	2	N	0
696858	35	2295	15000	90	N	0
703766	26	775	16000	1	N	0
696377	32	1330	16000	60	N	0

registro	IG	Peso	CCL	TME LA	sufactante	nº doses
495956	35	2825	16000	90	N	0
681899	36	2800	17000	0	N	0
679706	33	2690	18000	32	N	0
699670	32	2140	18000	110	N	0
612353	35	2355	19000	7	N	0
692185	34	2275	19000	15	N	0
582331	35	2915	20000	0	N	0
677362	35	2650	21000	5	N	0
677362	35	2550	58000	35	N	0
679144	32	1985	22000	140	N	0
674979	35	2200	24000	3	N	0
703172	34	1995	24000	125	N	0
568955	35	2390	25000	75	N	0
679167	34	2280	26000	30	N	0
681156	34	2280	26000	90	N	0
702623	35	2860	29000	12	N	0
691105	36	2465	29000	140	N	0
678662	34	2500	29000	180	N	0
499523	33	1945	29000	240	N	0
689899	34	2215	30000	0	N	0
676594	34	2075	30000	50	N	0
693671	33	1235	31000	0	N	0
284647	34	2135	31000	90	N	0
681115	28	1960	33000	120	N	0
681115	28	1990	19000	1	N	0
681115	28	1815	12000	30	N	0
653931	36	2820	35000	30	N	0
653931	36	2820	35000	40	N	0
703912	33	2055	36000	120	N	0
677755	33	2410	37000	60	N	0
679153	36	1975	38000	60	N	0
581005	32	2220	41000	35	N	0
679181	35	2375	42000	15	N	0
679767	32	1350	42000	110	N	0
679767	32	1995	71000	120	N	0
672632	29	1130	44000	320	N	0
689541	36	2655	45000	70	N	0
668858	36	2670	46000	5	N	0
681247	33	1865	46000	60	N	0
677759	34	2510	46000	120	N	0
686586	32	2310	48000	0	N	0
688225	34	2215	49000	180	N	0
679778	33	2295	50000	20	N	0
602278	34	2890	51000	120	N	0
619002	35	2610	54000	125	N	0
679762	37	3130	55000	40	N	0

registro	IG	Peso	CCL	TME LA	sufactante	nº doses
677782	36	2890	55000	90	N	0
677532	36	2820	55000	120	N	0
682958	36	2935	79000	110	N	0
605802	36	2290	79000	215	N	0
695400	33	1970	81000	250	N	0
503978	36	2710	84000	45	N	0
681829	36	2600	86000	45	N	0
683706	35	2685	86000	75	N	0
622962	29	1240	111000	90	N	0
502082	35	2555	112000	40	N	0
675125	36	2600	116000	150	N	0
504209	36	2445	119000	400	N	0
695327	34	2245	129000	750	N	0
552596	34	2330	134000	180	N	0
673508	35	2280	144000	170	N	0
673508	35	1995	153000	80	N	0
686558	32	2670	147000	70	N	0
684599	34	2170	159000	250	N	0
692480	37	2510	217000	110	N	0
684848	33	2300	225000	0	N	0
690250	35	2305	973000	75	N	0
