

---

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

**CONTAGEM DE CORPOS LAMELARES NA  
SECREÇÃO TRAQUEAL DE RECÉM-  
NASCIDOS PARA AVALIAÇÃO DA  
MATURIDADE PULMONAR**

**ANA CLAUDIA GARCIA VIEIRA**  
*cadicha@terra.com.br*

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Medicina da PUCRS para  
obtenção do título de Doutor em Saúde  
da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Renato M. Fiori

Porto Alegre, 2010

---

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

V658c Vieira, Ana Claudia Garcia

Contagem de corpos lamelares na secreção traqueal de recém-nascidos para avaliação da maturidade pulmonar/ Ana Claudia Garcia Vieira. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

xv; 77 f.: gráf. il. tab. Inclui um artigo científico para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Renato Machado Fiori.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança.

1. LIQUÍDO AMNIÓTICO/citologia. 2. CONTAGEM DE CÉLULAS. 3. SINDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO DO RECÉM NASCIDO. 4. SURFACTANTES PULMONARES. 5. TRAQUEÍIA/secreção. 6. CORPOS LAMELARES. 7. INTUBAÇÃO INTRATRAQUEAL. 8. RECÉM-NASCIDO. 9. PREMATURO. 10. PROGNOSIS. 11. ESTUDOS DE COORTE. 12. ESTUDOS PROSPECTIVOS. I. FIORI, RENATO MACHADO II. Título.

C.D.D. 618.922

C.D.U. 616.23-053.31:611- 018.1(043.2)

N.L.M. WS 280

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

DOUTORANDA: Ana Claudia Garcia Vieira

ENDEREÇO: Rua Fernando Machado, 420/802 – Bairro: Centro

CEP: 90010-320 – Porto Alegre/RS

E-mail: [cadicha@terra.com.br](mailto:cadicha@terra.com.br)

ÓRGÃO FINANCIADOR: CAPES – BOLSA PICDT

CONFLITO DE INTERESSE: NENHUM

---

*“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”.*

*Fernando Pessoa*

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.*

*Cora Coralina*

---

*Dedicatória*

*As minhas filhas Júlia e Isadora pelo amor, companheirismo e pela alegria que  
trouxeram à minha vida!*

*Aos meus pais Alberto e Marleine pelo apoio e pelo exemplo.*

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Renato Machado Fiori, pela sua dedicada orientação, pelo exemplo de vida e pela oportunidade ímpar de aprendizado.

Ao Dr. Humberto Fiori pela constante ajuda, disponibilidade e contribuições neste estudo.

Ao Dr. Mário Wagner pela generosidade em compartilhar seu conhecimento e pela cuidadosa análise dos dados e arte na elaboração dos gráficos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade como bolsista

À dedicada e acolhedora equipe do Setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do HSL-PUCRS

À Carla Rothmann pela amizade, carinho e apoio constante durante o curso

À Ana Clara Cardoso pela disponibilidade, amizade e gentileza em todos os momentos

À Rosaria, Carol e Denise pela delicadeza e cordialidade encontradas na biblioteca da Faculdade de Medicina da PUCRS.

Às enfermeiras e técnicas de enfermagem, corpo clínico e residentes da UTI Neonatal do HSL-PUCRS pela acolhida e apoio na coleta das amostras

Às enfermeiras da UTI Neonatal do Hospital da Criança Conceição: Cleusa, Marta, Ana, Beatriz, Aline e Cátia.

À Dra. Ivana Varela e a Dra. Cátia da UTI Neonatal do Hospital da Criança Conceição.

À enfermeira Denise e Dr. Lauro Hagemann da UTI Neonatal do Hospital Fêmina.

Aos meus colegas do curso pela acolhida e amizade.

Aos professores que através do exemplo diário nos entusiasma e tornam o ambiente acadêmico um lugar efervescente.

Ao colega Gustavo Leivas pela valiosa ajuda com o diluente DTT.

Às minhas colegas da Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Enfermagem pelo incentivo e amizade.

Aos meus irmãos César, Carlos e Cristina pelo apoio e pelos laços que nos unem.

Aos familiares e aos pequenos pacientes, um agradecimento especial, pela condução deste trabalho!

---

---

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELA .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE SIGLAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>

## CAPÍTULO I

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>2</b>
1.1 Epidemiologia .....	5
1.2 Fisiopatologia .....	6
1.3 Apresentação clínica .....	7
1.4 Tratamento da SDR com Surfatante Exógeno .....	9
1.5 Tratamento profilático versus terapêutico.....	10
1.6 Testes de avaliação da maturidade pulmonar .....	12
1.6.1 Relação entre Lecitina e Esfingomielina (relaçãoL/E) .....	14
1.6.2 Dosagem de Fosfatidilcolina Saturada (FCS).....	15
1.6.3 Dosagem de Fosfatidilglicerol (FG) .....	16
1.6.4 Dosagens de Proteínas Específicas do Surfatante.....	17
1.6.5 Teste de Fluorescência de Polarização Automatizada .....	17
1.6.6 Teste de Clements (“shake test”).....	18

---

---

1.6.7 Teste do Clique:.....	18
1.6.8 Teste das Microbolhas Estáveis (TMBE).....	19
1.6.9 Contagem de Corpos Lamelares .....	21
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
<b>4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>

## CAPÍTULO II

<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
5.1 Delineamento .....	41
5.2 População e Amostra .....	41
5.3 Local da pesquisa.....	42
5.4 Método.....	43
5.5 Análise dos dados .....	45
5.6 Procedimentos éticos.....	46
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>

## CAPÍTULO III

<b>7 ARTIGO ORIGINAL .....</b>	<b>49</b>
--------------------------------	-----------

---

**CAPÍTULO IV**

<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
------------------------	-----------

**ANEXOS**

<b>ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO 2 – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO 3 – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP – PUCRS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO 4 – TERMO DE CIÊNCIA GHC.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 5 – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP – GHC .....</b>	<b>77</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1** - Eletromicrografia do pneumócito tipo II com núcleo no canto superior direito e corpo lamellar no meio.  
<http://www.meddean.luc.edu/lumen/bbs/p/ppi10.html>..... 21

### CAPÍTULO III

- Figure 1**- Lamellar body count (LBC/ $\mu$ L) in term infants, preterm without respiratory distress syndrome (RDS) and preterm with RDS..... 66
- Figure 2**- Stable microbubbles (SMB/ $\text{mm}^2$ ) in term infants and preterm infants with and without respiratory distress syndrome (RDS) ..... 67
- Figure 3**- Receiver operator characteristics (ROC) curves for lamellar body count (LBC/ $\mu$ L) and stable microbubble test (SMT) for the diagnosis of respiratory distress syndrome ..... 68
-

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III

<b>Table 1.</b> Study group characteristics .....	65
---	----

---

## LISTA DE SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>AT</b>	Aspirado Traqueal
<b>CCL</b>	Contagem de Corpos Lamelares
<b>CL</b>	Corpos Lamelares
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DMH</b>	Doença da Membrana Hialina
<b>DP</b>	Desvio-padrão
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>FiO<sub>2</sub></b>	<i>Fraction of inspired Oxygen</i> (Fração de Oxigênio Inspirado)
<b>FI</b>	Fentolitra
<b>GHC</b>	Grupo Hospitalar Conceição
<b>HSL</b>	Hospital São Lucas
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>IG</b>	Idade gestacional
<b>L/E</b>	Lecitina/esfingomielina
<b>LA</b>	Líquido Amniótico
<b>mbe</b>	Microbolhas Estáveis
<b>µl</b>	Microlitro
<b>PN</b>	Peso de Nascimento
<b>PUCRS</b>	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

---

<b>RNPT</b>	Recém-Nascido Prematuro ou Pré-termo
<b>RNT</b>	Recém-Nascido a Termo
<b>ROC</b>	Receiver operator characteristic
<b>SDR</b>	Síndrome do Desconforto Respiratório
<b>TME</b>	Teste de Microbolhas Estáveis
<b>VM</b>	Ventilação Mecânica

---

## RESUMO

**Introdução:** A contagem de corpos lamelares (CCL) no fluido amniótico é utilizada amplamente para identificar recém-nascidos em risco da síndrome do desconforto respiratório, que se beneficiariam da profilaxia de surfatante ou terapia muito precoce. O teste de CCL em aspirado traqueal em recém-nascidos ainda não foi explorado.

**Objetivo:** O objetivo foi avaliar o desempenho da CCL em aspirados traqueais de recém-nascidos a termo e pré-termos em ventilação mecânica para predição da Síndrome do Desconforto Respiratório.

**Método:** Recém-nascidos pré-termo <37 semanas com SDR (n=38) e um grupo controle não SDR (n=34), ambos os grupos necessitando ventilação mecânica e com até três dias de vida, foram incluídos no estudo.

O grupo controle foi dividido em 2 grupos: recém-nascidos pré-termo sem SDR (n =16) e recém-nascidos a termo (n=18). CCL foi realizada em um contador automático de células Sysmex XT-1800i (Sysmex Corporation, Japão).

As amostras traqueais foram diluídas em um diluente (Dithiothreitol) sem centrifugação. Para realizar a CCL, foi preparado antecipadamente uma diluição de Dithiothreitol® - DTT (Invitrogen) em água destilada -- 10mg/ml, a qual foi mantida congelada a -20oC em tubos de Eppendorf até ser usada.

A amostra foi acondicionada em um tubo de teste contendo a diluição DTT em uma proporção de 1 parte de aspirado traqueal para 6 partes de DTT. A amostra foi agitada durante 10s e o material foi aspirado pelo contador de células. A CCL foi realizada através do canal de plaquetas. Todos os resultados obtidos foram multiplicados por 7. O teste de microbolhas estáveis foi feito para comparação.

**Resultados:** A mediana e o intervalo interquartil (IQR) da CCL para o grupo SDR foi 38500/μL (14000- 112000), e, para o grupo NSDR foi 826000 (483000-2866500), p<0.001.

Utilizando-se um ponto de corte de 200.000corpos lamelares/μL para predição do diagnóstico de SDR a CCL mostrou uma sensibilidade de 89,5% (IC95%: 76,5-96,6) e uma especificidade de 95,7% (IC95%: 80,4-99,8). Em relação a curva ROC, a área sob a curva foi 0.96(95%IC 0.91-0.99).

**Conclusão:** a CCL em aspirado traqueal pode ser rapidamente e facilmente realizada e poderia ser usada para diagnosticar SDR, auxiliando na decisão de administrar surfatante.

**Descritores:** Síndrome do desconforto respiratório, Surfactante pulmonar, Recém-Nascido Prematuro, Contagem de corpos lamelares, Teste de microbolhas estáveis

---

**ABSTRACT:**

**Background:** Lamellar body count (LBC) in amniotic fluid is widely used to identify infants at risk of respiratory distress syndrome (RDS) who would benefit from surfactant prophylaxis or very early therapy. The LBC test in tracheal aspirates of newborns has not yet been explored.

**Objectives:** The objective was to evaluate the performance of LBC in tracheal aspirates from intubated preterm babies to predict RDS.

**Method:** Preterm infants <37 weeks with RDS (n=38) and a Non-RDS control group (n=34), both needing mechanical ventilation and up to 3 days of age, were included in the study. The control group was divided in 2 groups: preterm infants without RDS (n=16) and term infants (n=18). LBC was performed in an automated cell counter (cell counter Sysmex XT-1800i). The tracheal samples were diluted in a liquefying agent (dithiothreitol) without centrifugation. To perform LBC, diluted Dithiothreitol® - DTT (Invitrogen) in distilled water - 10mg/ml - was prepared in advance. The samples were kept frozen at -20°C in Eppendorf tubes until its use. The sample was placed in a test tube containing the DTT diluted at a ratio of 1 part of tracheal aspirate to 6 parts of DTT. This sample was vortexed for 10s, and the material was aspirated by the cell counter. LBC was performed using the platelet channel. All results obtained were multiplied by 7. The stable microbubble test was done for comparison.

**Results:** The median and interquartile range (IQR) of LBC for the RDS group were 38,500/μL (14,000-112,000), and for the non-RDS group they were 826,000 stable(483,000-2,866,500), p<0.001. The best cutoff point to predict RDS was <200,000 lamellar bodies/μL, with a sensitivity of 89.5% (95%CI: 76.5-96.6) and specificity of 95.7% (95%CI: 80.4-99.8). In the ROC curve the area under the curve for LBC was 0.96(95%CI 0.91-0.99). The comparison of LBC in subgroups (RDS vs. Non-RDS preterm infants and only infants ≤31 weeks gestation with vs. without RDS) showed also significant lower values in RDS groups (p<0.001).

**Conclusions:** LBC in tracheal aspirates can be rapidly and easily performed and may be used to diagnose RDS, thus helping in the decision to administer surfactant.

**Key Words:** Respiratory distress syndrome, Pulmonary surfactant, Preterm Newborn, Lamellar body count, Stable microbubble test

---

---

# CAPÍTULO I

---

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

A Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) do recém-nascido é a patologia neonatal mais estudada e conhecida pelo fato de ser a principal causa de dificuldade respiratória grave no período neonatal.

A SDR remete à observação de Hochleim em 1903 quando ele descreveu a existência de “membranas hialinas” no pulmão de dois prematuros que faleceram após o nascimento, o que levou à denominação de Síndrome da Doença da Membrana Hialina, muitas vezes usada até os dias atuais.<sup>1</sup>

A identificação da presença de uma tensão superficial pulmonar e o conhecimento do papel do surfatante na fisiologia respiratória surge em decorrência dos estudos de Kurt von Neergard, em 1929. Ao estudar pulmões isolados de porcos, mediu as curvas pressão volume, enchendo-os com ar e líquido. O uso do líquido eliminou a tensão superficial, permitindo a Neergard deduzir que esta era a maior responsável pelas forças envolvidas no esvaziamento pulmonar. O fisiologista também afirmou que a lei de Laplace, contendo uma relação matemática entre a força, a tensão

---

superficial e o raio de uma superfície curva, deveria ser aplicada para explicar a expansão e a retração dos alvéolos pulmonares. Apesar de estar convicto de que seus achados se aplicavam aos recém-nascidos, a importância de seu trabalho não teve muita repercussão no desenvolvimento das pesquisas posteriores sobre o surfatante pulmonar.<sup>2</sup>

Wilson e Faber,<sup>3</sup> em 1933, ao discorrerem sobre a patogênese das atelectasias nos pulmões dos recém-nascidos referiram que a resistência inicial do pulmão atelectásico à expansão era sempre presente e contribuía para a manutenção da atelectasia.

Em 1947, desconhecendo o estudo de von Neergard, o patologista Peter Gruenwald<sup>4</sup> realizou o mesmo experimento do fisiologista suíço, confirmando seus achados.

Macklin,<sup>5</sup> em 1954, descreveu a existência de um filme de mucopolissacarídeos nas paredes dos alvéolos capaz de gerar tensões superficiais favoráveis e constantes, além de sugerir a possível origem dessas substâncias nos grânulos das células alveolares.

Em 1955, Richard Pattle<sup>6,7</sup> trabalhava com armas químicas na Inglaterra e estudou a espuma oriunda do edema pulmonar causado por gases tóxicos. Ele observou que as bolhas formadas pela secreção de origem pulmonar apresentavam vida muito mais longa do que as formadas por outros tecidos e, até mesmo, mais do que as formadas por detergentes comuns. Concluiu então que os alvéolos deveriam ser recobertos por uma camada de substâncias com

---

uma tensão superficial muito baixa. Percebeu, também, que as bolhas originárias dos pulmões dos fetos de porcos, retirados prematuramente, não apresentavam estabilidade como as de pulmões de animais nascidos de forma não prematura.

Os achados de John Clements<sup>8,9</sup> estabeleceram as importantes características da camada que reveste os alvéolos; ele mostrou que os filmes da superfície alveolar tinham sua tensão superficial reduzida de 45 para menos de 10 dinas/cm<sup>2</sup>, à medida que a superfície era comprimida a 30% de sua área. Denominou o material, presumivelmente presente na interface ar-líquido do alvéolo, de surfatante pulmonar, ressaltando seu papel como um fator anti-atelectásico.

Em 1959, Mary Ellen Avery e Jere Mead,<sup>10</sup> empregando a técnica modificada por Clements, estudaram os extratos pulmonares de prematuros falecidos com a doença da membrana hialina e demonstraram que a doença era causada pela deficiência de surfatante pulmonar.

As pesquisas sobre os mecanismos e formas de tratamento da SDR prosseguiram de maneira intensa, culminando com o emprego bem sucedido de surfatantes exógenos no tratamento dos prematuros afetados com a doença, a partir dos trabalhos de Fujiwara<sup>11</sup> e colaboradores, em 1980.

Atualmente, denominada de Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) esta patologia que há décadas têm despertado o interesse dos pediatras e neonatologistas, persiste como importante causa de morbidade e mortalidade

---

neonatal, apesar de se dispor de terapias específicas e extremamente eficazes.<sup>12</sup>

### **1.1 Epidemiologia**

A ocorrência da SDR é em torno de 1% de todos os recém-nascidos e 5 a 10% de todos os recém-nascidos pré-termo. Naqueles com idade gestacional inferior a 30 semanas a prevalência aproximada é de 60%, reduzindo-se para próximo a zero ao redor das 39 semanas.<sup>12,13</sup>

Outras situações clínicas, além da prematuridade, aumentam o risco de ocorrência de SDR. Estas incluem a diabetes materna, o sexo masculino, a cesariana sem anterior trabalho de parto, a hemorragia materna pré-parto, a existência de um prematuro acometido com a SDR, a asfixia neonatal, a eritroblastose fetal e a condição de ser o segundo gêmeo a nascer.<sup>14,15</sup>

Há fatores protetores os quais reduzem a prevalência da doença. Dentre eles estão incluídos: raça negra, a ruptura prematura das membranas amnióticas, a doença hipertensiva materna, o retardo de crescimento intra-uterino, o estresse materno e o uso de corticóide pré-natal. Este último altera a incidência da doença por sua ação de indução à produção de surfatante endógeno.<sup>14,15</sup>

---

## 1.2 Fisiopatologia

A deficiência do surfatante pulmonar é o principal fator na fisiopatologia da SDR. Isto ocasiona um aumento das forças que tendem a colapsar os alvéolos ao final de cada expiração e também um aumento das forças necessárias para a expansão desses no início de cada inspiração. Este incremento do trabalho dos músculos respiratórios para re-expandir os alvéolos é dificultado pela elevada complacência da caixa torácica cartilaginosa que colapsa parcialmente na inspiração e impede que um volume adequado de ar entre nos pulmões. Inicialmente, esta diminuição do ar corrente pulmonar é compensada por um aumento da frequência respiratória. Com o passar do tempo ocorre fadiga da musculatura respiratória, o que contribui para a evolução do quadro clínico.<sup>13,15</sup>

A combinação destes fatores ocasiona o desenvolvimento progressivo de atelectasias pulmonares com diminuição da capacidade residual pulmonar. Como consequência há diminuição da relação entre ventilação e perfusão, ocasionando hipoxemia e acidose.

Em decorrência dessas alterações, produz-se lesão do epitélio alveolar e dos bronquíolos terminais, com perda de fibrina e fluidos para dentro das vias aéreas, formando-se depósitos proteináceos conhecidos como membranas hialinas.<sup>1,13,15</sup>

A produção de surfatante pode ser afetada pela presença de acidose, hipoxemia e outras alterações que foram produzidas inicialmente pela

---

deficiência de surfatante. A função do surfatante também pode ser afetada pela presença das substâncias extravasadas para o alvéolo de modo a piorar ainda mais o quadro clínico. Deste modo, estabelece-se um círculo vicioso.

As terapias instituídas influenciam a evolução da doença, provocando lesões secundárias à ventilação mecânica e à oxigenioterapia. Já a terapia específica com surfatante exógeno modifica profundamente a história natural da doença, e conseqüentemente, sua evolução fisiopatológica clássica é vista raramente nos dias atuais.<sup>13</sup>

Os achados anátomo-patológicos classicamente descritos em prematuros cuja causa de óbito era a doença da membrana hialina eram de atelectasia difusa, com alguns poucos alvéolos dilatados e presença de membranas eosinofílicas. Sinais de edema e hemorragia são características comuns, e lesão epitelial é evidente na região dos bronquíolos que se encontram distendidos. A presença de membranas eosinofílicas é a razão porque a SDR costumava ser chamada de Doença da Membrana Hialina. No entanto, o fato desses achados não serem exclusivos e nem a causa da SDR, favoreceu o abandono dessa denominação.<sup>14</sup>

### **1.3 Apresentação clínica**

Desde o nascimento os recém-nascidos com SDR apresentam sinais de dificuldade respiratória: taquipnéia, batimento das asas nasais, retrações

---

torácicas (esternal, subcostal e intercostal), gemido expiratório, cianose em ar ambiente e diminuição do murmúrio vesicular. Crepitações podem ser ouvidas. A doença é progressiva nas primeiras 48-72 horas com demandas crescentes de oxigênio suplementar e piora da disfunção respiratória. Recém-nascidos muito imaturos costumam apresentar insuficiência respiratória muito precocemente.<sup>1,14,15</sup>

Dentre as complicações pulmonares podem ocorrer pneumotórax, enfisema intersticial, e displasia broncopulmonar, sendo que esta última repercute em longo prazo, interferindo no desenvolvimento dos sobreviventes e aumentando os riscos de internações e morte durante o primeiro ano de vida.<sup>1,14,15</sup>

Do ponto de vista radiológico, a síndrome caracteriza-se por um infiltrado retículo - granular difuso (que é a manifestação das micro-atelectasias difusas – “vidro esmerilhado”) e broncogramas aéreos. Os pulmões mostram-se pouco insuflados, com exceção dos prematuros maiores que conseguem manter seus pulmões bem insuflados até o quadro tornar-se avançado. O uso de ventilação com pressão positiva pode dificultar a avaliação dos sinais radiológicos. Nos quadros mais graves, o exame radiológico pode mostrar opacificação pulmonar difusa, contrastando apenas com a imagem dos brônquios.<sup>1,14,15</sup>

O diagnóstico de SDR é baseado na observação de um quadro de sofrimento respiratório em um recém-nascido pré-termo, acompanhado de um

---

exame radiológico compatível. Em relação aos critérios laboratoriais, estes não são frequentemente utilizados para este fim.<sup>12</sup>

Apesar dos recentes avanços em perinatologia, ainda existem controvérsias em relação ao manejo da SDR, e o que tem sido recomendado é que para o manejo mais adequado sejam adotadas intervenções que maximizem o número de sobreviventes enquanto minimizam os potenciais efeitos adversos.<sup>16</sup>

#### **1.4 Tratamento da SDR com Surfatante Exógeno**

Na década de 60 houve as primeiras tentativas do emprego de substâncias surfatantes exógenas para o tratamento da SDR. A falta de êxito na utilização destas substâncias deveu-se ao fato de que elas produziam diminuição da tensão superficial somente na interface ar-líquido, mas não agiam da mesma forma que o surfatante pulmonar endógeno, ou seja, eram incapazes de diminuir a tensão superficial para valores mínimos a medida que a superfície era reduzida, como acontece no final da expiração nos alvéolos.

Em 1980, Fujiwara<sup>11</sup> e colaboradores descreveram, pela primeira vez, o uso bem sucedido de surfatante exógeno no tratamento da SDR. A partir daí, inúmeros estudos clínicos sobre o tratamento da SDR com tipos diferentes de surfatantes exógenos foram realizados e essa terapia tornou-se prática rotineira

---

em unidades que atendem recém-nascidos prematuros, tendo modificado completamente a história natural desta síndrome.

Esses estudos compararam o uso profilático ou terapêutico do surfatante em relação a controles e foram agrupados através de cuidadosas metanálises. Os resultados evidenciaram os efeitos benéficos desta terapêutica. A incidência de pneumotórax e enfisema intersticial é acentuadamente reduzida, além da mortalidade.

### **1.5 Tratamento profilático versus terapêutico**

Há duas abordagens que têm sido propostas: a abordagem profilática e a abordagem terapêutica (ou terapia de resgate).

O uso terapêutico do surfatante pressupõe o diagnóstico prévio de SDR. O diagnóstico é feito pela presença de sinais clínicos, evolução e exame radiológico compatíveis com a síndrome. Como a atelectasia é progressiva, isso impede que o diagnóstico seja logo evidenciado e, dessa forma, o quadro encontra-se avançado quando o exame radiológico é característico.<sup>17</sup>

Na técnica terapêutica, o surfatante é administrado apenas em pacientes com SDR estabelecida. A vantagem é de se tratar apenas pacientes com doença clínica. É a modalidade de tratamento mais utilizada para prematuros mais próximos ao termo, em que o risco de imaturidade pulmonar e o risco de morte são menores.<sup>17</sup>

---

A outra forma de administração de surfatante é a profilática, a qual teve origem a partir de estudos experimentais em animais que mostraram que pulmões imaturos, deficientes de surfatante, apresentam lesão pulmonar secundária à ventilação muito precocemente.<sup>17</sup> A vantagem da administração profilática é a de repor surfatante antes do início da insuficiência respiratória, reduzindo a necessidade de suporte ventilatório e, reduzindo o barotrauma.<sup>18</sup>

Nos primeiros estudos que compararam o uso profilático com o uso terapêutico de surfatante exógeno, Egberts<sup>18</sup> e colaboradores, Merrit et al<sup>19</sup> e Dunn et al<sup>20</sup> não encontraram diferenças significativas entre as duas abordagens.

Dentre os estudos que mostraram vantagens na abordagem profilática sobre a abordagem terapêutica estão os estudos de Brown,<sup>21</sup> Bevilacqua,<sup>22</sup> Kendig<sup>23</sup> e Walti.<sup>24</sup>

O estudo de metanálise de Soll e Morley,<sup>25</sup> e os estudos de Egberts et al,<sup>26</sup> de Walti et al<sup>27</sup> favorecem o uso da administração profilática. Morley,<sup>28</sup> ao proceder uma revisão sistemática sobre o uso profilático de surfatante, comparando com o tratamento com o surfatante, encontrou uma mortalidade neonatal significativamente reduzida com surfatante profilático, equivalente a uma redução de 39% nas mortes neonatais. Também foram significativas as reduções de risco de pneumotórax, enfisema pulmonar intersticial e SDR grave. Não foram encontradas diferenças significativas em displasia broncopulmonar, hemorragia ou leucomalácia periventricular, ductus arteriosus patente,

---

enterocolite necrosante e retinopatia da prematuridade. Os dados da revisão de Morley sugerem que, em menores de 32 semanas de idade gestacional, o surfatante profilático seja benéfico. Embora a administração profilática aumente a exposição ao tratamento e o seu custo (aproximadamente o dobro dos pacientes em risco de desenvolver SDR receberiam surfatante usando a abordagem profilática), os benefícios clínicos parecem ser significativos para justificar esses gastos.<sup>25</sup>

Idealmente, esta profilaxia (ou tratamento precoce) com surfatante pulmonar exógeno deveria ser realizada após a comprovação de deficiência de surfatante. A possibilidade de utilização de um teste rápido realizado anteriormente ou imediatamente após o nascimento, poderia beneficiar pacientes com risco muito elevado de desenvolver SDR, entretanto ainda não são disponíveis testes suficientemente acurados para este fim.

### **1.6 Testes de avaliação da maturidade pulmonar**

O interesse pelo desenvolvimento de testes capazes de predizer o desenvolvimento da patologia pulmonar em recém-nascidos prematuros surgiu a partir da associação entre deficiência de surfatante pulmonar e SDR. Observou-se que líquidos orgânicos como o líquido amniótico, a secreção gástrica e a secreção traqueal continham surfatante e que a ausência ou

---

redução do surfatante nestes fluidos correlacionavam-se com posterior desenvolvimento de SDR.<sup>12</sup>

Uma série de testes bioquímicos e biofísicos foi desenvolvida nestas últimas quatro décadas, e quando surgem muitos testes para a mesma finalidade pode indicar que nenhum deles é 100% satisfatório.

Usualmente, o teste considerado “padrão ouro” tem sido da relação lecitina/esfingomielina. Entretanto, os testes bioquímicos não são adequados como testes de beira de leito pois sua execução é demorada, além de serem caros. Dos testes biofísicos os mais promissores para uso clínico rotineiro pela sua praticidade, rapidez de execução e baixo custo são o teste do clique, o teste das microbolhas estáveis e a contagem de corpos lamelares.

Os testes de maturidade pulmonar podem ser divididos didaticamente em dois grupos: os testes que dosam a presença do material surfatante no líquido amniótico e aqueles que testam a função surfatante presente nesse líquido.<sup>29</sup>

Entre os testes de dosagem incluem-se, entre outros, a relação lecitina/esfingomielina, a dosagem da fosfatidilcolina saturada, a dosagem do fosfatidilglicerol, o perfil dos fosfolipídios, a dosagem das proteínas específicas do surfatante e a contagem dos corpos lamelares. Já os testes de função surfatante baseiam-se na capacidade dessa substância de diminuir a tensão superficial nos líquidos provenientes das vias aéreas.

---

### **1.6.1 Relação entre Lecitina e Esfingomielina (relaçãoL/E)**

Proposto por Gluck<sup>30</sup> e colaboradores em 1971, consiste de uma extração lipídica com uso de metanol, clorofórmio e acetona, com separação posterior das frações por cromatografia de camada fina. As frações, lecitina (L) e esfingomielina (E), são medidas por densitometria. A lecitina (fosfatidilcolina) é o principal componente do surfatante, e a esfingomielina é um lipídio inespecífico. O aumento da concentração de lecitina em relação à esfingomielina é indicativo de maturidade pulmonar fetal, quando o teste é feito com líquido amniótico. A relação lecitina/esfingomielina foi o teste mais utilizado, sendo substituído, posteriormente, pelo teste do perfil dos fosfolipídios, que é mais acurado.<sup>30,31</sup>

Diversos autores sugeriram modificações no método de dosagem criado por Gluck,<sup>30</sup> sendo que alguns tornaram o método mais simplificado e outros obtiveram discreta melhoria na sua acurácia. Entretanto, estas modificações não tiveram impacto na relevância clínica dos resultados.

Vários estudos avaliaram a acurácia do teste no líquido amniótico para predição de SDR ou o utilizaram para compará-lo a outros testes. A relação L/E acima de 2 é associada com maturidade pulmonar, com valores preditivos negativos próximos a 100%. Valores da relação L/E menores que 1 apresentam especificidade próxima a 100%. A maior dificuldade de interpretação ocorre com valores intermediários entre 1 e 2, o que se torna um problema, especificamente em recém-nascidos prematuros que não costumam apresentar

L/E elevadas. Assim, um considerável número de pacientes pode encontrar-se nesta faixa e não desenvolver a síndrome.<sup>12</sup>

Um outro aspecto que dificulta a interpretação do teste está relacionado à presença de sangue ou mecônio na amostra de líquido amniótico obtida, que tende a deslocar o resultado mais para próximo a 2.

Diabete Melito, Asfixia e Eritroblastose Fetal elevam o valor necessário para predizer maturidade pulmonar, enquanto que em pacientes de cor negra, valores acima de 1,2 são associados com maturidade pulmonar.<sup>12</sup>

As secreções faríngea, traqueal, e gástrica, também foram utilizadas para estudo deste teste, mostrando associação com desenvolvimento de SDR. Ocorre que nestes fluidos, os resultados dos testes são menos precisos do que os encontrados no líquido amniótico e apenas podem ser realizados após o nascimento do bebê.<sup>12</sup>

A realização do teste demanda algumas horas, tem custo alto e requer pessoal treinado. Foi muito usado antes da terapia com surfatante. Entretanto, há um consenso atual de que os riscos da amniocentese, agregados aos custos, não justificam o seu uso rotineiro.<sup>12</sup>

### **1.6.2 Dosagem de Fosfatidilcolina Saturada (FCS)**

A FCS é o principal componente do surfatante e é encontrada em concentrações muito baixas em outros fluidos orgânicos. Estudos com amostras

---

de líquido amniótico evidenciaram resultados superiores aos da relação L/E para prever SDR e demonstraram que a contaminação por sangue ou mecônio não interfere nesses resultados.

Torday et al,<sup>32</sup> ao estudarem amostras de líquido amniótico, obtiveram resultados superiores aos da relação L/E para prever SDR. Nesse estudo, a sensibilidade foi de 98% e especificidade de 92%.

Alvarez et al<sup>33</sup> testaram uma técnica mais rápida e simplificada, com resultados superiores aos obtidos com a relação L/E e com o TDx:

### **1.6.3 Dosagem de Fosfatidilglicerol (FG)**

O FG é um marcador do surfatante maduro e pode ser dosado por cromatografia de camada fina. A presença do mesmo no líquido amniótico prediz acuradamente a maturidade pulmonar. Por outro lado, a acurácia em prever a imaturidade pulmonar não é satisfatória. Sangue, mecônio ou muco produzem poucas alterações no resultado do teste, sendo que a presença de bactérias, que contém fosfatidilglicerol, podem produzir falsos resultados.<sup>12</sup>

---

#### **1.6.4 Dosagens de Proteínas Específicas do Surfatante**

As dosagens das proteínas específicas do surfatante também foram propostas para a avaliação do estágio de maturidade do surfatante. Imunoensaio e ELISA foram descritos para dosar as apoproteínas A e B (PS-A e PS-B). A acurácia da dosagem da PS-A é aceitável, mas pouco acrescenta aos resultados das dosagens mais tradicionais (L/E + FG).<sup>12</sup>

#### **1.6.5 Teste de Fluorescência de Polarização Automatizada**

É um teste automatizado, que mede a fluorescência de polarização de um corante adicionado ao líquido amniótico (Abbott TDx analyzer – Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA). Mede concentrações de surfatante e albumina. O resultado é obtido em 30 minutos após a amostra ser introduzida no equipamento e, por ser automatizado, reduz erros de técnica associados ao operador. O resultado é obtido em 30 minutos após a amostra ser introduzida no equipamento.<sup>12</sup>

Alguns estudos foram realizados e mostraram excelente correlação entre o teste no líquido amniótico e a relação L/E. Valores inferiores a 40 mg/g indicam imaturidade, enquanto que valores acima de 60 mg/g indicam maturidade pulmonar fetal. Embora o teste tenha boa acurácia, bilirrubina, sangue e mecônio interferem nos resultados.<sup>12</sup>

---

### **1.6.6 Teste de Clements (“shake test”)**

Inicialmente proposto por Clements,<sup>34</sup> o teste tornou-se conhecido pelo nome de seu idealizador. Pode ser realizado com amostras de líquido amniótico ou de secreção gástrica. Uma amostra de secreção é adicionada a igual parte de etanol a 95% em um tubo de ensaio. A função do etanol é reduzir o número de bolhas, só permanecendo aquelas que tenham uma substância com ação surfatante mais poderosa. Agita-se a mistura vigorosamente por 15 segundos e lê-se o teste após 15 minutos. A presença e distribuição das bolhas de ar, vistas a olho nu, determinam a positividade do teste.<sup>12</sup>

### **1.6.7 Teste do Clique:**

O teste do Clique foi desenvolvido por Pattle,<sup>7</sup> quando se realizavam as primeiras pesquisas sobre o surfatante pulmonar. Baseia-se no fenômeno do clique, que consiste na expansão e contração repentinas e repetitivas das bolhas em contato com a água desaerada. A presença de material surfatante pulmonar é essencial para que isso ocorra. Esse fenômeno é visto ao microscópio e sua presença indica um resultado positivo.

---

### **1.6.8 Teste das Microbolhas Estáveis (TMBE)**

Foi também desenvolvido por Pattle e colaboradores<sup>6,7,35</sup> e depende da capacidade das secreções que contêm surfatante de formar bolhas estáveis com menos de 15 micrômetros. A contagem destas microbolhas estáveis (MBE) avalia a maturidade da função surfatante. O teste pode ser realizado em líquido amniótico, no aspirado gástrico ou até no aspirado traqueal de recém-nascidos.

O primeiro estudo que analisava os resultados do TMBE em líquido amniótico e sua relação com a SDR, além de compará-lo com a Relação L/E e com o Teste de Clements foi publicado por Pattle et al<sup>35</sup> em 1979. Esse estudo mostrou que uma contagem de mais de 20 microbolhas estáveis por milímetro quadrado (mbe/mm<sup>2</sup>) no TMBE apontava maturidade pulmonar. Pelo fato do estudo ter comparado o TMBE com a Relação L/E, Pattle e colaboradores sugeriram que fosse dispensada a realização do teste L/E, quando contagens elevadas de microbolhas estáveis fossem encontradas. Também concluiu que o teste era simples, rápido e de fácil execução. Porém, o teste recebeu pouca atenção.<sup>12</sup>

A técnica, já descrita por outros autores,<sup>36-41</sup> consiste em formar bolhas com a amostra através de uma pipeta de Pasteur, e o número de microbolhas estáveis (as quais permanecem após 4 minutos) é contado com objetiva de 10 vezes (10x10), em um milímetro quadrado.

Teeratakulpisarn e colaboradores<sup>37</sup> realizaram o teste com aspirado gástrico de recém-nascidos, utilizando um ponto de corte  $\leq 20$  microbolhas estáveis por milímetro quadrado (mbe/mm<sup>2</sup>) e encontraram sensibilidade e especificidade em torno de 95% e valor preditivo negativo acima de 99% para identificar recém-nascidos com deficiência de surfatante.

No estudo de Boo et al<sup>41</sup>, foram analisadas 104 amostras de aspirado traqueal, sendo que o TME igual ou menor a 70 mbe/mm<sup>2</sup> teve a maior acurácia para o diagnóstico de SDR, com uma sensibilidade de 97,7% e especificidade de 90,3%.

Berggren<sup>42</sup> verificou correlação significativa entre a atividade surfatante, evidenciada pela porcentagem de microbolhas na amostra e a severidade da SDR.

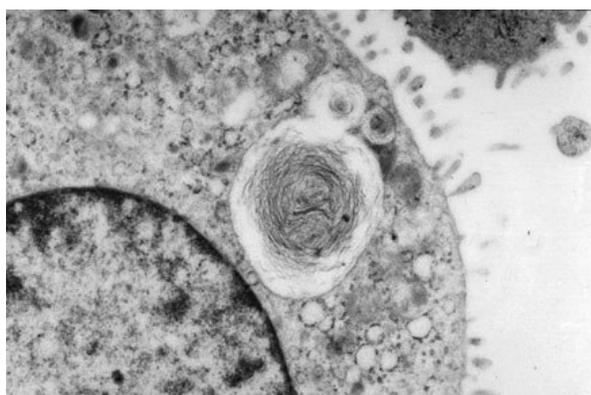
Fiori et al<sup>36</sup>, em estudo desenvolvido na PUCRS, por analisaram 110 RNPT, sendo 40 RNs com idade gestacional menor que 32 semanas e 70 RNs com idade gestacional entre 32 e 34 semanas, comparando o TME com o Teste do Clique. Vinte e três pacientes (20,9%) preencheram o diagnóstico para SDR. Quando foi utilizado um ponto de corte de 10 mbe/mm<sup>2</sup> ou menos para definir o diagnóstico de SDR, a sensibilidade foi de 73,9% e especificidade de 92%. Aumentando-se este valor para até 15 mbe/mm<sup>2</sup> a sensibilidade aumentava para 82,6% enquanto que a especificidade diminuía para 85,1%. A conclusão foi de que o TME mostrou-se superior ao Teste do Clique e que o uso em conjunto não melhorou a capacidade de predição.

---

Eckert Seitz et al,<sup>39</sup> realizaram outro estudo na mesma instituição, com amostras de secreção traqueal de 74 recém-nascidos que necessitaram de VM. A contagem de microbolhas foi significativamente menor nos grupos SDR e Síndrome de Aspiração de Mecônio quando comparada com os outros grupos (com pneumonia, outras doenças cardíacas/pulmonares). Ao adotarem um ponto de corte de 120 mbe/mm<sup>2</sup> , mostrou alta acurácia para o diagnóstico de SDR com sensibilidade de 96.3% e especificidade de 97.6% .

#### **1.6.9 Contagem de Corpos Lamelares**

Os corpos lamelares são estruturas produzidas pelos pneumócitos II, onde são estocadas as substâncias surfatantes que serão lançadas nos alvéolos pulmonares. A contagem de corpos lamelares no líquido amniótico tem sido já amplamente utilizada para predizer a maturidade pulmonar fetal.<sup>43</sup>



**Figura 1** - Eletromicrografia do pneumócito tipo II com núcleo no canto superior direito e corpo lamellar no meio. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/bbs/p/ppi10.html>.

Como os corpos lamelares (1,7 a 7,3fl ou 1 a 5  $\mu\text{m}$ ) têm a mesma dimensão das plaquetas (5 a 7fl ou 2 a 4  $\mu\text{m}$ ) podem ser facilmente contados em um fluido não contendo sangue num aparelho contador de células o qual é disponível em quase todos os laboratórios para realizar hemogramas.<sup>44</sup>

É um método rápido, de baixo custo, não requer centrifugação nem interpretação subjetiva, pois é a máquina que realiza a contagem. A unidade de medida é o número de CL contados por microlitro ( $\mu\text{L}$ ).

A contagem dos corpos lamelares no líquido amniótico tem sido cada vez mais usada pelos obstetras em lugar da relação L/E.

O primeiro estudo de contagem de corpos lamelares (CCL) em líquido amniótico foi realizado por Dubin<sup>44</sup> em 1989. A partir disso, foram desenvolvidos novos estudos para prever a maturidade pulmonar através da CCL neste fluido.

Roiz-Hernandez,<sup>45</sup> encontrou sensibilidade de 92,3% e especificidade de 70,9% com valor preditivo negativo de 98,1% sendo considerado um bom teste diagnóstico. Pearlman<sup>46</sup> encontrou sensibilidade de 95% e sensibilidade de 83%, utilizando o LA para CCL.

Vários estudos demonstraram a alta correlação entre a CCL e outros métodos usados para testar a maturidade pulmonar fetal.<sup>46-48</sup>

Um estudo multicêntrico<sup>43</sup> no qual cada centro adotava um protocolo de realização da CCL, com diferentes pontos de corte, revelou valores preditivos acima de 94% similares à relação L/E.

---

Fakhoury<sup>49</sup> observou o aumento exponencial da concentração de CL no LA com o desenvolvimento da gestação e uma correlação linear da CCL com a relação L/E.

O estudo de Dalance<sup>50</sup> e colaboradores mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 64%, usando um ponto de corte de 30.000 CL/mL e sensibilidade de 75% e especificidade de 95%, usando 10.000 CL/mL, para o definir o diagnóstico de SDR.

Anceschi<sup>51</sup> verificou uma correlação positiva entre a CCL no LA e a evolução da idade gestacional. A comparação da CCL com testes clássicos de maturidade pulmonar fetal (relação L/E, presença de fosfatidilglicerol e teste de Clements) em relação ao desenvolvimento de SDR, resultou em valores semelhantes em relação à acurácia. Para a CCL, a sensibilidade foi de 92% e a especificidade foi de 89%, com valor preditivo negativo de 98%.

Estudo de metanálise<sup>52</sup> mostrou que a CCL no LA tem um desempenho igual ou superior a já estabelecida relação L/E para predizer o desenvolvimento de SDR, tendo sido considerada a CCL um teste para primeira escolha na avaliação da maturidade pulmonar fetal por ser um teste mais rápido e de menor custo que a relação L/E.

De Roche<sup>53</sup> demonstrou uma possível vantagem da utilização da CCL em pacientes com gestação comprometida por diabetes mellitus e encontrou números de CL similares aos encontrados em gestações sem diabetes, como ocorre com a relação L/E.

---

Neerhof<sup>54</sup> propôs um protocolo de padronização para a realização da CCL no líquido amniótico

- 1- misturar a amostra de LA invertendo o frasco 5 vezes;
- 2- transferir o líquido para um frasco de teste transparente;
- 3- excluir as amostras que contenham muco ou mecônio;
- 4- colocar o tubo em um agitador por 2 minutos;
- 5- passar o diluente no contador de células até que o zero seja obtido em duas vezes consecutivas;
- 6- passar a amostra no contador de células e registrar o número lido no canal de plaquetas como o número de CL;
- 7- comunicar o médico se o valor do hematócrito exceder 1% (obtido no canal de hematócrito).

A interpretação proposta pelo protocolo é a seguinte: pulmões maduro se a CCL for  $\geq 50.000$ , transição se  $> 15.000$  a  $< 50.000$  e imaturo se  $\leq 15.000/\text{mL}$ .<sup>54</sup>

Gantar e Babnik<sup>55</sup> utilizaram a CCL no aspirado gástrico para avaliar a maturidade pulmonar de pacientes cujo líquido amniótico continha substâncias potencialmente inibidoras do surfatante. Embora o método não tenha sido descrito, foram encontrados valores baixos nos pacientes que desenvolveram SDR em relação aos que não desenvolveram a doença.

Verder e colaboradores<sup>56</sup> analisaram amostras de aspirado gástrico de 108 pacientes com menos de 32 semanas de idade gestacional, comparando as com a evolução clínica da SDR. As amostras foram centrifugadas a 500 x G por 2 minutos e depois foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por tempo não informado, antes

---

de serem analisadas em aparelho Sysmex. O melhor ponto de corte foi 2.000 CL/ $\mu$ L, com sensibilidade de 73% e especificidade de 70% para o desenvolvimento de SDR.

No estudo de Pieruccini et al,<sup>57</sup> desenvolvido na PUCRS, a CCL em aspirado gástrico de recém-nascidos a termo e pré-termo mostrou boa correlação com a idade gestacional, sendo menores as CCL nos recém-nascidos pré-termo.

Fiori<sup>58</sup> et al, também em estudo realizado na PUCRS, evidenciou que dos 98 RNs que tiveram o TME analisados no aspirado gástrico, 54 receberam surfatante por apresentarem TME inferior a 25 mbe/mm<sup>2</sup>. Os outros 44 RNs em que o TME foi maior que 25 mbe/mm<sup>2</sup>, apenas três necessitaram terapia de resgate. O surfatante foi usado em 82% dos RNPt menores de 28 semanas e em 49% nos RNPt entre 28 e 31 semanas, evitando-se neste grupo aplicar desnecessariamente surfatante em 51%.

Em recente estudo realizado na PUCRS, Daniel et al<sup>59</sup> analisou amostras de aspirado gástrico de 63 pacientes com idade gestacional entre 24 e 34 semanas. Ao utilizar um ponto de corte de 42000 CL/ $\mu$ l, encontrou uma sensibilidade de 92% e especificidade de 86% para o diagnóstico de RDS. Ainda no presente estudo o TME no aspirado gástrico apresentou um valor mais baixo no grupo com SDR e se mostrou acurado para predizer SDR, semelhante aos resultados de estudos anteriores, também realizados nesta instituição.<sup>12,39,57,60</sup>

---

## 2 JUSTIFICATIVA

Está claro que o uso profilático ou muito precoce de surfatante produz melhores resultados do que o uso mais tardio, após o estabelecimento do diagnóstico clínico.

No entanto, a administração de surfatante não é um procedimento isento de riscos e o custo da medicação é elevado. Há, também, dentre os recém-nascidos muito imaturos, alguns, com ou sem distúrbio respiratório, que não apresentam deficiência de surfatante e, portanto, que não se beneficiarão de administração de surfatante exógeno.

Em consequência disso, existe uma necessidade premente de se estudar novos métodos de avaliação da maturidade pulmonar de recém-nascidos que possibilitem rapidez na execução, que sejam confiáveis, de fácil acesso e de baixo custo, a fim de se verificar, logo após o nascimento, quais recém-

---

nascidos se beneficiariam da administração do surfatante exógeno. Os testes biofísicos parecem ser os mais adequados para atender estes objetivos. No líquido amniótico, vários métodos já foram estudados com esta finalidade.

O líquido amniótico é em geral mais difícil de obter e não se dispõe em recém-nascidos transferidos.

Estudos realizados por Pieruccini et al<sup>57</sup> e Daniel et al<sup>59</sup> na PUCRS mostraram que a contagem de corpos lamelares no aspirado gástrico em recém-nascidos a termo e pré-termo era rápida e de baixo custo. Nestes estudos, algumas dificuldades técnicas relacionadas à falta de homogeneidade e viscosidade das secreções, dificultando a passagem dos fluidos no contador de partículas, foram solucionadas.

Considerando-se a consistente linha de pesquisa na qual este estudo está inserido, evidenciada pela aplicabilidade clínica destes trabalhos desenvolvidos na instituição e, tendo em vista a inexistência de estudos disponíveis na literatura, avaliando a contagem de corpos lamelares no aspirado traqueal, objetivamos com esta pesquisa contribuir para aprimorar o conhecimento que vise à melhoria do manejo de recém-nascidos com dificuldade respiratória.

---

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

- Estudar a contagem de corpos lamelares no aspirado traqueal de recém-nascidos para avaliação da maturidade pulmonar.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a factibilidade da contagem dos corpos lamelares (CCL) no aspirado traqueal de recém-nascidos;
  - Avaliar a acurácia da CCL no aspirado traqueal para o diagnóstico de imaturidade pulmonar no recém-nascido;
-

- Comparar a acurácia da CCL com a acurácia da contagem de microbolhas estáveis (MBE) no aspirado traqueal;

## 4 REFERÊNCIAS

1. Avery ME, Fletcher BD. The lung and its disorders in the newborn infant. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1974.
  2. Obladen M. History of surfactant research. In: Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ, editors. Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice. Amsterdam: Elsevier Science; 1992. p.1-18.
  3. Wilson JL, Faber S. Pathogenesis of atelectasias of the newborn infant. *Am J Dis Child* 1933;46:590-603.
  4. Gruenwald P. Surface tension as a factor in resistance of neonatal lungs to aeration. *Am J Obstet Gynecol* 1947;53:996-1007.
  5. Macklin CC. The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumocytes. *Lancet* 1954;1:1099-104.
-

6. Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 1955;175:1125-6.
  7. Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Proc R Soc Lond* 1958;148:217-40.
  8. Clements JA. Surface tension of lungs extracts. [abstract]. *Am J Physiol* 1956;187:592.
  9. Clements JA. Surface tension of lungs extracts. *Proc Soc Biol Med* 1957;95:170-2.
  10. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J of Disease Child* 1959;97:517-23.
  11. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watanabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet* 1980;1:55-9.
  12. Fiori HH. Teste das microbolhas estáveis e teste do clique para predição de síndrome do desconforto respiratório em recém-nascido pré-termo [dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;2000.
  13. Pereira, M. A. R. Inter e intravariabilidade e o efeito do congelamento no teste das microbolhas estáveis realizado na secreção gástrica de recém-nascidos [dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;2002.
-

- 
14. Hansen T, Corbet A. Disorders of the transition. In: Taeusch HW, Ballard RA, editors. Avery's diseases of the newborn. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders;1998. p.602-29.
  15. Stark A, Frantz ID 3<sup>rd</sup>. Respiratory distress syndrome. *Pediatr Clin North Am* 1986;33:533-44.
  16. Sweet D, Bevilacqua G, Carnielli V, Greisen G, Plavka R, Didrik Saugstad O, et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome. *J Perinat Med.* 2007;35:175-86.
  17. Freddi, N.A., Proença J.O., Fiori, H.H. Terapia com surfactante pulmonar exógeno em pediatria. *J pediatr (Rio J)* 2003;79:205-12.
  18. Egberts J, Winter P, Sedin G, Kleine MJK, Broberger U, van Bel F, Curstedt T, Robertson B. Comparison of prophylaxis and rescue treatment with Curosurf in neonates less than 30 weeks' gestation: a randomized trial. *Pediatrics*; 1993: 92:768-74.
  19. Merritt TA, Hallman M, Berry C, Pohjavuori M, Edwards DK 3<sup>rd</sup>, Jaaskelainen J, Grafe MR, Vaucher Y, Wozniak P, Heldt G, Rapola J. Randomized, placebo-controlled trial of human surfactant given at birth versus rescue administration in very low birth weight infants with lung immaturity. *J Pediatr* 1991;118:581-94.
-

- 
20. Dunn MS, Shennan AT, Zyack D, et al. Bovine surfactant replacement therapy in neonates of less than 30 weeks' gestation: a randomized controlled trial of prophylaxis vs treatment. *Pediatrics* 1991;87:377-86.
  21. Brown DR, Bloom BT, Cohen M, Myers MM, Egan EA, Kattwinkel J, Delmore P, Hall RT, Malloy MH, Holzman IR, Carlo WA, Pramanik AK, McCaffree MA, Weatherstone KB, Willet LD, Topper WH. Increased survival in low birth weight neonates given prophylactic surfactant. *J Perinatol* 1998;18:431-5.
  22. Bevilacqua G, Parmigiani S, Robertson B. Prophylaxis of respiratory distress syndrome by treatment with modified porcine surfactant at birth: a multicentre prospective randomized trial. *J Perinat Med* 1996;24:609-20.
  23. Kendig JW, Notter RH, Cox C, Reubens LJ, Davis JM, Maniscalco WM, Sinkin RA, Bartoletti A, Dweck HS, Horgan MJ, Risemberg H, Phelps DL, Shapiro DL. A comparison of surfactant as immediate prophylaxis and as rescue therapy in newborns of less than 30 weeks' gestation. *N Engl J Med* 1991; 324:865-71.
  24. Walti H, Paris-Llado J, Breart G, Couchard M. Porcine surfactant replacement therapy in newborns of 25-31 weeks' gestation: a randomized, multicentre trial of prophylaxis versus rescue with multiple
-

low doses. The French collaborative multicentre study group. *Acta Paediatr* 1995;84:913-21.

25. Soll RF, Morley CJ. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 2, 2007. Oxford: Update Software.

26. Egberts J, Brand R, Walti H, Bevilacqua G, Breart G, Gardini F. Mortality, severe respiratory distress syndrome, and chronic lung disease of the newborn are reduced more after prophylactic than after therapeutic administration of the surfactant Curosurf. *Pediatrics* 1997;100: E4.

27. Walti H, Paris-Llado J, Egberts J, Brand R, Bevilacqua G, Gardini F, Breart G. Prophylactic administration of porcine-derived lung surfactant is a significant factor in reducing the odds for peri-intraventricular haemorrhage in premature infants. *Biol Neonate* 2002;81:182-7.

28. Morley CJ. Systematic review of prophylactic vs rescue surfactant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77:F70-4.

29. Luz J.H. Teste das microbolhas estáveis na avaliação da função surfatante in vitro [dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2001.

- 
30. Gluck L, Kulovich MV, Borer Jr RC, Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1971;109:440-5.
  31. Gluck L, Kulovich MV, Brody SJ: Rapid quantitative measurement of lung tissue phospholipids. *J Lipid Res* 1966;7:570-4
  32. Torday J, Carson L, Lawson EE. Saturated phosphatidylcholine in amniotic fluid and prediction of the respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1979;301:1013-8
  33. Alvarez JG, Richardson DK, Ludmir J. Prediction of respiratory distress syndrome by the novel dipalmitoyl phosphatidylcholine test. *Obstet Gynecol* 1996;87:429-33.
  34. 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;286:1077-81.
  35. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, Currie JO, Parsons JH, Sutherland PD: Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 1979;86:615-22.
-

- 
36. 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;31:509 -14.
  37. Teeratakulpisarn J, Taksaphan S, Pengsaa K, Wiangnon S, Kosuwon W. Prediction of idiopathic respiratory distress syndrome by the stable microbubble test on gastric aspirate. *Pediatr Pulmonol* 1998;25:383-9.
  38. Friedrich W, Haufe M, Schmalisch G, Wauer RR: The stable microbubble test on tracheal aspirate samples from newborn babies for diagnosis of surfactant deficiency and/or surfactant malfunction. *Biology of Neonate* 1998;73:10-8.
  39. 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;87:140-4.
  40. 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;152:148-51.
  41. Boo NY, Cheong KB, Cheong SK, Lye MS, Zulfiqar MA: Usefulness of stable microbubble test of tracheal aspirate for the diagnosis of neonatal respiratory distress syndrome. *J Paediatr Child Health* 1997;33:329-34.
-

- 
42. Berggren P, Linderholm B, Ebbesen F, Verder H, Eschen C, Robertson B. Evaluation of lung maturity in newborn babies by microbubble stability test. *Bio Neonate* 1999;76: 44.
  43. Neerhof M.G., Haney E.I., Silver R.K., Ashwood E.R., Lee I., Piazze J.J. Lamellar body counts compared with traditional phospholipids analysis as an assay for evaluating fetal lung maturity. *Obstet Gynecol* 2001;97:305-9.
  44. Dubin SB. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1989;35:612-6.
  45. Roiz-Hernández J, Navarro-Solis E, Carreón-Valdéz E. Lamellar bodies as a diagnostic test of fetal lung maturity. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;77:217-21.
  46. Pearlman ES, Baiocchi JM, Lease JA, Gilbert J, Cooper JH. Utility of a rapid lamellar body count in the assessment of fetal maturity. *Am J Clin Pathol* 1991;95:778-80.
  47. Ashwood E. R., Oldroyd RG, Palmer SE. Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 1990;75:289-92.
  48. Ashwood ER, Palmer SE, Taylor JS, Pingree SS. Lamellar body counts for rapid fetal lung maturity testing. *Obstet Gynecol* 1993;81:619-24.
-

- 
49. Fakhoury G, Daikoku NH, Benser J, Dubin NH. Lamellar body concentrations and the prediction of fetal pulmonary maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:72-6.
  50. Dalence CR, Bowie LJ, Dohnal JC, Farrel EE, Neerhof MG. Amniotic fluid lamellar body count: a rapid and reliable fetal lung maturity test. *Obstet. Gynecol* 1995;86:235-9.
  51. Anceschi MM, Garnica JJP, Rizzo G, DiPirro G, Maranghi L, Cosmi EV. Density of amniotic fluid lamellar bodies: a comparison with classical methods for the assessment of fetal lung maturity. *Prena Neonat Med* 1996;1:343-8.
  52. Wijnberger LDE, Huisjes AJM, Voorbij HAM, Franx A, Bruinse HW. The accuracy of lamellar body count and lecithin/sphingomyelin ratio in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *Br J Obstet Gynaecol* 2001;108:583-8.
  53. De Roche ME, Ingardia CJ, Guerette PJ, Wu AH, La Sala 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;187:908-12.
  54. Neerhof MG, Dohnal JC, Ashwood ER, Lee IS, Anceschi MM. Lamellar body counts: a consensus on protocol. *Obst Gynecol.* 2001;75:318-20.
-

- 
55. Gantar IS, Babnik J. Surfactant inhibitors in amniotic fluid from gastric aspirates in premature infants with respiratory distress syndrome. *Biol Neonate* 1999;76:43-4.
56. Verder H., Staun-Olsen P., Brandt J., Qin G.R., Ebbesen F., Robertson B. Prediction of respiratory distress syndrome by lamellar body counts on gastric aspirates in newborns less than 32 week's gestation. *Biol Neonate* 2003;84:40.
57. Pieruccini A, Fiori HH, Luz JH, Colvero MO, Santos EF, Munhoz TP, Fiori RM: Lamellar body counts in gastric aspirates of term and preterm newborn infants (abstract). *Pediatr Res* 2004;55:515 A.
58. 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;34:66-70.
59. Daniel I, Fiori HH, Piva JP, Munhoz TP, Nectoux, Fiori RM. Lamellar body count and stable microbubble test on gastric aspirates from preterm infants for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Neonatology* 2010;98:150-5.
60. Colvero AP. Contagem de corpos lamelares no aspirado gástrico de recém-nascidos a termo e pré-termo. [dissertação]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;2004.
-

---

## **CAPÍTULO II**

---

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Delineamento**

Estudo do tipo caso controle.

### **5.2 População e Amostra**

A amostra é composta por 38 recém-nascidos pré-termo com SDR (Grupo SDR) e 34 recém-nascidos sem doença pulmonar ou cardíaca (Grupo NSDR). O grupo NSDR é constituído de 16 recém-nascidos pré-termo (Grupo PT-NSDR) e 18 recém-nascidos a termo (Grupo T-NSDR), todos em ventilação mecânica. Foi planejado excluir pacientes que apresentassem pneumonia congênita, doença cardíaca congênita, pneumotórax, hérnia diafragmática, síndrome de aspiração de mecônio, e ou síndromes genéticas que levassem a algum tipo de comprometimento respiratório.

---

Considerando-se um estudo com poder estatístico de 90% para detectar uma diferença Padronizada (E/S) de 0,85 unidades de desvio padrão em nível de significância de 0,05, foi estimado que seriam necessários 31 pacientes por grupo. Este valor foi inflacionado em 10% para compensar o efeito da conhecida distribuição assimétrica das variáveis estudadas, chegando a 34 pacientes por grupo (total n = 72),

### **5.3 Local da pesquisa**

Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal do Hospital São Lucas da PUCRS, Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal do Hospital da Criança Conceição e Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal do Hospital Fêmina, no período compreendido entre janeiro de 2008 e abril de 2010.

---

#### **5.4 Método**

Em um protocolo desenvolvido para este estudo (Anexo 2) foram registrados de cada recém-nascido participante da amostra: idade gestacional baseada em ecografia obstétrica (antes de 20 semanas), data da última menstruação (DUM) ou escala de New Ballard,<sup>1</sup> peso ao nascer, sexo, tipo de parto, (cesariana ou parto vaginal), uso de corticóide antenatal (número de doses e tempo antes do nascimento), escore de Apgar, motivo da ventilação mecânica, uso ou não de surfactante, tempo da coleta do aspirado traqueal, características do líquido amniótico (claro, meconial, hemorrágico, turvo ou purulento, fétido), características do Raio-X (SDR, normal, outra).

O diagnóstico de SDR ocorreu de acordo com os critérios clínicos (taquipnéia, esforço respiratório, gemência, cianose em ar ambiente, necessidade de  $FiO_2$  maior que 0,4 entre outros) associado a diagnóstico radiológico (aspecto retículo granular e presença de broncogramas aéreos).

A amostra de secreção traqueal foi coletada até os três primeiros dias de vida, após intubação, durante aspiração de rotina e antes da administração de surfatante (quando indicado). A ventilação mecânica foi rapidamente interrompida e instilado 0,5ml de solução salina no tubo endotraqueal. A seguir, o recém-nascido foi reconectado ao ventilador. Após alguns movimentos respiratórios, um cateter de aspiração foi delicadamente introduzido no tubo endotraqueal até se sentir resistência, sendo removido lentamente durante a

---

sucção. O aspirado traqueal foi coletado num frasco fechado conectado ao sistema de aspiração.

Após coletadas, as amostras para a CCL e TME foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período de 48 a 96h. O descongelamento ocorreu em temperatura ambiente, até degelo visual. O processamento das amostras utilizou diluição em água destilada com Dithiotreitol (DTT  $10\text{mg}/\mu\text{l}$ ), previamente diluído e acondicionado em frascos de Eppendorf mantidos congelados  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso na proporção de 1:6 antes de serem processadas no contador eletrônico de células (Sysmex x 1800i) do Laboratório de Hematologia do Hospital São Lucas.

A contagem de corpos lamelares (CCL) foi realizada no Laboratório de Hematologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Para este teste o volume necessário de secreção traqueal foi de 25 a 50  $\mu\text{L}$ . Este volume foi colocado em um tubo de ensaio com solução diluída de Dithiotreitol, mantendo sempre a proporção de 1:6 com relação ao diluente. Após a homogeneização da secreção em um agitador de tubos de ensaio (Phoenix modelo AP56), por 10 segundos, o material foi aspirado pelo contador automático de células (Sysmex x1800i), programado para contagem total de células sem diferencial. O valor obtido como plaquetas foi registrado no protocolo de dados como o número de corpos lamelares.

Com o restante da amostra foi realizado o TME conforme técnica descrita por Pattle et al<sup>2</sup> adaptada para o equipamento disponível. Uma amostra de 40

---

microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de secreção traqueal aspirada através de seringa de 1 ml foi colocada sobre lâmina micrométrica (Objective Micrometer – Olympus, Tokyo). Esta amostra foi aspirada e espelida durante 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 câmara foi rapidamente invertida, formando uma gota e, após 4 minutos, o número de microbolhas foi contado em um microscópio de luz, utilizando uma objetiva de 10 x. Foram contadas somente as microbolhas com diâmetro menor que  $15\mu$  em  $1\text{mm}^2$  e valor encontrado foi registrado no instrumento de coleta dados. (Anexo 2).

### **5.5 Análise dos dados**

Para a descrição das variáveis quantitativas obtiveram-se estatísticas descritivas, como a média, desvio padrão, mediana, o mínimo e o máximo. Nas variáveis categóricas foram usadas contagens e percentuais, e, para comparação dos corpos lamelares e microbolhas estáveis, a análise de variância (ANOVA) aplicada sobre os logaritmos das medidas. Localização das diferenças foi realizada pelo teste de Tukey como um procedimento post-hoc. Na comparação de dois grupos utilizou-se o teste t de Student (SDR x NSDR). Dados categóricos foram comparados pelo teste exato de Fischer. Os mesmos procedimentos foram adotados na comparação das características dos grupos.

---

O nível de significância adotado foi de  $\alpha=0,05$ . Os dados foram analisados com o programa SPSS versão 17.0.

### **5.6 Procedimentos éticos**

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica e Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS e Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Nossa Senhora da Conceição. O estudo é pautado nas orientações da Resolução 196/96 que dispõe sobre as diretrizes brasileiras, envolvendo pesquisas com seres humanos.

Os resultados encontrados no decorrer do estudo não causaram interferência no tratamento do paciente.

Foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido<sup>3</sup> dos pais ou responsáveis pelos recém-nascidos.

---

## 6 REFERÊNCIAS

1. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R: New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991;119:417-23.
  2. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, Currie JO, Parsons JH, Sutherland PD: Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 1979;86:615-22.
  3. Clotet J, Goldim JR, Francisconi CF. *Consentimento Informado e sua prática na assistência e pesquisa no Brasil*. Porto Alegre: EDIPUCRS;2000.
-

---

## **CAPÍTULO III**

---

**Lamellar body count and stable microbubble test on tracheal aspirates  
from infants for the diagnosis of respiratory distress syndrome**

**Keywords:** Respiratory distress syndrome; pulmonary surfactant; preterm infants; lamellar body count; stable microbubble test.

This work was performed at Neonatal Intensive Care Units (NICU) of Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade *Católica of Rio Grande do Sul (PUCRS)*, *Hospital da Criança Conceição*, and *Hospital Fêmeina*, Porto Alegre, RS, Brazil

Financial support: None.

---

**ABSTRACT**

**Objectives:** To evaluate the performance of lamellar body count (LBC) in tracheal aspirates from intubated preterm babies to predict respiratory distress syndrome (RDS).

**Design:** Case-control study.

**Setting:** Three neonatal intensive care units.

**Patients:** Preterm infants (gestational age < 37 weeks) with RDS (n = 38) and a non-RDS control group (n = 34) not older than 3 days of age were included in the study. All required mechanical ventilation. The control group was divided into two subgroups: preterm infants (n = 16) and full-term infants (n = 18).

**Interventions:** LBC was performed in an automated cell counter. Tracheal samples were diluted in dithiothreitol without centrifugation and kept frozen at -20 °C until use. Samples were placed in a DTT-containing test tube at a ratio of 1 part tracheal aspirate to 6 parts DTT solution, vortexed for 10 seconds, and aspirated by the cell counter. LBC was performed using the platelet channel. All results were multiplied by 7. The stable microbubble test was done for comparison.

**Measurements:** Lamellar body count and stable microbubble test.

**Main Results:** Median LBC (and interquartile ranges) for the RDS and non-RDS groups were 38,500/ $\mu$ L (14,000-112,000) and 826,000/ $\mu$ L (483,000-2,866,500) respectively ( $p < 0.001$ ). Considering a cutoff point of 200,000 lamellar bodies/ $\mu$ L, the sensitivity for LBC was 89.5 (95% confidence interval [95%CI] 76.5-96.6) and specificity was 95.7% (95%CI 80.4-99.8). Area under the ROC curve for LBC was 0.96 (95%CI 0.91-0.99). LBC was also significantly lower in RDS groups when the subgroups (RDS vs. non-RDS preterm infants; infants with gestational age  $\leq 31$  weeks with vs. without RDS) were compared ( $p < 0.001$ ).

---

**Conclusions:** LBC can be rapidly and easily performed on tracheal aspirates and may be used to diagnose RDS, thus providing a means of identifying which patients will benefit from surfactant treatment.

## **INTRODUCTION**

Respiratory distress syndrome (RDS) has been identified as one of the most life-threatening conditions that affect preterm infants. Over the past four decades, several biochemical and biophysical tests have been developed for the diagnosis of RDS (1-4). Among the biophysical tests, the ones most encouraging in terms of potential for routine clinical use are the click test, the stable microbubble test (SMT), and lamellar body count (LBC), as they are practical, inexpensive, and rapidly carried out (5-7). LBC conducted on amniotic fluid has become the preferred test for obstetric use (8,9).

Biophysical tests have also been evaluated on gastric aspirates (7,10-12). SMT has been evaluated in tracheal fluid, which seems to be the most adequate for the diagnosis of RDS (13-15). In light of the advantages of early treatment with exogenous surfactant, detection of lung immaturity before or immediately after birth through a fast test may be highly convenient.

The purpose of this study was to evaluate the performance of the lamellar body count (LBC) on tracheal aspirate samples for the diagnosis of RDS.

## **MATERIALS AND METHODS**

This study was conducted between January 2008 and April 2010 at the Neonatal Intensive Care Units (NICU) of Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica of Rio Grande do Sul (PUCRS), Hospital da Criança Conceição, and Hospital Fêmeina, all of which are located in Porto Alegre, Brazil.

---

Approval for the study protocol was obtained from the Research and Ethics Committees of all three centers prior to study.

Patients were classified into two broad groups: preterm infants with RDS (RDS group) and full-term and preterm infants without RDS (control group). Patients with RDS were consecutively enrolled at Hospital São Lucas. A convenience sample was simultaneously set up with non-RDS patients selected from three neonatal intensive care units. Patients with congenital pneumonia, congenital heart disease without pulmonary involvement, meconium-stained amniotic fluid, pneumothorax, diaphragmatic hernia, and/or genetic syndromes that could jeopardize respiratory function were excluded from enrollment.

Gestational age at birth (GA) was determined according to the date of the last menstrual period and confirmed by early fetal ultrasound (before 20 weeks) or by the New Ballard Score (16). The diagnosis of RDS was established according to clinical criteria (tachypnea, costal and external retractions, grunting, necessity of  $\text{FiO}_2 > 0.40$ ), associated with a compatible radiological pattern (diffuse reticulogranular pattern and presence of air bronchograms).

Tracheal samples were obtained by routine tracheal suctioning during the first 24 hours of mechanical ventilation, in the first 3 days of life, and before surfactant administration (if used). Mechanical ventilation was briefly discontinued so that 0.5 mL of normal saline solution could be instilled into the endotracheal tube, after which the infant was reconnected to the ventilator. After a few breaths, a suction catheter was carefully introduced into the endotracheal tube until resistance was felt. Suction was applied while the catheter was slowly

---

removed. The tracheal aspirate was collected in a glass trap connected to the suctioning system. Samples were frozen at -20 °C, and thawed for testing after 48 to 96 hours.

LBC was performed with an automated cell counter Sysmex XT-1800i cell counter (Sysmex Corp., Japan) in the Hematology Laboratory at Hospital São Lucas. Tracheal samples (25 to 50 µL) were diluted in a liquefying agent (dithiotreitol) without centrifugation. To perform LBC, a 10 mg/mL solution of dithiothreitol (DTT; Invitrogen, California, United States) in distilled water was prepared in advance and kept frozen at -20 °C in Eppendorf tubes until use. Samples were placed in a test tube containing the DTT solution at a ratio of one of tracheal aspirate to six parts DTT. This sample was vortexed for 10 seconds, and the material was aspirated by the automated Sysmex XT – 1800 i cell counter. LBC was performed using the platelet channel. All results obtained were multiplied by 7 to correct for dilution.

SMT was done for comparison with LBC. It was performed as described by Pattle et al. (4) by adapting the technique to the available equipment. All measurements were performed by the first author in the Neonatal Intensive Care Unit at Hospital São Lucas and repeated independently by two other staff members who were not aware of the condition of the patient. A 40-µL aliquot of tracheal aspirate was suctioned into a Pasteur pipette (Brand GmbH & Co., Wertheim, Germany) with 11.5 cm stem and 1 mm diameter and a 2-mL rubber cap, and placed in a counting chamber (Neubauer Improved Bright-Line, Optik Labor, Germany) without the slide cover. Holding the pipette vertically, with the

---

tip almost touching the count chamber, the aliquot was quickly suctioned in and expelled out 20 times. It was then expelled over the counting chamber, which was immediately inverted and placed under a binocular microscope, forming a hanging drop. After 4 minutes, the count area was examined under 10x10 magnification and microbubbles – bubbles smaller than 15  $\mu\text{m}$  – were counted. Five of the twenty-five squares forming 1  $\text{mm}^2$  were counted (1 square on each quadrant and the central square). If less than 200 stable microbubbles were present per  $\text{mm}^2$  (SMB/ $\text{mm}^2$ ), the whole 1- $\text{mm}^2$  area was considered (14).

### **Statistical analysis**

It was estimated that 31 patients in each group would be necessary for a statistical power of 90% to detect a standard difference of 0.85 units of standard deviation of LBC at a level of significance of 0.05.

Quantitative variables were described using mean, standard deviation and median, minimum, and maximum when skewness was present. Comparison of LBC and SMT in their respective groups was accomplished with analysis of variance (ANOVA), which was applied to the logarithms of the measurements. The Tukey test was used as a post-hoc procedure. To evaluate the diagnostic performance of LBC and SMT to detect RDS, sensitivity, specificity, and a receiver operator characteristic curve were obtained with their respective 95% confidence intervals.

The Student *t* test was used for between-group comparisons. Categorical data were compared by means of Fisher's exact test. The same procedures

---

were adopted for comparison of the characteristics of both groups. The level of significance ( $\alpha$ ) was set at 0.05. Data were analyzed using SPSS® version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## RESULTS

Seventy-two patients were included in the study, 38 with RDS and 34 without RDS. Patient distribution and relevant characteristics at birth are shown in Table 1. Of the 18 term infants in the control group, 14 were intubated for correction of gastrointestinal malformations and 4 due to other surgical conditions. Of the 16 preterm control infants, 9 were intubated for surgical procedures, 5 due to apnea of prematurity and 2 due to septicemia. LBC was significantly lower in the RDS group as compared with the non-RDS group. The median and interquartile range of LBC for the RDS group were 38,500/ $\mu$ L (14,000-112,000), versus 826,000/ $\mu$ L (483,000-2,866,500) in the non-RDS group ( $p < 0.001$ ) (Figure 1). LBC was significantly different in the RDS group vs. the full-term group ( $p < 0.001$ ) and the non-RDS preterm group ( $p < 0.001$ ): 38,500/ $\mu$ L (14,000-112,000), 633,000/ $\mu$ L (322,000-1,608,000) and 822,500/ $\mu$ L (442,000-962,500) respectively. LBC in preterm infants without RDS was not significantly different from that of full-term infants ( $p = 0.77$ ). A comparative analysis of LBC in preterm infants with gestational age  $\leq 31$  weeks, with ( $n = 28$ , mean GA 28.6 weeks) or without RDS ( $n = 7$ , mean GA 27.9 weeks) also showed significantly lower LBC count in the RDS group [median (range): 28,000 (7,000-378,000) and 826,000 (350,000-1,785,000);  $p < 0.001$ ].

---

Likewise, SMT was significantly lower in the RDS group as compared with the non-RDS group (Figure 2). The median and interquartile range of SMT for the RDS group were 10 (5-13) microbubbles/mm<sup>2</sup>, versus 798 (400-1040) in the non-RDS group ( $p < 0.001$ ). SMT in the RDS group was significantly lower than in the term group ( $p < 0.001$ ) and in the preterm group without RDS ( $p < 0.001$ ): 10 (5-13), 938 (645-1,101) and 585 (73-985) microbubbles/mm<sup>2</sup> respectively.

The sensitivity and specificity of LBC for the diagnosis of RDS were then calculated. The receiver operator characteristic (ROC) curve is shown in Figure 3. Considering a cutoff point of 200,000 lamellar bodies/ $\mu$ L, the sensitivity for the LBC was 89.5% (95% confidence interval [95%CI] 76.5-96.6) and specificity was 95.7% (95%CI 80.4-99.8). The area under the curve (AUC) was 0.96 (95%CI 0.91-0.99).

The sensitivity and specificity of SMT for the diagnosis of RDS were 97.4% (95%CI 86.2-99.9%) and 97.1% (95%CI 84.7-99.9%) respectively. The AUC was 0.98 (95%CI 0.93-0.99).

## **DISCUSSION**

To the best of our knowledge, this is the first report of LBC being conducted on newborn tracheal aspirates. The present study showed that LBC in lung fluid of preterm infants has both high sensitivity and specificity for predicting RDS. The performance of SMT was also excellent, confirming the results of prior studies done by our neonatal group at PUCRS and at a different

---

institution (14,15). LBC was strikingly lower in patients with RDS when compared with LBC in full-term and preterm infants and when only infants with gestational age < 32 weeks, with and without RDS, were considered.

The LBC observed in the present study was higher than those previously reported in amniotic and gastric fluid (12,17,18). This was to be expected, as surfactant is certainly more concentrated in tracheal fluid than in amniotic and gastric fluids, which is also consistent with the higher microbubble count in tracheal aspirates found in this and other studies.

Centrifugation affects LBC (3,18). Because fluids (including tracheal fluid) are sometimes thick and non-homogeneous, hindering processing by cell counters without centrifugation, the samples in this study were diluted in dithiothreitol (DTT), a liquefying substance that has been previously tested in our laboratory and does not affect LBC (12). DTT is inexpensive for this purpose, as one vial allows hundreds of measurements.

One possible limitation of this method is the variable volume of tracheal aspirate recovered, which could lead to substantial variability in LBC and microbubble counts. However, the differences between counts obtained from immature and mature lungs are extremely pronounced, and do not seem to interfere with test interpretation.

As gestational age in the group of preterm infants with RDS was lower than in the non-RDS preterm group, the question arose as to whether the difference in LBC and SMT could be attributed to different degrees of lung maturity. However, the results found in non-RDS preterm and full-term infants

---

without lung disease were very similar, suggesting that LBC and SMT in preterm infants with mature lungs behave as in full-term infants. This is confirmed by the fact that the comparison between preterm infants ( $\leq 31$  weeks gestation) with and without RDS also showed significant differences.

The advantage of LBC over SMT on tracheal aspirates is that LBC is carried out in an automated analyzer, and so does not rely on the observational acumen of a human operator. Both tests are comparable, and the choice will likely depend on staff experience.

Concerning the relevance of the present findings, it could be argued that, because of the high accuracy of the LBC and SMT in tracheal aspirates, a mature test may potentially prevent unnecessary surfactant administration in intubated preterm infants. This is especially important in countries with limited resources. Furthermore, we speculate that both tests could also be useful in other lung diseases associated with severe respiratory failure. Meconium aspiration syndrome, pneumonia, ARDS, and other lung diseases show great variability in their responses to surfactant treatment. We believe these simple tests should be further explored as a possible tool for predicting which infants can benefit from surfactant replacement therapy.

---

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors want to thank Dr. Cátia Soares and Dr. Lauro Hagemann for kindly allowing us to collect data at their institutions, and Dr. Inah Westphal Batista da Silva Daniel and Mr. Gustavo Leivas for their technical assistance.

---

**REFERENCES**

1. Gluck L, Kulovich MV, Borer Jr RC, et al: Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 109: 440-445.
  2. Clements JA, Platzker AC, Tierney DF, 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; 286: 1077-1081.
  3. Dubin SB: Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1989; 35: 612-616.
  4. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, et al: Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 1979; 86: 615-622.
  5. 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; 152: 148-151.
  6. Neerhof MG, Haney EI, Silver RK, et al: Lamellar body counts compared with traditional phospholipids analysis as an assay for evaluating fetal lung maturity. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 305-309.
  7. Fiori HH, Varela I, Justo AL, et al: Stable microbubble test and click test to predict respiratory distress syndrome in preterm infants not requiring ventilation at birth. *J Perinat Med* 2003; 31: 509-514.
  8. Ashwood ER, Oldroyd RG, Palmer SE: Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 289-292.
-

9. Ashwood ER, Palmer SE, Taylor JS, et al: Lamellar body counts for rapid fetal lung maturity testing. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 619-624
  10. Chida S, Fujiwara T, Konishi M, et al: 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; 152: 152-156.
  11. Teeratakulpisarn J, Taksaphan S, Pengsaa K, et al: Prediction of idiopathic respiratory distress syndrome by the stable microbubble test on gastric aspirate. *Pediatr Pulmonol* 1998; 25: 383-389.
  12. Daniel I, Fiori HH, Piva JP, et al: Lamellar body count and stable microbubble test on gastric aspirates from preterm infants for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Neonatology* 2010; 98: 150-155.
  13. Friedrich W, Haufe M, Schmalisch G, et al: The stable microbubble test on tracheal aspirate samples from newborn babies for diagnosis of surfactant deficiency and/or surfactant malfunction. *Biol Neonate* 1998; 73: 10-18.
  14. Eckert Seitz E, Fiori HH, Luz JH, et al: Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Biol Neonate* 2005; 87: 140-144.
  15. Boo NY, Cheong KB, Cheong SK, et al: Usefulness of stable microbubble test of tracheal aspirate for the diagnosis of neonatal respiratory distress syndrome. *J Paediatr Child Health* 1997; 33: 329-334.
  16. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, et al: New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991; 119: 417-423.
-

17. Pieruccini A, Fiori HH, Luz JH, et al: Lamellar body counts in gastric aspirates of term and preterm newborn infants (abstract). *Pediatr Res* 2004; 55: 515 A.

18. Roiz-Hernández J, Navarro-Solis E, Carreón-Valdéz E: Lamellar bodies as a diagnostic test of fetal lung maturity. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 77: 217-221.

**CAPTIONS**

**Figure 1.** Lamellar body count (LBC/ $\mu\text{L}$ ) in full-term infants, preterm infants without respiratory distress syndrome (w/o RDS) and preterm infants with respiratory distress syndrome (RDS)

**Figure 2.** Stable microbubbles (SMB/ $\text{mm}^2$ ) in full-term infants, preterm infants without respiratory distress syndrome (w/o RDS) and preterm infants with respiratory distress syndrome (RDS)

**Figure 3.** Receiver operator characteristics (ROC) curves for lamellar body count (LBC) and stable microbubble test (SMT) for the diagnosis of respiratory distress syndrome

---

## TABLES

**Table 1.** Study group characteristics

	RDS (n = 38)		Non-RDS		
			All (n = 34)	Preterm (n = 16)	Term (n = 18)
Gestational age (weeks)	29.5	± 3.1 <sup>a,b,c</sup>	35.4 ± 4.2	32.1 ± 3.7	38.4 ± 1.2
Birth weight (grams)	1,233	± 524 <sup>a,b,c</sup>	2,448 ± 941	1,813 ± 793	3,012 ± 669
1-minute Apgar					
Median	6.5 <sup>a,c</sup>		8.0	7.0	8.0
Range	1-9		1-10	1-10	6-9
5-minute Apgar					
Median	8.0 <sup>a,c</sup>		9.0	8.5	9.0
Range	3-9		5-10	5-10	7-10
Antenatal corticosteroids, n (%)	20 (52.3) <sup>a,b,c</sup>		3 (8.8)	3 (18.8)	0 (0.0)

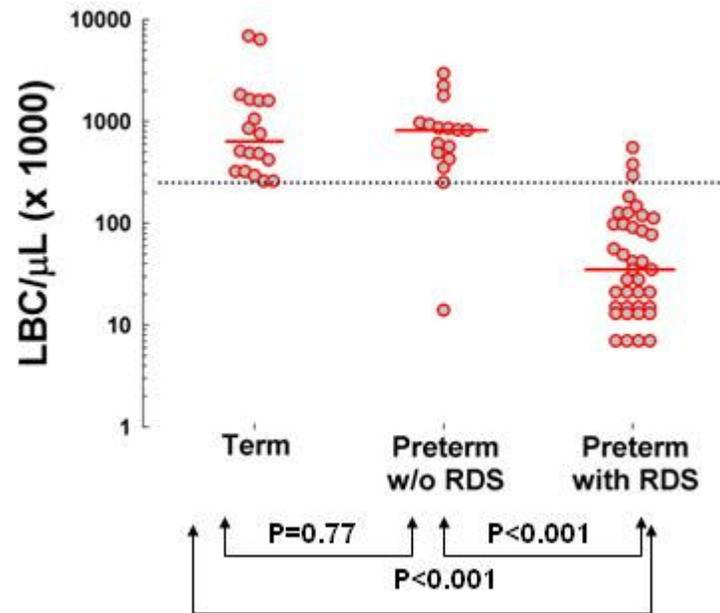
<sup>a</sup> RDS vs. all = p < 0.05.

<sup>b</sup> RDS vs. preterm = p < 0.05.

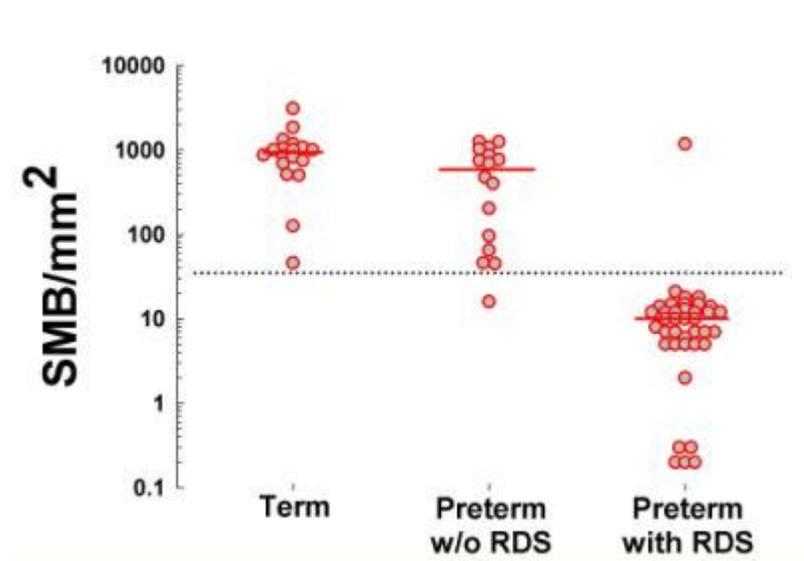
<sup>c</sup> RDS vs. term = p < 0.05.

RDS = respiratory distress syndrome.

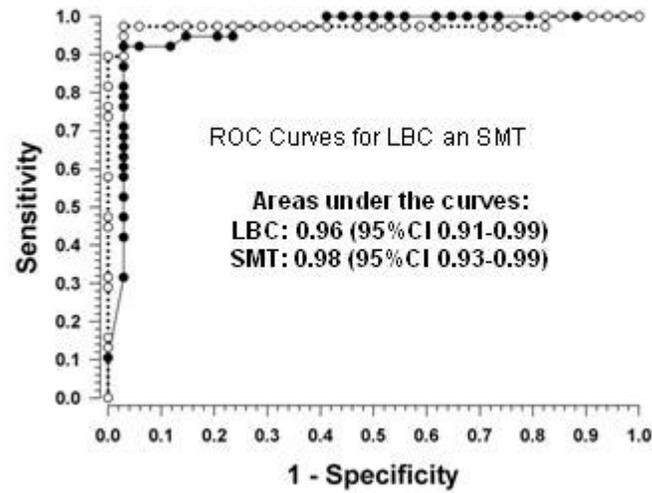
Data expressed as mean ± standard deviation, median, minimum-maximum, and number and percentage (%)



**Figure 1-** Lamellar body count (LBC/μL) in term infants, preterm without respiratory distress syndrome (RDS) and preterm with RDS



**Figure 2-** Stable microbubbles (SMB/mm<sup>2</sup>) in term infants and preterm infants with and without respiratory distress syndrome (RDS)



**Figure 3-** Receiver operator characteristics (ROC) curves for lamellar body count (LBC/ $\mu\text{L}$ ) and stable microbubble test (SMT) for the diagnosis of respiratory distress syndrome

---

## **CAPÍTULO IV**

---

## CONCLUSÕES

1. A contagem de corpos lamelares (CCL) no aspirado traqueal de recém-nascidos mostrou-se factível de ser realizada, utilizando-se uma adaptação do método descrito por Dubin para contagem no líquido amniótico.
  2. A CCL no aspirado traqueal mostrou-se altamente acurada para predizer a SDR.
  3. A acurácia do teste das microbolhas estáveis no aspirado traqueal foi semelhante à acurácia da CCL
-

---

# **ANEXOS**

---



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E  
SAÚDE DA CRIANÇA**

**ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado responsável,

As informações contidas neste termo são fornecidas para conhecimento da natureza desta pesquisa e para tornar a sua participação espontânea, sem qualquer coação, mediante a sua autorização.

**1 Título do projeto**

**CONTAGEM DE CORPOS LAMELARES NA SECREÇÃO TRAQUEAL DE  
RECÉM-NASCIDOS PARA AVALIAÇÃO DA MATURIDADE PULMONAR**

**2 Objetivos**

I – Com este estudo pretende-se realizar, no aspirado traqueal, dois testes de maturidade pulmonar: Teste de microbolhas estáveis e Contagem de corpos lamelares.

II – Baseado nestes testes, objetiva-se verificar a relação entre os valores dos testes e a necessidade de surfactante (substância que auxilia na função pulmonar de recém-nascidos, porém que só tem indicação naqueles pacientes com sinais e sintomas compatíveis com Síndrome do Desconforto Respiratório).

**3 Procedimentos**

Todos os recém-nascidos submetidos à ventilação mecânica são aspirados, rotineiramente, através da passagem de sonda na cânula endotraqueal. Com esta secreção, que seria desprezada, pretendemos realizar os testes. Os procedimentos realizados não trarão prejuízos ao participante.

#### **4 Consentimento**

Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, do procedimento para obtenção do aspirado traqueal e realização dos testes de maturidade pulmonar.

#### **5 Informações**

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;

-de que não serei identificado, e que será mantido o caráter confidencial das informações relacionadas com a privacidade;

Qualquer dúvida em relação a participação no estudo, o participante poderá entrar em contato com a aluna de doutorado Enf. Ana Claudia Vieira pelo telefone (53) 84054024 ou através do fone 33203345 do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

#### **6 Consentimento Pós-Informação**

Eu

\_\_\_\_\_, RG  
no. \_\_\_\_\_ fui esclarecido(a) sobre a pesquisa: “Avaliação dos testes de maturidade pulmonar no aspirado traqueal de recém-nascidos a termo e prematuros com síndrome do desconforto respiratório” e concordo que os dados sejam utilizados na realização da mesma.

Porto Alegre, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

---

**ANEXO 2 – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO**

Nome: RN de \_\_\_\_\_

Procedência: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) M ( ) F No. Prontuário HSL/PUCRS: \_\_\_\_\_

**DADOS DE NASCIMENTO**

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ - Hora: \_\_\_\_\_

Idade Gestacional: \_\_\_ semanas Apgar 1 \_\_\_ / 5 \_\_\_

Peso de nascimento: \_\_\_\_\_ gramas ( )PIG ( )AIG ( )GIG

Tipo de parto: ( ) Vaginal ( ) Cesariana

Líquido amniótico: claro( ) Meconial( ) hemorrágico( ) turvo ou purulento( ) fétido( )

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

**DADOS MATERNOS**

Idade: \_\_\_ anos Gesta: \_\_\_ Para: \_\_\_ Aborto: \_\_\_

Pré-natal: ( ) Sim ( ) Não

Corticóide ante-natal: ( ) Não ( ) Sim; Quantas doses? \_\_\_ tempo antes \_\_\_\_\_

**TME**

Congelado: \_\_\_\_\_

**CCL**

Congelado:

DTT: \_\_\_\_\_

**INFORMAÇÕES ADICIONAIS**

SDR: ( ) Não ( ) Sim Detalhe \_\_\_\_\_

SURFACTANTE: ( ) Não ( ) Sim; Quantas doses: \_\_\_\_\_

Tempo de coleta do aspirado traqueal: dias \_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_\_

Motivo da ventilação mecânica: \_\_\_\_\_

Características do R-X: DSR ( ) Normal Outra ( )

**ANEXO 3 – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP – PUCRS**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 291/08-CEP

Porto Alegre, 28 de março de 2008.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 08/04095, intitulado: **“Contagem de corpos lamelares na secreção traqueal de recém-nascidos para avaliação da maturidade pulmonar”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser entregues a este CEP.

Atenciosamente,

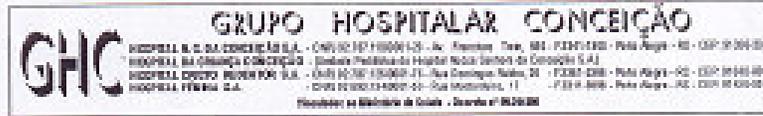
Prof. Dr. José Roberto Goldim  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Dr(a) Renato Machado Fiori  
N/Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000  
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [cep@pucrs.br](mailto:cep@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/prppg/cep](http://www.pucrs.br/prppg/cep)

**ANEXO 4 – TERMO DE CIÊNCIA GHC**



**TERMO DE CIÊNCIA DO COORDENADOR DE CRs ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA**

Eu, LAURO LUIS BARGMANN, Chefe do Serviço/Responsável pela Área de NEONATOLOGIA - US, conheço o protocolo de pesquisa intitulado: CONTAGEM DE CORPUS LUTEAL NA SECÇÃO PLACENTAL DE RN PARA AVALIAÇÃO DA MATUREZ DOS PULMONES desenvolvido por ANA CLAUDIA G. DIENA conheço seus objetivos e a metodologia que será desenvolvida, estando ciente de que o pesquisador não irá interferir no fluxo normal deste Serviço.

  
 Assinatura

  
 Nome do Chefe do Serviço

22.07.09  
 Data

## ANEXO 5 – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP – GHC

	Instituto de G. Conceição S.A. Av. Francisco José 308 CEP 91060-000 - Porto Alegre - RS Fone: (51) 3357-4000 CEP: 01.011 - 00000-00	HOSPITAL DA SENHORA CONCEIÇÃO Unidade Federal de Hospitalidade Setor de Conceição S.A. Rua dos Capangas, 22 CEP 91060-000 - Porto Alegre - RS Fone: (51) 3357-4000 CEP: 01.011 - 00000-00	HOSPITAL DA SENHORA CONCEIÇÃO S.A. Rua dos Capangas, 22 CEP 91060-000 - Porto Alegre - RS Fone: (51) 3357-4000 CEP: 01.011 - 00000-00	
Ministério da Saúde - Decreto nº 24.640				

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEIÇÃO  
GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO  
CEPHNSC – GHC**

**RESOLUÇÃO**

Porto Alegre, 09 de julho de 2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa do HNSC/GHC, em reunião ordinária de 09 de julho de 2008, analisou a seguinte projeto de pesquisa:

**Nº CEP/GHC: 097/08**  
**F.R. SISNEP: 196504**

**Título Projeto:** Contagem de corpos lamelares na secreção traqueal de recém-nascidos para avaliação da maturidade pulmonar.  
**Pesquisador(a):** Ana Cláudia Garcia Vieira  
**Orientador(a):** Renato Machado Fiori

**PARECER:**

**Documentação:** Aprovados  
**Aspectos Metodológicos:** Aprovados  
**Aspectos Éticos:** Aprovados

**Parecer final:** Este projeto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de **APROVADO**, neste CEP.

**Grupo e área temática:** Pertencente ao Grupo III.  
**Área do Conhecimento:** Ciências da Saúde – Medicina – 4.01.

**Considerações finais:** Toda e qualquer alteração do projeto deverão ser comunicadas imediatamente ao CEP/GHC. Somente deverá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e esclarecido onde consta a aprovação do CEP/HNSC/GHC. Após conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar relatório final ao Centro de Resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de Ética em Pesquisa.

  
**Laura-Liê Hegemann**  
Coordenador Executivo CEP - GHC

**Comitê de Ética em Pesquisa do HNSC/GHC** fone/fax: (51) 3357-2407 – e-mail: [pesquisas-cep@ghc.com.br](mailto:pesquisas-cep@ghc.com.br)  
**Reconhecido:** Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (31/out/1997) – Ministério da Saúde  
IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)  
Office for Human Research Protections (OHRP) sob número – IRB 00001103  
FWA Federalwide Assurance sob número FWA 00000378