

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR
UREAPLASMA UREALYTICUM E *PARVUM* EM
RECÉM-NASCIDOS
DE MUITO BAIXO PESO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUCIANA TEIXEIRA FONSECA

Porto Alegre, Brasil

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR
UREAPLASMA UREALYTICUM E *PARVUM* EM
RECÉM-NASCIDOS
DE MUITO BAIXO PESO**

LUCIANA TEIXEIRA FONSECA

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Soibelman Procianoy

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Silveira

Porto Alegre, Brasil

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

30 / 05 / 2011

E FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Luciana Friederich

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Dra. Andrea Lucia Corso

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

F676p Fonseca, Luciana Teixeira

Prevalência da infecção por ureaplasma urealyticum e parvum em recém-nascidos de muito baixo peso / Luciana Teixeira Fonseca ; orient. Renato Soibelman Procianoy ; co-orient. Rita de Cássia Silveira. – 2011. 100 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Infecções por ureaplasma 2. Ureaplasma urealyticum 3. Ureaplasma 4. Prevalência 5. Recém-nascido de muito baixo peso I. Procianoy, Renato Soibelman II. Silveira, Rita de Cássia III. Título.

NLM: WC 246

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedicatória

Aos **meus pais**, incentivadores desde os primeiros desafios da minha vida.

Ao **Ciarlo** pelo amor e companheirismo em todas as horas.

Ao **Bernardo** por me fazer entender a inexplicável e maravilhosa sensação de ser mãe.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

- À **Luciana Alonzo Heidemann**, pela amizade e pelo exemplo de coleguismo ao longo de toda a minha jornada na Neonatologia.
- A toda **equipe da UTI Neonatal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, em especial às ex-residentes **Cláudia Ferri** e **Ângela Dal Ross**, que contribuíram na coleta de dados.
- À **Vania Naomi Hirakata**, consultora em estatística do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- À Dra. **Ursula Matte** e à **Valeska Lizzi Lagranha**, pela assistência na análise laboratorial.
- À **Rosane Blanguer**, secretária do PPGSCA e à **Renata dos Santos**, bolsista do PPGSCA, por todo auxílio e disponibilidade no esclarecimento das dúvidas ao longo do curso.

De modo especial:

- Ao **Dr. Renato Soibermann Procianoy**, pela excelente orientação, competência e confiança em possibilitar esta pesquisa.
- À Dra. **Rita de Cássia Silveira** pelo incentivo, apoio e amizade, além da co-orientação.

RESUMO

Introdução: Há tempos Micoplasmas Genitais como o *Ureaplasma* vêm sendo implicados na patogênese de trabalho de parto prematuro e morbidade neonatal, mas seu real papel permanece obscuro e sua prevalência no sangue de recém-nascidos de muito baixo peso ainda não foi estudada em nosso meio.

Objetivo: Determinar a prevalência da infecção por *Ureaplasma urealyticum* (Uu) e *Ureaplasma parvum* (Up) em uma amostra de recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP) e avaliar os fatores associados.

Pacientes e métodos: Foi realizada extração de DNA de amostras de sangue de RNMBP coletadas nas primeiras 72 horas de vida e a presença de Uu e/ou Up foi identificada por técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Os recém-nascidos foram acompanhados até a alta hospitalar.

Resultados: Noventa e cinco recém-nascidos de muito baixo peso foram incluídos no estudo. A detecção de Uu e/ou Up ocorreu em 12 recém-nascidos (12,63%). Em 5,26% foi detectado somente Uu, em 5,26% somente Up e em 2,11% ambos. Na análise univariada a presença de *Ureaplasma* foi associada à infecção ovular e a trabalho de parto prematuro. Pré-eclâmpsia e ser PIG foram associados a menor ocorrência de *Ureaplasma*. Quando analisados apenas os nascimentos decorrentes de trabalho de parto prematuro, a prevalência da infecção por *Ureaplasma* foi de 25%. Pela regressão logística passo a passo, somente trabalho de parto prematuro manteve-se estatisticamente significativa aumentando em 9 vezes a chance de positividade para *Ureaplasma*.

Conclusão: A infecção por *Ureaplasma* é comum em recém-nascidos de muito baixo peso, principalmente entre os nascidos de trabalho de parto prematuro, reforçando a hipótese de associação entre prematuridade e infecção por *Ureaplasma*.

Palavras-chave: *Ureaplasma*, prematuridade, sepse neonatal, parto prematuro, displasia broncopulmonar.

ABSTRACT

Introduction: *Ureaplasma* has long been implicated in the pathogenesis of both preterm labor and neonatal morbidity, but its actual role remains unclear, and its prevalence in the blood of very low birth weight (VLBW) infants has not been studied in our country.

Objective: To determine the prevalence of *Ureaplasma urealyticum* (Uu) and *Ureaplasma parvum* (Up) bacteremia in a sample of very low birth weight infants and evaluate the associated factors.

Patients and methods: DNA was extracted from blood samples collected during the first 72 hours of life of VLBW infants and the presence of Uu and/or Up was identified by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). The newborns were followed up until hospital discharge.

Results: Ninety-five very low birth weight newborns were included in the study. Detection of Uu and / or Up occurred in 12 infants (12.6%). We detected Uu in 5.2%, Up in 5.2% and both in 2.1%. In univariate analysis the presence of *Ureaplasma* was associated with clinical chorioamnionitis and preterm labor. Pre-eclampsia and SGA were associated with lower incidence of *Ureaplasma*. When analyzing only the births due to preterm labor, the prevalence of *Ureaplasma* bacteremia was 25%. Only preterm labor remained statistically significant after step by step logistic regression analysis increasing by 9 times the chance of *Ureaplasma* occurrence.

Conclusion: *Ureaplasma* bacteremia is common in very low birth weight infants, especially among those born of premature labor, reinforcing the hypothesis of an association between prematurity and *Ureaplasma* infection.

Key words: *Ureaplasma*; prematurity; neonatal sepsis; bronchopulmonary dysplasia; preterm labor

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPD	Bronchopulmonary Dysplasia
CPAP	Pressão Positiva Contínua nas Vias Aéreas
CSF	Cerebrospinal Fluid
DBP	Displasia Broncopulmonar
DMH	Doença da Membrana Hialina
ECN	Enterocolite necrosante
FiO ₂	Fração inspirada de Oxigênio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HPIV	Hemorragia Peri-intraventricular
IC	Intervalo de Confiança
IL	Interleucina
LCR	Líquido cefalorraquidiano
NEC	Necrotizing Enterocolitis
O ₂	Oxigênio
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDI	Índice de Desenvolvimento Psicomotor
PE	Pré-eclâmpsia
PIG	Pequeno para Idade Gestacional
PIVH	Peri-intraventricular Hemorrhage
RDS	Respiratory Distress Syndrome
RNMBP	Recém-nascido de Muito Baixo Peso

SGA	Small for Gestational Age
STORCH	Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPP	Trabalho de Parto Prematuro
Up	<i>Ureaplasma parvum</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
Uu	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
VLBW	Very Low Birth Weight
VM	Ventilação Mecânica

Nota: Algumas siglas foram mantidas na sua versão original, em inglês, por serem assim mundialmente reconhecidas.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas e siglas

1- Introdução	10
2- Revisão da literatura	12
2.1- O prematuro de muito baixo peso	12
2.2- Sepsis neonatal precoce	12
2.3- Displasia broncopulmonar	13
2.4- <i>Ureaplasma urealyticum e parvum</i>	15
2.5- Colonização materna e suas repercussões	17
2.6- Colonização do recém-nascido	21
2.7- Detecção do microorganismo	23
2.8- Relevância clínica da colonização do recém-nascido	24
2.8.1- Associação com Pneumonia congênita e neonatal	24
2.8.2- Associação com Displasia Broncopulmonar	26
2.8.3- Associação com outros desfechos neonatais	32
2.9- Erradicação do microorganismo	35
3- Justificativa	39
4- Objetivos	40
4.1- Objetivo geral	40
4.2- Objetivos específicos	40
5- Hipótese	41
6- Metodologia	42

6.1- Delineamento do estudo	42
6.2- População	42
6.2.1- População em estudo	42
6.2.2- População da pesquisa	42
6.3- Amostra e amostragem	42
6.3.1- Critérios de inclusão	42
6.3.2- Critérios de exclusão	42
6.4- Variáveis em estudo	43
6.5- Logística	45
6.6- Cálculo do tamanho da amostra	46
6.7- Análise estatística	46
6.8- Considerações éticas	47
7- Referências bibliográficas	48
8- Artigo em português	65
9- Artigo em inglês	83
10- Considerações finais	98
Anexos	99

1-INTRODUÇÃO

Ainda nos dias atuais, a sepse neonatal continua sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em neonatos, principalmente em recém-nascidos de muito baixo peso de nascimento (RNMBP). A mortalidade por sepse neonatal precoce diminuiu na década de 90 em recém-nascidos a termo, mas os prematuros continuam sob alto risco para esta patologia e suas sequelas (CLOHERTY ET AL., 2008).

As duas fontes principais de infecção no recém-nascido são a mãe e o ambiente do berçário. As infecções que se manifestam nas primeiras 72 horas de vida resultam habitualmente da exposição a microorganismos de origem materna. A infecção pode ser adquirida da mãe por via transplacentária ou no momento do parto. A infecção intrauterina pode ser o resultado da disseminação ascendente de bactérias a partir do trato genital colonizado. O líquido amniótico infectado pode desencadear parto prematuro e pode ser aspirado pelo feto, causando pneumonia congênita e sepse neonatal precoce (MAC DONALD, MULLETT E SESHIA, 2005).

O *Ureaplasma urealyticum*, recentemente dividido em *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, é um microorganismo classificado como *Micoplasma* que pode colonizar o trato genital feminino. A colonização por *Ureaplasma* em gestantes está associada à ruptura prematura de membranas, corioamnionite e parto prematuro (WAITES ET AL., 2009; VISCARDI, 2010).

O foco principal do *Ureaplasma* no neonato é pulmonar. Ele pode causar pneumonia congênita, e a bacteremia por *Ureaplasma* pode ser acompanhada de pneumonia grave (WAITES ET AL., 1989). Ele pode também ser encontrado como colonizador do trato respiratório em recém-nascidos, o que parece estar associado à displasia broncopulmonar (DBP) e doença pulmonar crônica (WANG ET AL., 1995;

SCHELONKA ET AL., 2005; HONMA ET AL., 2007), embora existam controvérsias sobre a real contribuição deste microorganismo no desenvolvimento da DBP (OLLIKAINEN ET AL., 2001).

Micoplasmas genitais como *Ureaplasma* eventualmente são isolados do sangue de recém-nascidos sépticos. Cassell e colaboradores observaram bacteremia concomitante em 26% dos neonatos prematuros com culturas endotraqueais positivas para *Ureaplasma urealyticum* (CASSEL ET AL., 1991). Outros pesquisadores não isolaram *Micoplasmas* genitais do sangue ou do líquido (LCR) de recém-nascidos com suspeita de sepse (DYKE ET AL., 1993; IZRAELI ET AL., 1991).

A falta de conhecimento conclusivo sobre o potencial patogênico do *Ureaplasma* se deve em parte à falta de familiaridade dos médicos e microbiologistas sobre suas necessidades para crescimento em cultura, gerando dificuldades na sua detecção. Esta situação está mudando devido a uma maior identificação de *Micoplasmas* genitais como patógenos neonatais e a melhorias nas técnicas para sua detecção laboratorial (WAITES ET AL., 2005).

Qualquer medida para prevenção e controle desse microorganismo precisa ter como ponto de partida sua prevalência na população, e esta prevalência ainda não foi definida em RNMBP do nosso meio.

O presente estudo tem como proposta determinar a prevalência do *Ureaplasma urealyticum* e do *Ureaplasma parvum* em RNMBP através da identificação destes patógenos no sangue por técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- O prematuro de muito baixo peso

Recém-nascidos menores e mais imaturos sobrevivem hoje devido a avanços nos cuidados intensivos neonatais. O aumento na sobrevivência destes neonatos vulneráveis resulta em mais crianças em risco para diversas morbidades. Os RNMBP (peso de nascimento menor ou igual a 1500g) são especialmente suscetíveis a infecções. Eles apresentam deficiências na função de barreira das mucosas e na resposta imune tanto inata quanto adaptativa. A produção de anticorpos em resposta a patógenos invasivos é limitada e a quantidade de IgA secretora também pode ser mais baixa nas superfícies mucosas quando comparados a neonatos mais maduros. Deficiências celulares na quimiotaxia, fagocitose e eliminação de microorganismos aumentam a vulnerabilidade dos prematuros a infecções sistêmicas (KAUFMAN E FAIRCHILD, 2004). Deficiências em componentes sanguíneos do complemento, defensinas, fibronectina e anormalidades na produção de citocinas contribuem ainda mais para esta relativa imunodeficiência do neonato pré-termo. Além disso, RNMBP recebem muito menos imunoglobulinas maternas por transferência placentária, o que costuma ocorrer em estágios mais tardios da gestação (SCHELONKA ET AL., 1998).

2.2- Sepses neonatal precoce

Neonatos, particularmente os prematuros, são especialmente vulneráveis à disseminação de organismos infecciosos para a corrente sanguínea e sistema nervoso central. Bactérias Gram positivas e negativas convencionais são primariamente consideradas na sepsis neonatal; entretanto, quando microorganismos como *Ureaplasma* são especificamente procurados, evidências mostram que eles podem ser significativos

na etiologia das doenças pulmonares neonatais, bacteremia e até meningite. Como a maioria das infecções neonatais, a infecção por *Ureaplasma* não costuma causar manifestações clínicas específicas, mas deve ser considerada quando sinais e sintomas de infecção estão presentes e o neonato não responde aos antimicrobianos usualmente prescritos e as culturas não revelam um agente etiológico específico (WAITES, 2008).

Vinte por cento dos RNMBP apresentam alguma infecção sistêmica, e apesar dos avanços no cuidado intensivo neonatal e nos antibióticos, a mortalidade é até três vezes maior nesses prematuros do que naqueles que não apresentam sepse durante sua hospitalização (KAUFMAN E FAIRCHIL, 2004).

A sepse neonatal precoce (que ocorre nas primeiras 72 horas de vida) pode ser dividida em casos comprovados – aqueles em que há isolamento de uma bactéria patogênica em cultura (hemocultura ou exame bacteriológico de ponta de cateter) – e sepse presumível, definida pela presença de sinais clínicos de infecção na ausência de crescimento de germe em cultura.

2.3- Displasia broncopulmonar

A displasia broncopulmonar (DBP) é uma doença pulmonar crônica com características clínicas, radiológicas e histológicas próprias. Acomete, em geral, os recém-nascidos prematuros submetidos à oxigenioterapia e à ventilação mecânica nos primeiros dias de vida.

Conforme a conferência de consenso realizada nos EUA e organizada pelo Instituto Nacional de Saúde, a DBP deve ser considerada em qualquer neonato que permaneça dependente de oxigênio em concentrações acima de 21% por um período maior ou igual a 28 dias. Tal paciente, de acordo com a idade gestacional de nascimento, deve ser submetido à reavaliação diagnóstica e à determinação da

gravidade da doença. As alterações radiológicas, apesar de comumente presentes, foram consideradas de interpretação inconsistente, não sendo utilizadas para a definição ou avaliação da gravidade da DBP de acordo com o consenso (EHRENKRANZ ET AL., 2005).

A DBP atualmente é definida pela necessidade de oxigênio (O₂) suplementar após os primeiros 28 dias de vida. Para crianças nascidas com menos de 32 semanas de idade gestacional, a reavaliação para determinação da gravidade é realizada com 36 semanas de idade gestacional ou na alta hospitalar. Para crianças nascidas com 32 semanas ou mais de idade gestacional, o nível de gravidade é baseado na necessidade de O₂ com 56 dias de vida ou na alta hospitalar. No momento da reavaliação, pacientes em ar ambiente são considerados portadores de DBP leve. DBP moderada é definida por necessidade de O₂ suplementar < 30%, e grave por necessidade de O₂ ≥ 30% e/ou necessidade de pressão positiva contínua (CPAP) nas vias aéreas ou ventilação mecânica (VM) (JOBE E BANCALARI, 2001; EHRENKRANZ ET AL., 2005).

A incidência da DBP varia de 67% entre crianças com peso de nascimento entre 500 e 750g a menos de 1% naquelas pesando 1250 a 2500g, sendo muito incomum em prematuros maiores de 32 semanas. O uso de corticóide pré-natal reduziu a ocorrência de síndrome do desconforto respiratório em crianças mais maduras, ao mesmo tempo em que levou à sobrevivência de crianças mais imaturas com maior risco de desenvolverem DBP. A administração de surfactante exógeno reduziu a mortalidade, mas não afetou a incidência de DBP (BANCALARI ET AL., 2003).

A etiologia da DBP é multifatorial e complexa. O tecido pulmonar de prematuros sofre a falta de surfactante e uma alveolarização incompleta para uma superfície ventilatória adequada. A imaturidade pulmonar leva a microatelectasias difusas e redução da complacência. Esses fatores tornam os pulmões imaturos mais

suscetíveis a lesões oxidativas causadas pelo uso de O₂ suplementar e volutrauma durante a ventilação mecânica. A inflamação consequente a infecções perinatais parece ter um papel importante na patogênese da DBP e o sistema imunológico imaturo dos prematuros apresenta limitada habilidade em regular a resposta inflamatória, abrindo o caminho para a consideração de patógenos perinatais como o *Ureaplasma spp.* como fator causal (LYON, 2000; MANIMTIM ET AL., 2001).

2.4- *Ureaplasma urealyticum e parvum*

Micoplasmas são os menores organismos de vida livre e são únicos entre os procariontes por não possuírem parede celular. Esta característica é responsável por suas propriedades biológicas, incluindo a falta de reação com coloração de Gram e a não suscetibilidade a muitos agentes antimicrobianos comumente prescritos, como os beta-lactâmicos. São organismos usualmente associados a mucosas, residem extracelularmente nos tratos respiratório e urogenital e raramente penetram na submucosa, exceto em casos de imunossupressão ou instrumentação, quando podem invadir a corrente sanguínea e se disseminar para múltiplos órgãos e tecidos (WAITES, 2008).

Micoplasmas são membros da classe *Mollicutes*, e a falta de uma parede celular rígida em todos os membros dessa classe os tornam muito suscetíveis à desidratação, limitando sua existência à vida parasita em associação às células eucarióticas de seus hospedeiros. Seus pequenos genomas e suas habilidades biossintéticas limitadas são responsáveis pela necessidade de meios de crescimento complexos para seu cultivo *in vitro* (WAITES ET AL., 2005). *U. parvum* é a espécie mais comumente isolada em espécimes clínicos (VISCARDI ET AL., 2010).

Mycoplasma hominis e *Ureaplasma spp.*, conhecidos coletivamente como *Micoplasmas* genitais, são geralmente considerados oportunistas que causam infecções invasivas em populações suscetíveis. Eles podem ser responsáveis por infecções como uretrite, pielonefrite, doença inflamatória pélvica, endometrite, corioamnionite, atrite infecciosa, infecção em feridas operatórias, pneumonia neonatal e meningite neonatal, embora desempenhem um pequeno papel como causadores destas infecções, que podem ser causadas por diversos microorganismos. Evidências se acumulam implicando *Ureaplasmas* também na infertilidade, endometrite pós-parto, aborto espontâneo, natimortalidade, parto prematuro e morbi-mortalidade perinatal associada à pneumonia, bacteremia, meningite e doença pulmonar crônica da prematuridade. Muitas questões persistem sem resposta sobre o papel desses organismos como patógenos humanos devido a questões como sua alta prevalência em pessoas saudáveis (WAITES ET AL., 2005).

Os *Micoplasmas* são transmitidos em humanos através de contato direto entre hospedeiros (venereamente por contato genital-genital ou genital-oral), verticalmente da mãe para o feto ou recém-nascido ou nosocomialmente através do transplante de tecidos (WAITES, 2008).

Ureaplasma urealyticum e *Ureaplasma parvum* são agora designados como duas espécies distintas. Sua separação só é possível através de técnicas moleculares como PCR, por isso são muitas vezes considerados juntos como *Ureaplasma spp.*. Para propósitos clínicos, a importância da sua separação ainda é incerta (SHE ET AL., 2009), embora estudos recentes demonstrem que seu potencial patogênico possa ser diferente. Kataoka et al. encontraram evidências de que a colonização vaginal por *U. parvum*, mas não por *U. urealyticum*, está associada a aborto tardio e nascimento prematuro (KATAOKA ET AL., 2006). Biernat-Sudolska et al. observaram que prematuros

infectados por *U. urealyticum* necessitavam mais suporte ventilatório, surfactante e antibióticos, além de apresentarem maior mortalidade em relação aos infectados por *U. parvum* (BIERNAT-SUDOLSKA ET AL., 2006). Já Katz et al. não encontraram diferença significativa quanto à prevalência das espécies entre recém-nascidos com ou sem DBP (KATZ ET AL., 2005).

2.5- Colonização materna e suas repercussões

Ureaplasma spp. é o microorganismo mais comumente isolado do líquido amniótico de mulheres com TPP e membranas íntegras, de mulheres com ruptura prematura de membranas (RUPREMA), de mulheres com colo curto associado a invasão microbiana da cavidade amniótica e de placentas infectadas (VISCARDI ET AL., 2010). A infecção intrauterina é uma causa importante de TPP e pode ser detectada em aproximadamente metade dos nascimentos prematuros, especialmente os que ocorrem com menos de 30 semanas de idade gestacional. Essas infecções são frequentemente subclínicas (KLEIN E GIBBS, 2004). Quanto menor a idade gestacional ao nascimento, mais alta a frequência da infecção intra-amniótica (GONÇALVES ET AL., 2002).

Os possíveis papéis dos *Micoplasmas* genitais em doenças do trato reprodutor feminino têm sido debatidos desde a década de setenta. Sua presença tem sido consistentemente associada a múltiplas complicações obstétricas incluindo infertilidade, corioamnionite, aborto espontâneo, parto prematuro, morbidade neonatal e mortalidade perinatal. Há evidências de que o tempo, duração e intensidade da resposta inflamatória à infecção por *Ureaplasma* são os principais determinantes dos resultados gestacionais e neonatais. (WAITES ET AL., 2005; VOLGMANN ET AL., 2005; KIRCHNER ET AL., 2007).

A associação inicial com infertilidade deve-se a estudos demonstrando que *Ureaplasmas* são isolados mais comumente do trato genital inferior de casais inférteis do que de casais férteis (GNARPE E FRIBERG, 1972), mas algumas investigações subsequentes não obtiveram o mesmo resultado (MATTHEWS ET AL., 1975; UPADHYAYA ET AL., 1983). Estudos adicionais com culturas endometriais mostraram que a presença de *Ureaplasmas* é mais frequente em mulheres inférteis do que em mulheres férteis, mesmo quando as taxas de colonização cervicovaginais dos dois grupos são similares (STRAY-PEDERSEN ET AL., 1978, STRAY-PEDERSEN ET AL., 1982). Sabe-se também que *Ureaplasmas* são capazes de se fixar ao espermatozóide e reduzir sua motilidade, explicando sua associação com a infertilidade masculina encontrada em alguns estudos. Apesar disso, as taxas de concepção após tratamento antimicrobiano de casais inférteis são variáveis (TAYLOR-ROBINSON ET AL., 1999).

Ureaplasma spp. foi isolado de amostras cervicovaginais de 40 a 80% de mulheres assintomáticas sexualmente ativas nos Estados Unidos. A colonização foi associada à idade mais jovem, situação sócio-econômica desfavorável, múltiplos parceiros sexuais, etnia afro-americana e uso de anticoncepcionais orais (CASSELL ET AL., 1993).

A colonização genital com *Micoplasmas* genitais pode predispor ao aborto espontâneo e baixo peso de nascimento (BAYRAKTAR ET AL., 2010). O isolamento de *Ureaplasma spp.* em cultura de líquido amniótico de mulheres com membranas íntegras que subsequentemente sofreram perda fetal na presença de corioamnionite histológica já foi bem documentado, indicando que em alguns casos, este microorganismo tem papel causal no aborto espontâneo (CASSELL ET AL., 1983; FOULON ET AL., 1986; GRAY ET AL., 1992).

Ureaplasma spp. pode causar inflamação placentária e invadir o líquido amniótico precocemente na gestação, causando infecção persistente e efeitos gestacionais adversos como parto prematuro. A colonização placentária por *U. urealyticum* está significativamente associada à corioamnionite (HONMA ET AL., 2007), e *Micoplasmas* genitais já foram isolados do sangue de aproximadamente 10% de mulheres com febre pós-parto ou pós-aborto (CASSEL ET AL., 2001; TAYLOR-ROBINSON ET AL., 1999). A colonização corioamniótica com *Ureaplasma spp.* está associada à triplicação do risco de endometrite pós-cesariana e aumento em oito vezes no risco em mulheres cujo início do trabalho de parto foi espontâneo (ANDREWS ET AL., 1995). Andrews et al. demonstraram que a profilaxia com antibióticos com atividade contra *Ureaplasmas* reduziu o tempo de hospitalização, a frequência da endometrite e as infecções de ferida operatória (ANDREWS ET AL., 2003).

Embora existam inúmeros estudos demonstrando associação entre colonização cervical ou vaginal por *Ureaplasma* e trabalho de parto prematuro (TPP) (BREUGELMANS ET AL., 2010; HARADA ET AL., 2008, KATAOKA ET AL., 2006; MITSUNARI ET AL., 2005; AALSTONE ET AL., 2002), sua presença na secreção vaginal pode não ser confiável como preditora de TPP (CAREY ET AL., 1991), e o tratamento de gestantes com cultura de secreção vaginal positiva para *Ureaplasma* se mostrou ineficaz na prevenção de nascimento prematuro (KLEIN ET AL., 2004; RAYNES-GREENOW ET AL., 2004).

Relação mais forte com TPP é vista quando o *Ureaplasma* está presente no líquido amniótico ou placenta. A detecção do *Ureaplasma* na placenta de RNMBP varia de 6 a 28% e é inversamente relacionada à idade gestacional. As placentas com menor taxa de recuperação de *Ureaplasma* são de nascimentos devido a PE ou CIUR

(HOROWITZ ET AL., 1995; KUNDSIN ET AL., 1996; YOON ET AL., 2003, VISCARDI 2010).

Gerber et al. obtiveram amostras de líquido amniótico de 254 mulheres assintomáticas entre 15 e 17 semanas de idade gestacional e testaram quanto à presença de *U. urealyticum* através de PCR. Eles encontraram que TPP ocorreu em 58,6% de mulheres com PCR positivo comparado a 4,4% de mulheres com PCR negativo ($p < 0,0001$). Encontraram também que mulheres positivas para *U. urealyticum* apresentavam uma prevalência mais alta de TPP em gestação prévia (20,7%) do que mulheres negativas (2,7%, $p = 0,008$). Com este estudo, os autores sugeriram um potencial valor do uso do PCR no líquido amniótico na identificação de mulheres em risco para trabalho de parto e parto prematuros (GERBER ET AL., 2003).

O isolamento do *Ureplasma spp.* do cório-âmnio foi consistentemente associado com corioamnionite histológica e é inversamente relacionado ao peso de nascimento (CASSEL ET AL., 1993; CASSEL ET AL., 2001). A presença de *U. urealyticum* no parênquima placentário antes de 28 semanas de idade gestacional também parece aumentar o risco de trabalho de parto e nascimento prematuros (OLOMU ET AL., 2009).

Pacientes com ruptura prematura de membranas e invasão da cavidade amniótica por *Ureaplasma spp.* apresentam uma intensa resposta inflamatória materna, fetal e amniótica (YOON ET AL., 1998). A densidade da colonização por *Ureaplasma* também está relacionada a desfechos adversos na gestação como corioamnionite e parto prematuro (ABEL-HORN ET AL., 1996).

A presença de fosfolipases A e C no *Ureaplasma spp.* foi sugerida como o meio pelo qual *Ureaplasmas* podem desencadear trabalho de parto, através da liberação de ácido aracdônico e alteração da síntese de prostaglandinas (DE SILVA ET AL., 1991;

DE SILVA ET AL., 1999). Estudos demonstrando elevação significativa do fosfolípido A2 em amostras de soro e de líquido amniótico de mulheres em TPP com corioamnionite suportam esta hipótese (KOYAMA ET AL., 2000). A capacidade do *Ureaplasma* em estimular monócitos *in vitro* a produzir citocinas pró-inflamatórias relevantes no nascimento prematuro também foi demonstrada (HARADA ET AL., 2008). Citocinas elaboradas no líquido amniótico em resposta à presença de microorganismos provocam a síntese de prostaglandinas no âmnio, cório, decídua e miométrio, levando a contrações uterinas, dilatação cervical e exposição de membranas (KLEIN E GIBBS, 2004).

Estudos experimentais também evidenciam um papel causal dos *Micoplasmas* genitais na iniciação da resposta inflamatória intraútero e TPP. Novy et al. realizaram inoculação intra-amniótica de *U. parvum* ou *M. hominis* em macacos *rhesus*, o que resultou em ativação da cascata inflamatória e contratilidade uterina progressiva, culminando em parto prematuro (NOVY ET AL., 2009).

2.6- Colonização do recém-nascido

A colonização de recém-nascidos por *Micoplasmas* genitais pode ocorrer verticalmente de mulheres infectadas para o feto ou neonato através de pelo menos três diferentes rotas: Pode haver ascensão do microorganismo do trato genital inferior materno até o saco amniótico, onde eles se multiplicam e atingem os pulmões fetais (o que pode ocorrer precocemente na gestação, mesmo com as membranas íntegras); pode ocorrer hematogenicamente através da infecção placentária com envolvimento dos vasos umbilicais e pode ocorrer, ainda, no momento do parto pela passagem através do canal de parto infectado com resultante colonização da pele, membranas mucosas e trato respiratório. A transmissão vertical varia de 18 a 88% e as taxas variam inversamente à

idade gestacional (WAITES ET AL., 2005). Um estudo recente encontrou uma taxa de transmissão vertical de 60% para recém-nascidos com peso de nascimento menor ou igual a 1000g comparado a apenas 15,3% em recém-nascidos com peso de nascimento maior ou igual a 1500g. A taxa de colonização encontrada em recém-nascidos a termo foi de 10%, enquanto a de prematuros foi de 24% (KAFETZIS ET AL., 2004).

A taxa de colonização das vias respiratórias por *Ureaplasma* aumenta de acordo com o tempo de bolsa rota (KAFETZIS ET AL., 2004), indicando que, para a maioria dos casos, o *Ureaplasma* é provavelmente transmitido verticalmente da mãe para seus filhos pouco antes ou no momento do nascimento prematuro, como o resultado de uma infecção ascendente do trato genital inferior. No entanto, em uma coorte prospectiva acompanhada por Viscardi et al., foi observado que 23% dos prematuros com colonização respiratória e 28% daqueles com *Ureaplasma* detectado no sangue ou no LCR apresentavam tempo de bolsa rota inferior a uma hora, sugerindo que a colonização ou infecção nessas crianças foi o resultado da infecção intrauterina pré-existente (VISCARDI ET AL., 2008; VISCARDI ET AL., 2010). Dammann et al. encontraram que o tempo de bolsa rota era inferior a uma hora em 31% das gestações com placentas positivas para *Ureaplasma*. Estes dados sugerem que a exposição fetal a este microorganismo pode ocorrer no início da gravidez e pode ser sustentada durante os períodos críticos de desenvolvimento (DAMMANN ET AL., 2003; VISCARDI ET AL., 2010).

Infecções por *Ureaplasma* clinicamente significativas raramente ocorrem em neonatos com mais de 34 semanas de idade gestacional, o que sugere a importância dos anticorpos na defesa contra esses organismos. A taxa de colonização declina após os 3 meses de idade. Menos de 5% das crianças além do período neonatal são colonizados por *Micoplasmas* genitais (WAITES, 2008).

2.7- Detecção do microorganismo

Meios de cultura e condições de crescimento específicos são necessários e a maioria dos laboratórios não oferece estes serviços. Culturas bacterianas de rotina não detectam *Ureaplasma spp.*. Amostras podem ser coletadas em um sistema líquido de transporte específico para *Micoplasmas*. Para que os organismos permaneçam viáveis, prevenir a desidratação e proteger de temperaturas adversas é essencial. Em recém-nascidos, cultura de secreção nasofaríngea ou endotraqueal são apropriadas, especialmente se apresentam evidências clínicas ou radiográficas de pneumonia. O isolamento com sucesso do *Ureaplasma spp.* a partir do sangue necessita inoculação de mais de 10mL diretamente no meio de crescimento líquido para *Micoplasma*, embora volumes menores possam ser usados para neonatos. Estudos sorológicos não são úteis para avaliar infecções por *Micoplasmas* genitais e técnicas moleculares estão disponíveis limitadamente a laboratórios de pesquisa ou de referência (WAITES, 2008).

O uso do PCR na detecção de *Ureaplasmas* foi sustentado em investigações recentes que mostraram que pacientes com PCR positivo para *Ureaplasma spp.*, mas com cultura negativa no líquido amniótico, tiveram taxas mais altas de morbidade neonatal significativa do que aqueles com cultura e PCR negativos. Entretanto, não houve diferença significativa nos desfechos perinatais entre pacientes com cultura negativa e PCR positivo e aqueles com cultura positiva (YOON ET AL., 2003).

As vantagens do PCR na detecção de *Micoplasmas* genitais incluem o fato de não necessitar de organismos viáveis, ter um limite de detecção muito melhor que a cultura, além de resultados disponíveis em um dia (WAITES ET AL, 2005). Biernat-Sudolska et al. encontraram que a sensibilidade e a especificidade do PCR em comparação à cultura para detecção de *Ureaplasmas* do aspirado traqueal em 500

recém-nascidos prematuros foi de 86 e 98%, respectivamente (BIERNAT-SUDOLSKA ET AL., 2006).

Múltiplos estudos mostram que a habilidade do PCR em detectar *Ureaplasmas* no trato gênito-urinário feminino é comparável ou superior a da cultura (AALSTONE ET AL., 2002; ABELE-HORN ET AL., 1996; COLAIZY ET AL., 2003; LUKI ET AL., 1998, YOON ET AL., 2000; NASUTION ET AL., 2007). A concordância entre PCR e cultura em amostras de aspirado traqueal também é excelente, variando de 91 a 99% (CUNLIFFE ET AL., 1996; NELSON ET AL., 1998; BLANCHARD ET AL., 1993). Entretanto, amostras como o sangue, que pode conter uma concentração muito baixa do microorganismo em meio a uma imensa quantidade de DNA humano, podem não ser ideais para PCR (WAITES ET AL., 2005). Possivelmente este seja o motivo da inexistência de estudo que compare PCR com cultura para detecção de *Ureaplasmas* no sangue.

2.8- Relevância clínica da colonização do recém-nascido

2.8.1- Associação com Pneumonia congênita e neonatal

As doenças respiratórias permanecem sendo a causa mais comum de morbidade e mortalidade perinatal, especialmente em recém-nascidos prematuros. As investigações sobre um potencial papel do *Ureaplasma spp.* nas doenças respiratórias neonatais iniciaram na década de 70, e estudos nos anos 80 e 90 mostraram conclusivamente que *Ureaplasma spp.* pode causar doença respiratória em neonatos em algumas circunstâncias. *Ureaplasmas* são os microorganismos mais comumente isolados do líquido amniótico, da placenta e do trato respiratório de prematuros, e sua habilidade em induzir inflamação nesses locais é inegável. A doença pulmonar associada a esses

microorganismos não se deve necessariamente a sua presença, mas ao potente estímulo a citocinas pró-inflamatórias e talvez ao bloqueio às citocinas contra-reguladoras.

Evidências de que o *Ureaplasma spp.* causa pneumonia congênita incluem: presença de pneumonia histológica e corioamnionite em neonatos e placentas com culturas positivas; manifestações clínicas de disfunção respiratória e alterações radiográficas indicativas de pneumonia em recém-nascidos com cultura positiva; demonstração do microorganismo em tecido pulmonar por imunofluorescência e microscopia eletrônica e desenvolvimento de modelos em roedores e primatas de pneumonia que se assemelha à doença em humanos (WAITES ET AL., 2005).

Walsh et al. demonstraram a patogenicidade dos *Ureaplasmas* no pulmão neonatal através da inoculação intratraqueal de *Ureaplasmas* em babuínos prematuros. Esses animais foram mantidos em ventilação mecânica com oxigênio a 100% durante 6 dias. Dois animais inoculados com *Ureaplasma* desenvolveram bronquiolite aguda com ulceração epitelial e infiltrado neutrofilico, semelhante ao que foi descrito em pneumonia por *Ureaplasma* em neonatos humanos. Essas lesões não ocorreram em quatro animais controles que não receberam inoculação do *Ureaplasma*, mas foram tratados da mesma forma. *Ureaplasma spp.* foi recuperado em culturas de sangue, aspirado traqueal, líquido pleural e tecido pulmonar e/ou renal desses dois animais infectados (WALSH ET AL., 1993).

Em autópsia de neonato falecido por pneumonia e sepse por *Ureaplasma spp.* (com culturas de sangue, líquido pleural e secreção traqueal positivas), o tecido pulmonar apresentava extensa e severa reação inflamatória com deposição abundante de fibrina (WAITES ET AL., 1989).

Cultrera et al. realizaram PCR para detecção de *U. parvum* e *U. urealyticum* do aspirado traqueal ou nasofaríngeo de 50 neonatos prematuros. 15/24 neonatos com

síndrome do desconforto respiratório e 4/26 sem esses sintomas eram positivos para *U. urealyticum* ou *parvum* ($p < 0,001$) (CULTRERA ET AL., 2006).

2.8.2- Associação com Displasia Broncopulmonar

A presença do *Ureaplasma* como colonizador do trato respiratório em recém-nascidos parece estar associada à DBP e à doença pulmonar crônica. Essa associação tem sido demonstrada em inúmeros estudos, desde 1988 (CASSEL ET AL., 1988; SANCHEZ ET AL., 1988; WANG ET AL., 1995; GALETTO ET AL., 2001; SCHELONKA ET AL., 2005; HONMA ET AL., 2007). Colaizy et al. recentemente estudaram 139 RNMBP intubados e encontraram uma prevalência de colonização de secreção traqueal por *Ureaplasma spp.* de 25%. O risco para os desfechos combinados DBP ou morte por doença pulmonar encontrado, após controle para fatores de confusão, foi 4,2 vezes maior em RNMBP colonizados por *Ureaplasma* do que nos não colonizados ($p < 0,001$; IC 95% 1.03-17) (COLAIZY ET AL., 2007). Kafetzis et al. também encontraram associação da colonização do trato respiratório por *U. urealyticum* com o desenvolvimento de doença pulmonar crônica e com maior mortalidade (KAFETZIS ET AL., 2004); assim como Payne et al., que encontraram um risco relativo para DBP ou morte entre os colonizados por *Ureaplasma* de 4,8 (IC 95% 1,15-20,13) (PAYNE ET AL., 2010).

Apesar disso, ainda existem controvérsias sobre a real contribuição deste microorganismo no desenvolvimento da DBP, já que alguns autores não encontraram tal associação em seus estudos (OLLIKAINEN ET AL., 2001; HEGGIE ET AL., 2001; PANDEY ET AL., 2007). Aaltonen et al. analisaram 49 recém-nascidos com menos de 30 semanas de idade gestacional quanto à colonização do trato respiratório inferior por *U. urealyticum*. Eles encontraram que 45% dos 33 recém-nascidos com início

espontâneo do trabalho de parto eram colonizados, comparado a nenhum dos nascidos eletivamente. O risco relativo para DBP entre os nascidos por trabalho de parto espontâneo era significativamente maior do que entre os nascidos eletivamente. Com isso os autores concluíram que quando se leva em consideração a exposição à inflamação intra-amniótica, o *U. urealyticum* parece não ter um papel independente na patogênese da DBP, e que seu papel deve ter sido excessivamente enfatizado por ele ser o causador mais comum de infecção intra-amniótica (AALTONEN ET AL., 2006).

É possível que a infecção por *Ureaplasma* contribua na patogênese da DBP em RNMBP através de uma pneumonia que leva a uma maior necessidade de oxigênio e de pressões mais elevadas na ventilação mecânica em neonatos infectados, criando um ciclo vicioso de inflamação e lesão (CASSEL ET AL., 2001). A hiperóxia ainda contribui nos efeitos patológicos pulmonares através da produção de radicais livres, dano aos pneumócitos e alterações da permeabilidade na parede alveolar. Um estudo em animais mostrou que a hiperóxia leva à persistência do *U. urealyticum* nos pulmões de ratos recém-nascidos, potencializando a resposta inflamatória e transformando uma pneumonia auto-limitada em uma doença letal (CROUSE ET AL., 1990).

Castro-Alcaraz et al. estudaram 125 RNMBP durante 12 meses, coletando amostras de secreção endotraqueal e nasofaríngea com 1, 3 e 7 dias de vida e após semanalmente. Quarenta crianças (32%) apresentaram uma ou mais amostras positivas para *U. urealyticum* por cultura ou PCR. Foram identificados 3 padrões de colonização: persistentemente positivo (n=18), precoce transitório (n=14) e aquisição tardia (n=8). Ao comparar as taxas de doença pulmonar crônica nos 3 grupos com o grupo não colonizado, eles encontraram uma taxa significativamente mais alta de doença pulmonar crônica com 28 dias de vida (OR 8,7; 95% CI 3,3-23) e com 36 semanas de idade pós-concepcional (OR 38,5, 95% CI: 4-374) apenas para aqueles com colonização

persistentemente positiva (45% dos colonizados). Eles concluíram que o risco de desenvolver doença pulmonar crônica varia com o padrão de colonização por *U. urealyticum* (CASTRO-ALCARAZ ET AL., 2002).

Neonatos com o trato respiratório inferior colonizado por *Ureaplasma* parecem apresentar alterações radiológicas compatíveis com DBP mais precocemente do que aqueles não colonizados. Pacifico et al. encontraram que 9 de 40 (22,5%) neonatos colonizados por *Ureaplasma* contra 1 de 42 (2,3%) não colonizados desenvolveram alterações radiográficas displásicas precoces ($p=0,006$) (PACIFICO ET AL., 1997).

Outro estudo avaliou radiografias de tórax de 44 prematuros colonizados no trato respiratório inferior com *Ureaplasma spp.* em comparação aos com cultura negativa e encontrou que pneumonia era duas vezes mais comum entre os infectados. Além disso, alterações displásicas pulmonares precoces (com duas semanas de vida) foram significativamente mais comuns no grupo colonizado, independente da idade gestacional, raça e sexo (CROUSE ET AL., 1993).

Viscardi et al. analisaram amostras de necropsias pulmonares de RNMBP. Foram comparadas amostras de 5 controles falecidos por causas não pulmonares, 13 neonatos com pneumonia e sem infecção por *U. urealyticum* (com cultura e/ou PCR negativos) e 5 neonatos com doença pulmonar e cultura e/ou PCR positivo para *U. urealyticum* no aspirado traqueal e/ou tecido pulmonar. Eles encontraram uma tendência ao predomínio de neutrófilos nos alvéolos de neonatos com pneumonia sem infecção por *Ureaplasma*, mas uma tendência ao predomínio de macrófagos alveolares naqueles infectados por *Ureaplasma*. Encontraram também aumento da fibrose intersticial em todas as amostras de neonatos infectados por *Ureaplasma* e concluíram que a infecção por *U. urealyticum* pode contribuir para inflamação crônica e fibrose precoce no pulmão prematuro (VISCARDI ET AL., 2002).

Benstein et al. estudaram tecido pulmonar de necropsia de 7 crianças com cultura positiva e 7 com cultura negativa para *U. urealyticum*. Eles pesquisaram a identificação do *Ureaplasma* no tecido pulmonar neonatal através da hibridização *in situ* (HIS). Todos com cultura positiva também eram positivos na HIS e apresentavam evidências histopatológicas de DBP. Dois dos 7 casos com cultura negativa eram positivos para *Ureaplasma* na HIS e também apresentavam DBP à necropsia. Os outros 5 com cultura e HIS negativos não tinham evidência de DBP (BENSTEIN ET AL., 2003).

Theilen et al. encontraram que prematuros em VM com *Ureaplasma spp.* em secreção traqueal apresentavam menos sinais de desconforto respiratório inicialmente, mas eram mais suscetíveis à deterioração clínica e radiológica e frequentemente necessitavam re-intubação. Neonatos com *Ureaplasma* apresentavam também alterações enfisematosas precoces nas radiografias de tórax, desde os 5 dias de vida com diferença pronunciada no décimo dia de vida (THEILEN ET AL., 2004).

Wang, Ohlsson e Kellner realizaram uma metanálise sobre o assunto e encontraram um risco relativo para o desenvolvimento de doença pulmonar crônica em neonatos colonizados por *U. urealyticum* em relação aos não colonizados de 1,72 (CI 95%, 1,5 – 1,96) (WANG, OHLSSON E KELLNER, 1995).

Outra metanálise sobre o papel da colonização por *Ureaplasma* no desenvolvimento da DBP foi realizada por Schelonka et al. Foram avaliados 36 estudos com coortes de recém-nascidos rastreados quanto à presença de *Ureaplasma* por cultura ou PCR e seguidos prospectivamente quanto ao desenvolvimento de DBP. Os estudos foram agrupados pela definição de DBP: necessidade de oxigênio com 28 dias de vida pós-natal ou 36 semanas de idade pós-menstrual. Um total de 2216 crianças foram incluídas no primeiro grupo e 751 no segundo. Ambos apresentaram associação

significativa entre colonização por *Ureaplasma* e desenvolvimento de DBP ($p < 0,001$ no primeiro grupo e $p < 0,009$ no segundo); entretanto, foi detectada uma heterogeneidade substancial, reduzindo a precisão da estimativa dos riscos. Os autores salientam que para avaliar a existência de uma relação causal entre a colonização por *Ureaplasma* e o desenvolvimento de DBP seria necessário um grande ensaio clínico multicêntrico (SCHELONKA ET AL., 2005).

A habilidade dos *Ureaplasmas* em desencadear uma resposta inflamatória na corrente sanguínea e trato respiratório inferior de neonatos já foi investigada, em uma tentativa de caracterizar como esses microorganismos produzem lesões patológicas quando acessam os pulmões. Viscardi et al. encontraram que a contagem de leucócitos periféricos totais e de neutrófilos era 3 vezes mais alta em neonatos com pneumonia por *U. urealyticum* do que em neonatos infectados com outros microorganismos (VISCARDI ET AL., 2002).

Níveis mais altos de citocinas inflamatórias no líquido amniótico podem iniciar lesão pulmonar intraútero e foram associados a taxas mais altas de DBP em prematuros (YOON ET AL., 1997). A concentração das citocinas inflamatórias no aspirado traqueal de crianças com DBP também está elevada em comparação àquelas com síndrome do desconforto respiratório auto-limitada (MANIMTIM ET AL., 2001).

Kotecha et al. analisaram amostras de lavado broncoalveolar de prematuros ventilados por síndrome do desconforto respiratório. Seis eram positivos para *U. urealyticum* e 11 eram negativos. Cinco (83%) positivos e 4 (36%) negativos desenvolveram doença pulmonar crônica da prematuridade. Neutrófilos pulmonares, macrófagos alveolares, IL-1 beta, IL-6 e IL-8 estavam significativamente aumentados no grupo positivo para *U. urealyticum*. Os dados sugerem que a colonização por *U. urealyticum* está associada com o desenvolvimento de inflamação pulmonar em crianças

que subsequentemente desenvolvem doença pulmonar crônica (KOTECHA ET AL., 2004).

A presença do *Ureaplasma spp.* no aspirado gástrico de prematuros foi associada a maior risco de DBP naqueles nascidos de cesariana, mas não nos nascidos via vaginal, sugerindo a possibilidade de que uma exposição intra-uterina prolongada à inflamação possa ser a explicação (DYKE ET AL., 1993).

Normann et al. desenvolveram um modelo em camundongos combinando infecção pré-natal por *Ureaplasma* e exposição pós-natal ao oxigênio. A presença intra-amniótica do *U. parvum* aumentou as citocinas pró-inflamatórias na placenta e nos pulmões fetais. A inflamação pré-natal exacerbou os efeitos deletérios do oxigênio no desenvolvimento pulmonar (NORMANN ET AL., 2009).

Em ratos transgênicos, a expressão excessiva de TNF- α , IL-6 ou IL-11 inibiu a alveolarização, indicando que uma exposição prolongada do pulmão prematuro a um ambiente pró-inflamatório contribui para uma septação alveolar anormal (JOBE E BANCALARI, 2001).

Viscardi e Hasday realizaram uma revisão sumarizando as evidências que suportam um papel causal do *Ureaplasma spp.* na DBP. Eles propuseram que a infecção por *Ureaplasma* iniciada intra-útero e potencializada na vida pós-natal pela exposição à volutrauma e oxigênio induz uma resposta inflamatória desregulada e sustentada no pulmão imaturo, que prejudica a alveolarização e estimula a proliferação de miofibroblastos e a deposição excessiva de colágeno e elastina. A elucidação dos mecanismos pelos quais o *Ureaplasma* pode contribuir na patogênese da DBP não apenas fornece evidências de uma relação causal, mas também identifica alvos potenciais para intervenção na prevenção e tratamento de crianças colonizadas. (VISCARDI E HASDAY, 2009).

2.8.3- Associação com outros desfechos neonatais

Apesar de a relação da colonização do trato respiratório por *Ureaplasmas* e DBP ter sido extensamente estudada, muito menos se sabe sobre a doença invasiva, definida como detecção do microorganismo no sangue ou LCR, e sua relação com desfechos neonatais.

Micoplasmas genitais já foram isolados do cordão umbilical e há alguns relatos de seu isolamento na corrente sanguínea de neonatos, às vezes associado à pneumonia e/ou meningite (WAITES ET AL., 2005). Cassell e colaboradores observaram que 26% dos prematuros com aspirado traqueal positivo apresentaram hemocultura positiva para *Ureaplasma* (CASSEL ET AL., 1991). Waites e colaboradores realizaram hemocultura para *Micoplasmas* em 43 neonatos: 2 eram positivos para *M. hominis* e 2 eram positivos para *Ureaplasma spp.* (WAITES ET AL., 1988). Outros pesquisadores não isolaram *Micoplasmas* genitais do sangue ou do líquido de recém-nascidos com suspeita de sepse (IZRAELI ET AL., 1991, DYKE ET AL., 1993).

Viscardi et al. conduziram um estudo para determinar a incidência de doença invasiva por *U. parvum* e *U. urealyticum* e sua relação com desfechos adversos em uma coorte prospectiva de RNMBP. Eles realizaram PCR a partir do DNA extraído do sangue de cordão umbilical ou venoso e do LCR de 313 neonatos. A colonização do trato respiratório também foi investigada. *Ureaplasma spp.* foi detectado no soro e/ou LCR de 74 (23,6%) recém-nascidos (19,1% no sangue de cordão umbilical, 18,1% no sangue venoso e 19,1% no LCR). *U. parvum* foi a espécie predominante (70%). A presença do *Ureaplasma* foi associada a aumento da IL-1 β no sangue de cordão (p= 0,039; OR 2,6; IC 1,05-6,45) e aumento no risco de hemorragia intraventricular grau ≥ 3 , e esta diferença permaneceu significativa após ajuste para idade gestacional (p= 0,036;

OR 2,5; IC 1,06-5,89). *U. parvum* foi a espécie detectada em todos os casos de hemorragia intraventricular severa e PCR positivo. Apesar de a incidência de DBP ter sido maior em recém-nascidos com colonização do trato respiratório (41 x 23%, p=0,003), não houve diferença na incidência de DBP entre neonatos com ou sem *Ureaplasma spp.* detectado no sangue ou LCR. No geral, quase metade da coorte foi positiva para *Ureaplasma* em um ou mais compartimentos (sangue, líquido ou trato respiratório), confirmando que este microorganismo é o patógeno mais comumente encontrado nesta população (VISCARDI ET AL., 2008).

O *Ureaplasma urealyticum* também foi isolado no LCR no estudo de Heggie e colaboradores, mas numa frequência muito baixa (0,2%) e aparentemente sem associação a desfecho clínico significativo (HEGGIE ET AL., 1994).

Olomu et al. encontrou em seu estudo que a presença de *U. urealyticum* no parênquima placentário antes das 28 semanas de idade gestacional aumentou o risco de hemorragia intraventricular e lesões cerebrais em neonatos prematuros (OLOMU ET AL., 2009).

O papel do *Ureaplasma* como causador de dano cerebral neonatal também apareceu no modelo experimental em camundongos realizado por Normann et al. Combinando infecção pré-natal por *Ureaplasma* e exposição pós-natal ao oxigênio, a inflamação pré-natal prejudicou o desenvolvimento cerebral, com evidências de ativação microglial, atraso da mielinização e alteração do desenvolvimento neuronal. (NORMANN ET AL., 2009).

Há estudos mostrando que o *Ureaplasma spp.* pode causar meningite em recém-nascidos prematuros e a termo (SETHI ET AL., 1999, VALENCIA ET AL., 1993). Clifford et al. revisaram as publicações relevantes sobre o assunto e encontraram que apesar de alguns estudos sugerirem que a detecção de *Ureaplasma* no LCR de neonatos

com clínica de meningite ou sepse seja de até 9% dos casos, a proporção na maioria dos estudos é de menos de 1%. Há dificuldades em se estabelecer a patogenicidade do *Ureaplasma* na meningite neonatal, já que em uma proporção significativa de pacientes com tal infecção o organismo é contido pelo sistema imune sem tratamento antibiótico específico. Apesar de não estarem necessariamente relacionadas etiologicamente, complicações como hemorragia intraventricular, hidrocefalia e atraso de desenvolvimento parecem ser comuns nesse grupo de pacientes (CLIFFORD ET AL., 2010).

Berger et al. estudaram uma coorte de 114 prematuros nascidos entre 23 e 33 semanas de idade gestacional de mães que tiveram cultura de líquido amniótico obtida durante a cesariana. Essas crianças foram subsequentemente avaliadas com 24 +/- 1,1 meses de idade corrigida através da escala de desenvolvimento infantil de Bayley II e exame neurológico padronizado. Um grupo de 67 crianças com cultura de líquido amniótico negativa foi comparado a 47 crianças com cultura positiva, sendo positiva para *U. urealyticum* em 32 casos e para outras bactérias em 15 casos. Pacientes com cultura positiva apresentaram um risco significativamente maior de apresentar um escore PDI (índice de desenvolvimento psicomotor) adverso (OR 3,1; CI 1.3-3.7), um desfecho neurológico anormal (OR 4,8; CI 1,4-16,4) e uma maior probabilidade de diagnóstico de paralisia cerebral (OR 4,8; CI 1,4-16,4) aos dois anos de idade corrigida em comparação aos com cultura negativa (BERGER ET AL., 2009).

Há raros estudos investigando a presença de *Ureaplasma* na urina de neonatos (lembrando que o trato urinário é o sítio mais comum de doença por *Ureaplasma* em adultos). Um estudo encontrou *Ureaplasma spp.* em 10 de 170 amostras de urina de crianças até 3 meses de idade hospitalizadas por suspeita de infecção, mas a significância clínica deste achado é incerta, já que elas melhoraram sem tratamento

específico para *Mycoplasmas* genitais (LIKITNUKUL ET AL., 1986). Existem na literatura relatos de outros sítios de infecção por *Ureaplasma* em neonatos, como abscessos associados à monitorização fetal (HAMRICK ET AL., 1993) e hidropsia fetal não imune (OLLIKAINEN ET AL., 1992), mas são relatos de casos isolados, sem estudos maiores a respeito.

Goldenberg et al. realizaram cultura de sangue de cordão umbilical para *U. urealyticum* e *M. hominis* de 351 prematuros nascidos entre 23 e 32 semanas de idade gestacional. Esses microorganismos foram encontrados em 23% das culturas de sangue de cordão (52% positivo para *U. urealyticum*, 26% positivo para *M. hominis* e 22% positivo para ambos). Culturas positivas foram mais comuns nos nascimentos prematuros espontâneos quando comparados aos indicados (34,7% x 3,2%; p= 0,0001) e naqueles com menor idade gestacional, filhos de mães não brancas e com idade inferior a 20 anos. Inflamação e infecção intrauterina (evidenciados por cultura placentária, aumento de IL-6 no sangue de cordão e histologia placentária) também foram mais comuns entre os com cultura positiva. Neonatos com cultura positiva tiveram mais chance de apresentar síndrome da resposta inflamatória sistêmica (41,3% x 25,7%; p= 0,007; OR ajustado 1,86; 1,08-3,21) e provavelmente DBP (26,8% x 10,1%; p= 0,0001, OR ajustado 1,99; 0,91-4,37). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos quanto a outros desfechos neonatais, como síndrome do desconforto respiratório, hemorragia intraventricular ou morte (GOLDENBERG ET AL., 2008).

2.9- Erradicação do microorganismo

Os *Ureaplasmas* não são afetados por beta-lactâmicos ou vancomicina por não possuírem peptidoglicanos. Também não são suscetíveis a sulfonamidas e trimetoprim, já que não sintetizam ácido fólico. Entretanto, são geralmente sensíveis a alguns

antibióticos que interferem com a síntese proteica, como as tetraciclina. Enquanto os *Ureaplasmas* são geralmente sensíveis aos macrolídeos, eles são resistentes às lincosamidas, exceto em altas concentrações. Alguns *Ureaplasmas* isolados podem ser sensíveis à estreptomicina e outros aminoglicosídeos, mas não há evidência de que esses agentes sejam efetivos in vivo. Fluoroquinolonas são ativas contra *Ureaplasmas in vitro*, mas seu papel como agente terapêutico não foi estabelecido em crianças devido a seus potenciais efeitos no desenvolvimento das cartilagens. (WAITES ET AL., 2005). A taxa de resistência do *Ureaplasma* às tetraciclina é de aproximadamente 10% (CASSEL ET AL., 2001).

Entre as limitadas opções, os macrolídeos são os agentes disponíveis para uso em infecções neonatais por *Ureaplasmas*. É importante ressaltar que esses microorganismos são frequentemente oportunistas e podem estar presentes simultaneamente com outros patógenos. Decisões sobre tratamento devem refletir sobre essa possibilidade (WAITES, 2008). Assim, não apenas a escolha do antibiótico é controversa como também as dosagens, a duração do tratamento e as condições em que o tratamento deve ser recomendado. Neonatos criticamente enfermos, com pneumonite ou meningite, com culturas bacterianas negativas ou que não respondem aos antibióticos de rotina seriam candidatos à realização de culturas específicas para *Micoplasmas* genitais e tratamento, quando positivas (WAITES ET AL., 2005).

Em uma pequena série de casos de mulheres com invasão microbiana da cavidade amniótica e colo curto, o uso de Azitromicina parenteral erradicou o *Ureaplasma* em 3 de 4 casos e os nascimentos ocorreram a termo. A combinação de antibióticos com drogas antiinflamatórias pode melhorar a eficácia do tratamento (VISCARDI ET AL., 2010).

Há estudos demonstrando falha da eritromicina em eliminar *U. urealyticum* das vias aéreas de RNMBP colonizados (BAIER ET AL., 2003). Há também estudos mostrando que o tratamento com eritromicina pode erradicar *Ureaplasmas* do trato respiratório inferior, mas efeitos significativos nos desfechos respiratórios ainda não foram conclusivamente demonstrados. Estudos que usaram eritromicina no tratamento de prematuros colonizados por *Ureaplasma* nas primeiras semanas de vida não demonstraram eficácia na prevenção de DBP (BOWMAN ET AL., 1998; JONSSON ET AL., 1998). A falha em demonstrar eficácia do tratamento nestes estudos pode ter ocorrido devido ao pequeno tamanho de amostra em cada estudo ou porque o início do tratamento ocorreu tarde demais para prevenir a inflamação e o dano pulmonar que contribuem na patogênese da DBP. Como a ativação e o recrutamento neutrofílico foram implicados na patogênese da DBP, os efeitos experimentais da azitromicina observados *in vitro* e *in vivo* indicam que esta droga possa ser benéfica no tratamento da infecção por *Ureaplasma* e na prevenção da DBP em neonatos prematuros (VISCARDI ET AL., 2010).

Walls et al. observaram melhora na sobrevivência e redução na resposta inflamatória com o uso de azitromicina, enquanto eritromicina não foi diferente dos controles em modelo experimental com camundongos recém-nascidos com doença pulmonar induzida por *Ureaplasma* e oxigênio (WALLS ET AL., 2009). Isto sugere que a azitromicina pode ser eficaz se administrada imediatamente após o nascimento (VISCARDI ET AL., 2010).

Até o momento, não há evidência suficiente que determine se o tratamento antibiótico do *Ureaplasma* tem alguma influência no desenvolvimento da DBP e suas comorbidades (WAITES ET AL., 2009; SCHELONKA E WAITES, 2007; MABANTA ET AL., 2003). Para responder a esta pergunta, um grande ensaio clínico randomizado

multicêntrico seria necessário (WAITES ET AL., 1994; LYON ET AL., 1998). Entretanto, a farmacocinética, farmacodinâmica e segurança dos macrolídeos em neonatos são incertas e necessitam ser estabelecidas antes que um ensaio clínico controlado e randomizado com esses antibióticos para erradicação do *Ureaplasma* ou prevenção de DBP em prematuros possa ser realizado (VISCARDI E HASDAY, 2009; WAITES ET AL., 2009).

3- JUSTIFICATIVA

Diversos estudos evidenciam que a colonização por *Ureaplasma* pode causar não só parto prematuro como também infecção em recém-nascidos entre 23 e 32 semanas de idade gestacional, mas a real prevalência da infecção por este microorganismo em RNMBP ainda não foi estudada em nosso meio.

O melhor conhecimento sobre a prevalência do *Ureaplasma* em prematuros de muito baixo peso é de grande importância. A partir dele será possível analisar desfechos associados e possivelmente, no futuro, direcionar o tratamento e buscar medidas de prevenção.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo geral:

Avaliar a prevalência da infecção sistêmica por *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* em uma amostra de RNMBP e avaliar as possíveis associações desta infecção com diversos fatores perinatais e desfechos neonatais.

4.2- Objetivos específicos:

- Avaliar a prevalência da infecção sistêmica por *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* em RNMBP;
- Avaliar a associação entre a presença do *Ureaplasma* no sangue dos RNMBP e a causa do nascimento prematuro (trabalho de parto espontâneo x nascimento prematuro indicado);
- Avaliar a associação entre a presença do *Ureaplasma* no sangue dos RNMBP e a ocorrência de infecção ovular;
- Avaliar a associação entre a presença do *Ureaplasma* no sangue dos RNMBP e os diversos desfechos da sua evolução clínica.

5- HIPÓTESE

Uma melhor identificação diagnóstica da infecção por *Ureaplasma* poderá revelar uma elevada prevalência deste microorganismo em RNMBP.

6- METODOLOGIA

6.1- Delineamento do estudo

Estudo transversal seguido de coorte prospectivo.

6.2 - População

6.2.1- População em estudo

Recém-nascidos prematuros de muito baixo peso.

6.2.2- População da pesquisa

RNMBP nascidos ou admitidos com até 72 horas de vida na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) Neonatal do HCPA no período de março de 2009 a julho de 2010.

6.3- Amostra e amostragem

6.3.1- Critérios de inclusão

Foram considerados elegíveis para o estudo todos os recém-nascidos prematuros com peso de nascimento menor ou igual a 1500g que internaram na UTI Neonatal do HCPA nas primeiras 72 horas de vida.

6.3.2- Critérios de exclusão

- Malformações congênitas maiores ou síndromes cromossômicas
- Infecção congênita por sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus ou herpes.

6.4- Variáveis em estudo

- Infecção sistêmica por *Ureaplasma urealyticum* e/ou *parvum*, definida pela identificação destes microorganismos no sangue do recém-nascido por técnica de PCR.
- Idade materna
- Via de parto: vaginal ou cesariano
- Motivo do nascimento: TPP ou nascimento indicado
- Pré-eclâmpsia: definida como pressão arterial maior que 140 x 90 mmHg após a vigésima semana de gestação acompanhada por proteinúria significativa (WAGNER, 2004).
- Infecção ovular ou corioamnionite clínica: presença de sinais clínicos como febre materna, hipertonia uterina, líquido amniótico purulento ou com odor fétido, leucocitose materna ou ainda taquicardia fetal (THULER ET AL. 1995).
- Idade gestacional: determinada pela história obstétrica materna (data da última menstruação) e confirmada por ecografia obstétrica precoce (nas primeiras 12 semanas de gestação). Na ausência de dados maternos confiáveis, a idade gestacional foi determinada pelo exame físico do recém-nascido, através do método de New Ballard (BALLARD ET AL., 1991).
- Peso de nascimento
- Classificação: Pequeno para a idade gestacional foi definido quando abaixo do percentil 10 de acordo com a curva de Alexander et al. (ALEXANDER ET AL., 1996).
- Apgar no quinto minuto.

- Sepsis neonatal precoce comprovada: diagnosticada na presença de hemocultura positiva acompanhada de sinais clínicos de sepsis.
- Sepsis neonatal precoce presumível: considerou-se sepsis clínica a presença de um ou mais itens de pelo menos três das categorias referidas: a) Fator de risco materno como febre, infecção urinária, infecção do trato genital, corioamnionite e bolsa rota por mais de 18 horas antes do parto; b) Instabilidade térmica, sendo hipotermia a temperatura axilar inferior a 36,5°C e hipertermia superior a 37,5°C; c) Apnéia, bradipnéia, taquipnéia, gemência, retrações esternais e subcostais, batimentos de asas nasais e cianose; d) Hipotonia e convulsões; e) Irritabilidade e letargia; f) Distensão abdominal, vômitos e dificuldade de aceitação alimentar; g) Icterícia idiopática; h) Palidez cutânea, pele fria e sudorética, hipotensão e tempo de enchimento capilar superior a 3 segundos; i) Sinais de sangramento, quadro clínico de Coagulação Intravascular Disseminada; j) Avaliação subjetiva: recém-nascido que “parece não estar bem” (SILVEIRA ET AL., 2008; VIEIRA ET AL., 1997; GERDES ET AL., 1991; MIURA ET AL., 1999).
- Doença da membrana hialina: diagnosticada na presença de sinais de desconforto respiratório (gemido expiratório, batimento de asas nasais, retração esternal) com necessidade de 40% ou mais de oxigênio na presença de exame radiológico de tórax com padrão retículo-granular difuso e com necessidade de reposição de surfactante exógeno.
- Pneumonia congênita: diagnosticada na presença de sinais clínicos de desconforto respiratório acompanhado por exame radiológico de tórax compatível.

- Enterocolite necrosante: diagnosticada quando os pré-termos apresentavam intolerância alimentar, distensão abdominal ou vômitos associados com pneumatose intestinal ou pneumoperitônio ao exame radiológico de abdômen.
- Hemorragia peri-intraventricular grau III ou IV: determinada através de exames de ultrassom cerebral seriados realizados semanalmente até a sexta semana de vida ou alta hospitalar, conforme rotina assistencial do serviço, utilizando a classificação de Papile et al. (PAPILE ET AL., 1978).
- DBP: definida pela necessidade de oxigênio (O₂) suplementar nos primeiros 28 dias de vida (JOBE E BANCALARI, 2001; EHRENKRANZ ET AL., 2005).
- Tempo de internação
- Mortalidade

6.5- Logística

As mães dos pacientes foram convidadas a participar do estudo. Realizou-se em seqüência a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, com explicação das dúvidas existentes.

Quando o recém-nascido necessitava coleta de sangue dentro das primeiras 72 horas de vida, era coletado um volume adicional ao requisitado pela equipe assistente para a realização do PCR para *Ureaplasma*.

As variáveis estudadas foram obtidas a partir das informações contidas na ficha obstétrica materna, no prontuário hospitalar do recém-nascido e através das amostras de sangue do recém-nascido e do seu acompanhamento até a alta hospitalar.

As amostras de sangue coletadas eram centrifugadas e o plasma era congelado em *freezer* com temperatura de -80°C. No momento da análise, as amostras foram

descongeladas e foi realizada identificação do Uu e Up através do Kit *Ureaplasma parvum/urealyticum Real-TM* (Sacace Biotechnologies). A identificação do microorganismo foi baseada em dois processos: isolamento do DNA das amostras e amplificação em tempo real. O DNA do Up/Uu foi extraído das amostras, amplificado e detectado através de sondas fluorescentes específicas de acordo com o protocolo do fabricante. Foram realizadas amplificações em duplicata para cada amostra, com 100% de concordância nos resultados.

Os resultados foram lançados em banco de dados para análise estatística.

6.6- Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa *WinPEPI* e baseado no estudo de Viscardi *et al.* de 2009. Para um intervalo de confiança de 95%, uma população estimada de 100 RNMBP no período da coleta, uma prevalência de *Ureaplasma urealyticum* e/ou *parvum* de 18% e uma margem de erro de 5%, obteve-se um total mínimo de 70 recém-nascidos.

6.7- Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão (distribuição simétrica) ou mediana e amplitude interquartil (distribuição assimétrica). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

Para comparar as variáveis quantitativas em relação à presença ou não do *Ureaplasma* foram aplicados ou o teste *t* de Student (distribuição simétrica) ou o teste de Mann-Whitney (distribuição assimétrica). Para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas foi empregado o teste qui-quadrado.

Foi realizada uma regressão logística passo a passo (*stepwise*) com as variáveis que foram significativas na análise estatística univariada.

O nível de significância estatística adotado foi $\alpha= 5\%$ e as análises foram realizadas no programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versão 13.0.

6.8- Considerações Éticas

Toda pesquisa em seres humanos visa o mínimo de intervenções possível. Com essa preocupação, os recém-nascidos não foram submetidos a procedimentos ou coleta de sangue exclusivamente para a pesquisa. As amostras de sangue eram adicionais ao volume requisitado pelo médico assistente e em uma quantidade mínima, inferior a 2% da volemia do recém-nascido, constituindo-se em pesquisa com risco mínimo.

Os pais ou responsáveis foram devidamente esclarecidos e orientados conforme o formulário de consentimento pós-informação (anexo I). Sem a concordância destes, os recém-nascidos não foram incluídos no estudo.

O projeto e o termo de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética do HCPA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Aaltonen R, Jalava J, Laurikainen E, Kärkkäinen U, Alanen A. Cervical ureaplasma urealyticum colonization: comparison of PCR and culture for its detection and association with preterm birth. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(1):35-40.
- 2- Aaltonen R, Vahlberg T, Lehtonen L, Alanen A. Ureaplasma urealyticum: no independent role in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2006;85(11):1354-9.
- 3- Abele-Horn, M., C. Wolff, P. Dressel, A. Zimmermann, W. Vahlensieck, F. Pfaff, and G. Ruckdeschel. Polymerase chain reaction versus culture for detection of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 15:595-598.
- 4- Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol.* 1996;87:163-8.
- 5- Andrews, W. W., J. C. Hauth, S. P. Cliver, K. Savage, and R. L. Goldenberg. Randomized clinical trial of extended spectrum antibiotic prophylaxis with coverage for *Ureaplasma urealyticum* to reduce post-cesarean delivery endometritis. *Obstet. Gynecol.* 2003; 101:1183-1189.
- 6- Andrews, W. W., S. R. Shah, R. L. Goldenberg, S. P. Cliver, J. C. Hauth, and G. H. Cassell. Association of post-cesarean delivery endometritis with colonization of the chorioamnion by *Ureaplasma urealyticum*. *Obstet. Gynecol.* 1995; 85:509-514.

- 7- Baier RJ, Loggins J, Kruger TE. Failure of erythromycin to eliminate airway colonization with ureaplasma urealyticum in very low birth weight infants. BMC Pediatr. 2003 Sep 4;3:10. Epub 2003 Sep 4.
- 8- 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.
- 9- Bancalari, E., N. Claire, and I. R. Sosenko. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. Semin. Neonatol. 2003; 8:63-71.
- 10- Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, Celik O. Prevalence and antibiotic susceptibility of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in pregnant women. Int J Infect Dis. 2010 Feb;14(2):e90-5. Epub 2009 Jun 9.
- 11- Benstein BD, Crouse DT, Shanklin DR, Ourth DD. Ureaplasma in lung. 1. Localization by in situ hybridization in a mouse model. Exp Mol Pathol. 2003 Oct;75(2):165-70.
- 12- Benstein BD, Crouse DT, Shanklin DR, Ourth DD. Ureaplasma in lung. 2. Association with bronchopulmonary dysplasia in premature newborns. Exp Mol Pathol. 2003 Oct;75(2):171-7.
- 13- Berger A, Witt A, Haiden N, Kaider A, Klebermasz K, Fuiko R, Langgartner M, Pollak A. Intrauterine infection with Ureaplasma species is associated with adverse neuromotor outcome at 1 and 2 years adjusted age in preterm infants. J Perinat Med. 2009;37(1):72-8.
- 14- Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Lauterbach R. Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma respiratory tract infections in newborns. Acta Biochim Pol. 2006;53(3):609-11. Epub 2006 Oct 1.

- 15- Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Rzepecka-Weglarz B, Woźniak J, Lauterbach R. Influence of ureaplasma infection on the clinical state of newborns. *Przegl Epidemiol.* 2006;60(1):53-8.
- 16- Blanchard, A., J. Hentschel, L. Duffy, K. Baldus, and G. H. Cassell. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 17(Suppl. 1):S148-153.
- 17- Bowman ED, Dharmalingam A, Fan WQ, et al. Impact of erythromycin on respiratory colonization of *Ureaplasma urealyticum* and the development of chronic lung disease in extremely low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:615–20.
- 18- Breugelmans M, Vancutsem E, Naessens A, Laubach M, Foulon W. Association of abnormal vaginal flora and *Ureaplasma* species as risk factors for preterm birth: a cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(2):256-60.
- 19- Carey, J. C., W. C. Blackwelder, R. P. Nugent, M. A. Matteson, A. V. Rao, D. A. Eschenbach, M. L. Lee, P. J. Rettig, J. A. Regan, K. L. Geromanos, et al. Antepartum cultures for *Ureaplasma urealyticum* are not useful in predicting pregnancy outcome. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; 164:728-733.
- 20- Cassell, G. H., K. B. Waites, and D. T. Crouse. Mycoplasmal infections, p. 733-767. *In* J. S. Remington and J. O. Klein (ed.), *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 5th ed. W.B. Saunders Co., Inc., Philadelphia, Pa. 2001.
- 21- Cassell, G. H., K. B. Waites, D. T. Crouse, P. T. Rudd, K. C. Canupp, S. Stagno, and G. R. Cutter. Association of *Ureaplasma urealyticum* infection of the lower

- respiratory tract with chronic lung disease and death in very-low-birth-weight infants. *Lancet* 1988; 240-245.
- 22- Cassell, G. H., R. O. Davis, K. B. Waites, M. B. Brown, P. A. Marriott, S. Stagno, and J. K. Davis. Isolation of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from amniotic fluid at 16-20 weeks of gestation: potential effect on outcome of pregnancy. *Sex. Transm. Dis.* 1983; 10:294-302.
- 23- Cassell GH, Waites KB, Crouse DT. Perinatal mycoplasmal infections. *Clin Perinatol.* 1991 Jun;18(2):241-62.
- 24- Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev.* 1993 Jan;6(1):69-87.
- 25- Castro-Alcaraz S, Greenberg EM, Bateman DA, Regan JA. Patterns of colonization with *Ureaplasma urealyticum* during neonatal intensive care unit hospitalizations of very low birth weight infants and the development of chronic lung disease. *Pediatrics.* 2002 Oct;110(4):e45.
- 26- Clifford V, Tebruegge M, Everest N, Curtis N. *Ureaplasma*: pathogen or passenger in neonatal meningitis? *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Jan;29(1):60-4.
- 27- Cloherty JP, Eichenwald EC, Stark AR. *Manual of Neonatal Care*. Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2008.
- 28- Colaizy TT, Morris CD, Lapidus J, Sklar RS, Pillers DA. Detection of *ureaplasma* DNA in endotracheal samples is associated with bronchopulmonary dysplasia after adjustment for multiple risk factors. *Pediatr Res.* 2007 May;61(5 Pt 1):578-83.

- 29- Colaizy, T. T., T. Kuforiji, R. S. Sklar, and A. M. Pillers de. PCR methods in clinical investigations of human ureaplasmas: a minireview. *Mol. Genet. Metab.* 2003; 80:389-397.
- 30- Colaizy TT, Morris CD, Lapidus J, Sklar RS, Pillers DA. Detection of ureaplasma DNA in endotracheal samples is associated with bronchopulmonary dysplasia after adjustment for multiple risk factors. *Pediatr Res.* 2007 May;61(5 Pt 1):578-83.
- 31- Crouse, D. T., G. H. Cassell, K. B. Waites, J. M. Foster, and G. Cassady. Hyperoxia potentiates *Ureaplasma urealyticum* pneumonia in newborn mice. *Infect. Immun.* 1990; 58:3487-3493.
- 32- Crouse, D. T., G. T. Odrezin, G. R. Cutter, J. M. Reese, W. B. Hamrick, K. B. Waites, and G. H. Cassell. Radiographic changes associated with tracheal isolation of *Ureaplasma urealyticum* from neonates. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 17(Suppl. 1):S122-S130.
- 33- Cultrera R, Seraceni S, Germani R, Contini C. Molecular evidence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* colonization in preterm infants during respiratory distress syndrome. *BMC Infect Dis.* 2006 Nov 21;6:166.
- 34- Cunliffe, N. A., S. Fergusson, F. Davidson, A. Lyon, and P. W. Ross. Comparison of culture with the polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma urealyticum* in endotracheal aspirates of preterm infants. *J. Med. Microbiol.* 1996; 45:27-30.
- 35- Dammann O, Allred EN, Genest DR, et al. Antenatal mycoplasma infection, the fetal inflammatory response and cerebral white matter damage in very-low-birthweight infants. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2003;17(1):49–57.

- 36-De Silva, N. S., and P. A. Quinn. Characterization of phospholipase A1, A2, C activity in *Ureaplasma urealyticum* membranes. *Mol. Cell. Biochem.* 1999; 201:159-167.
- 37-De Silva, N. S., and P. A. Quinn. Localization of endogenous activity of phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum*. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:1498-1503.
- 38-Dyke, M. P., A. Grauaug, R. Kohan, K. Ott, and R. Andrews. *Ureaplasma urealyticum* in a neonatal intensive care population. *J. Paediatr. Child Health.* 1993; 29:295-297.
- 39-Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA, Wrage LA, Poole K; National Institutes of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics.* 2005 Dec;116(6):1353-60.
- 40-Foulon, W., A. Naessens, M. Dewaele, S. Lauwers, and J. J. Amy. Chronic *Ureaplasma urealyticum* amnionitis associated with abruptio placentae. *Obstet. Gynecol.* 1986; 68:280-282.
- 41-Galetto LA, Zamora S, Bertrand R, Brighi Perret I, Auckenthaler R, Berner M, Suter S. Colonization by *Ureaplasma urealyticum* and chronic lung disease in premature newborn infants under 32 weeks of gestation. *Arch Pediatr.* 2001 Jan;8(1):39-46.
- 42-Gerber, S., Y. Vial, P. Hohlfeld, and S. S. Witkin. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J. Infect. Dis.* 2003; 187:518-521.

- 43- Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 1991 Jun;18(2):361-81.
- 44- Gnarp, H., and J. Friberg. Mycoplasma and human reproductive failure. I. The occurrence of different Mycoplasmas in couples with reproductive failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1972; 114:727-731.
- 45- Goldenberg RL, Andrews WW, Goepfert AR, et al. The Alabama Preterm Birth Study: Umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 43.e1-43.e5.
- 46- Goncalves, L. F., T. Chaiworapongsa, and R. Romero. Intrauterine infection and prematurity. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 2002; 8:3-13.
- 47- Gray, D. J., H. B. Robinson, J. Malone, and R. B. Thomson, Jr. Adverse outcome in pregnancy following amniotic fluid isolation of *Ureaplasma urealyticum*. *Prenat. Diagn.* 1992; 12:111-117.
- 48- Hamrick, H. J., M. E. Mangum, and V. L. Katz. *Ureaplasma urealyticum* abscess at site of an internal fetal heart rate monitor. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1993; 12:410-411.
- 49- Harada K, Tanaka H, Komori S, Tsuji Y, Nagata K, Tsutsui H, Koyama K. Vaginal infection with *Ureaplasma urealyticum* accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. *Microbiol Immunol.* 2008 Jun;52(6):297-304.
- 50- Heggie AD, Bar-Shain D, Boxerbaum B, Fanaroff AA, O'Riordan MA, Robertson JA. Identification and quantification of ureaplasmas colonizing the respiratory tract and assessment of their role in the development of chronic lung disease in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Sep;20(9):854-9.

- 51-Heggie AD, Jacobs MR, Butler VT, Baley JE, Boxerbaum B. Frequency and significance of isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from cerebrospinal fluid and tracheal aspirate specimens from low birth weight infants. *J Pediatr* 1994; 124: 956–961.
- 52-Honma Y, Yada Y, Takahashi N, Momoi MY, Nakamura Y. Certain type of chronic lung disease of newborns is associated with *Ureaplasma urealyticum* infection in utero. *Pediatr Int.* 2007 Aug;49(4):479-84.
- 53-Horowitz, S., M. Mazor, R. Romero, J. Horowitz, and M. Glezerman. Infection of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* in the midtrimester of pregnancy. *J. Reprod. Med.* 1995; 40:375-379.
- 54-Izraeli S, Samra Z, Sirota L, Merlob P, Davidson S. Genital mycoplasmas in preterm infants: prevalence and clinical significance. *Eur J Pediatr.* 1991 Sep;150(11):804-7.
- 55-Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jun;163(7):1723-9.
- 56-Jonsson, B., M. Rylander, and G. Faxelius. *Ureaplasma urealyticum*, erythromycin and respiratory morbidity in high-risk preterm neonates. *Acta Paediatr.* 1998; 87:1079-1084.
- 57-Kafetzis, D. A., C. L. Skevaki, V. Skouteri, S. Gavriili, K. Peppas, C. Kostalos, V. Petrochilou, and S. Michalakis. Maternal genital colonization with *Ureaplasma urealyticum* promotes preterm delivery: association of the respiratory colonization of premature infants with chronic lung disease and increased mortality. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39:1113-1122.
- 58-Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. Association between preterm birth and vaginal

- colonization by mycoplasmas in early pregnancy. *J Clin Microbiol.* 2006 Jan;44(1):51-5.
- 59-Katz B, Patel P, Duffy L, Schelonka RL, Dimmitt RA, Waites KB. Characterization of ureaplasmas isolated from preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4852-4.
- 60-Kaufman, D., and K. D. Fairchild. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:638-680.
- 61-Kirchner L, Helmer H, Heinze G, Wald M, Brunbauer M, Weninger M, Zaknun D. Amnionitis with *Ureaplasma urealyticum* or other microbes leads to increased morbidity and prolonged hospitalization in very low birth weight infants. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007 Sep;134(1):44-50. Epub 2006 Nov 13.
- 62-Klein, L. L., and R. S. Gibbs. Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; 190:1493-1502.
- 63-Kotecha S, Hodge R, Schaber JA, Miralles R, Silverman M, Grant WD. Pulmonary *Ureaplasma urealyticum* is associated with the development of acute lung inflammation and chronic lung disease in preterm infants. *Pediatr Res.* 2004 Jan;55(1):61-8. Epub 2003 Nov 6.
- 64-Koyama, M., S. Ito, A. Nakajima, K. Shimoya, C. Azuma, N. Suehara, Y. Murata, and H. Tojo. Elevations of group II phospholipase A2 concentrations in serum and amniotic fluid in association with preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 183:1537-1543.

- 65-Kundsini, R. B., A. Leviton, E. N. Allred, and S. A. Poulin. Ureaplasma urealyticum infection of the placenta in pregnancies that ended prematurely. *Obstet. Gynecol.* 1996; 87:122-127.
- 66-Likitnukul S, Kusmiesz H, Nelson JD, McCracken GH Jr. Role of genital mycoplasmas in young infants with suspected sepsis. *J Pediatr.* 1986 Dec;109(6):971-4.
- 67-Luki, N., P. Lebel, M. Boucher, B. Doray, J. Turgeon, and R. Brousseau. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 17:255-263.
- 68-Lyon, A. Chronic lung disease of prematurity. The role of intra-uterine infection. *Eur. J. Pediatr.* 2000; 159:798-802.
- 69-Lyon, A. J., J. McColm, L. Middlemist, S. Fergusson, N. McIntosh, and P. W. Ross. Randomised trial of erythromycin on the development of chronic lung disease in preterm infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal.* 1998; 78:F10-14.
- 70-Mabanta CG, Pryhuber GS, Weinberg GA, Phelps DL. Erythromycin for the prevention of chronic lung disease in intubated preterm infants at risk for, or colonized or infected with Ureaplasma urealyticum. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(4):CD003744.
- 71-Mac Donald MG, Mullett MD, Seshia MMK. *Avery's Neonatology: Pathophysiology & Management of the Newborn.* Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2005.
- 72-Manimtim, W. M., J. D. Hasday, L. Hester, K. D. Fairchild, J. C. Lovchik, and R. M. Viscardi. Ureaplasma urealyticum modulates endotoxin-induced cytokine

- release by human monocytes derived from preterm and term newborns and adults. *Infect. Immun.* 2001; 69:3906-3915.
- 73-Matthews, C. D., R. G. Elmslie, K. H. Clapp, and J. M. Svigos. The frequency of genital mycoplasma infection in human fertility. *Fertil. Steril.* 1975; 26:988-990.
- 74-Mitsunari M, Yoshida S, Deura I, Horie S, Tsukihara S, Harada T, Irie T, Terakawa N. Cervical *Ureaplasma urealyticum* colonization might be associated with increased incidence of preterm delivery in pregnant women without prophlogistic microorganisms on routine examination. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005 Feb;31(1):16-21.
- 75-Miura E, Silveira RC, Procianoy RS. Neonatal sepsis: diagnosis and treatment. *J Pediatr (Rio J).* 1999 Jul;75 Suppl 1:S57-62.
- 76-Nasution TA, Cheong SF, Lim CT, Leong EW, Ngeow YF. Multiplex PCR for the detection of urogenital pathogens in mothers and newborns. *Malays J Pathol.* 2007 Jun;29(1):19-24.
- 77-Nelson, S., A. Matlow, G. Johnson, C. Th'ng, M. Dunn, and P. Quinn. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in endotracheal tube aspirates from neonates by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:1236-1239.
- 78-Normann E, Lacaze-Masmonteil T, Eaton F, Schwendimann L, Gressens P, Thébaud B. A novel mouse model of *Ureaplasma*-induced perinatal inflammation: effects on lung and brain injury. *Pediatr Res.* 2009 Apr;65(4):430-6.
- 79-Novy MJ, Duffy L, Axthelm MK, Sadowsky DW, Witkin SS, Gravett MG, Cassell GH, Waites KB. *Ureaplasma parvum* or *Mycoplasma hominis* as sole

- pathogens cause chorioamnionitis, preterm delivery, and fetal pneumonia in rhesus macaques. *Reprod Sci.* 2009 Jan;16(1):56-70. Epub 2009 Jan 2.
- 80-Ollikainen, J., H. Hiekkaniemi, M. Korppi, M. L. Katila, and K. Heinonen. Hydrops fetalis associated with *Ureaplasma urealyticum*. *Acta Paediatr.* 1992; 81:851-852.
- 81-Ollikainen J, Korppi M, Heiskanen-Kosma T, Heinonen K. Chronic lung disease of the newborn is not associated with *Ureaplasma urealyticum*. *Pediatr Pulmonol.* 2001 Oct;32(4):303-7.
- 82-Olomu IN, Hecht JL, Onderdonk AO, Allred EN, Leviton A. Perinatal correlates of *Ureaplasma urealyticum* in placenta parenchyma of singleton pregnancies that end before 28 weeks of gestation. *Pediatrics.* 2009 May;123(5):1329-36.
- 83-Pacifico L, Panero A, Roggini M, Rossi N, Bucci G, Chiesa C. *Ureaplasma urealyticum* and pulmonary outcome in a neonatal intensive care population. *Pediatr Infect Dis J.* 1997 Jun;16(6):579-86.
- 84-Pandey A, Dhawan B, Gupta V, Chaudhry R, Deorari AK. Clinical significance of airways colonization with *Ureaplasma urealyticum* in premature (<34 wk) neonates. *Indian J Med Res.* 2007 May;125(5):679-84.
- 85-Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr.* 1978;92:529-34.
- 86-Payne MS, Goss KC, Connett GJ, Kollamparambil T, Legg JP, Thwaites R, Ashton M, Puddy V, Peacock JL, Bruce KD. Molecular microbiological characterization of preterm neonates at risk of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res.* 2010 Apr;67(4):412-8.

- 87-Raynes-Greenow, C. H., C. L. Roberts, J. C. Bell, B. Peat, and G. L. Gilbert. Antibiotics for ureaplasma in the vagina in pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003767. 2004.
- 88-Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr.* 2001 Jan;138(1):92-100.
- 89-Sahni, R., A. Ammari, M. S. Suri, V. Milisavljevic, K. Ohira-Kist, J. T. Wung, and R. A. Polin. Is the new definition of bronchopulmonary dysplasia more useful? *J. Perinatol.* 2005; 25:41-46.
- 90-Sanchez, P. J., and J. A. Regan. *Ureaplasma urealyticum* colonization and chronic lung disease in low birth weight infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1988; 7:542-546.
- 91-Schelonka, R. L., F. M. Raaphorst, D. Infante, E. Kraig, J. M. Teale, and A. J. Infante. T cell receptor repertoire diversity and clonal expansion in human neonates. *Pediatr. Res.* 1998; 43:396-402.
- 92-Schelonka RL, Katz B, Waites KB, Benjamin Jr DK. Critical appraisal of the role of *Ureaplasma* in the development of bronchopulmonary dysplasia with metaanalytic techniques. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 1033–1039.
- 93-Schelonka RL, Waites KB. *Ureaplasma* infection and neonatal lung disease. *Semin Perinatol.* 2007 Feb;31(1):2-9.
- 94-Sethi, S., M. Sharma, A. Narang, and P. B. Aggrawal. Isolation pattern and clinical outcome of genital mycoplasma in neonates from a tertiary care neonatal unit. *J. Trop. Pediatr.* 1999; 45:143-145.
- 95-She RC, Simmon KE, Bender JM, Ampofo K, Petti CA. Mollicute infections in neonates. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Mar;28(3):248-50.

- 96- Silveira RC, Procianoy RS, Dill JC, da Costa CS. Periventricular leukomalacia in very low birth weight preterm neonates with high risk for neonatal sepsis. *J Pediatr.* 2008 may-jun;84(3):211-216.
- 97- Stray-Pedersen, B., A. L. Bruu, and K. Molne. Infertility and uterine colonization with *Ureaplasma urealyticum*. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1982; 61:21-24.
- 98- Stray-Pedersen, B., J. Eng, and T. M. Reikvam. Uterine T-mycoplasma colonization in reproductive failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1978; 130:307-311.
- 99- Taylor-Robinson, D., J. G. Ainsworth, and W. M. McCormack. Genital mycoplasmas, p. 533-548. *In* K. K. Holmes, P. A. Mardh, P. F. Sparling, W. Wiesner, S. Cases, S. M. Lemon, W. E. Stamm, P. Piot, and J. N. Wasserheit (ed.), *Sexually transmitted diseases*, 3rd ed. McGraw Hill, New York, N.Y. 1999.
- 100- Theilen U, Lyon AJ, Fitzgerald T, Hendry GM, Keeling JW. Infection with *Ureaplasma urealyticum*: is there a specific clinical and radiological course in the preterm infant? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004 Mar;89(2):F163-7.
- 101- Thuler LC. Diagnóstico microbiológico das bacteremias. *JBM* 1995; 69:123-8.
- 102- Upadhyaya, M., B. M. Hibbard, and S. M. Walker. The role of mycoplasmas in reproduction. *Fertil. Steril.* 1983; 39:814-818.
- 103- Valencia, G. B., F. Banzon, M. Cummings, W. M. McCormack, L. Glass, and M. R. Hammerschlag. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in neonates with suspected infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1993; 12:571-573.

- 104- Vieira RCS, Procianoy RS, Mulle LD, Prado CHA. The influence of intrapartum antibiotic therapy on the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *J Pediatr (Rio J)*. 1997 May-Jun;73(3):171-5.
- 105- Viscardi RM, Hasday JD. Role of *Ureaplasma* species in neonatal chronic lung disease: epidemiologic and experimental evidence. *Pediatr Res*. 2009 May;65(5 Pt 2):84R-90R.
- 106- Viscardi RM, Hashmi N, Gross GW, Sum C-CJ, Rodrigues A, Fairchild KD. Incidence of invasive *Ureaplasma* in VLBW infants: relationship to severe intraventricular hemorrhage. *J.of Perinatology* 2008;1-7.
- 107- Viscardi RM, Manimtim WM, Sun CC, Duffy L, Cassell GH. Lung pathology in premature infants with *Ureaplasma urealyticum* infection. *Pediatr Dev Pathol*. 2002 Mar-Apr;5(2):141-50.
- 108- Viscardi RM. *Ureaplasma* Species: Role in diseases of prematurity. *Clin Perinatol*. 2010 Jun; 37(2): 393-409.
- 109- Volgmann T, Ohlinger R, Panzig B. *Ureaplasma urealyticum*-harmless commensal or underestimated enemy of human reproduction? A review. *Arch Gynecol Obstet*. 2005 Dec;273(3):133-9. Epub 2005 Jul 26.
- 110- Wagner L. Diagnosis and Management of Preeclampsia. *American Family Physician* 2004; 70: 2317-2324.
- 111- Waites KB, Crouse DT, Philips JB 3rd, Canupp KC, Cassell GH. *Ureaplasma* pneumonia and sepsis associated with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics*. 1989 Jan;83(1):79-85.
- 112- Waites, K. B., D. T. Crouse, and G. H. Cassell. Systemic neonatal infection due to *Ureaplasma urealyticum*. *Clin. Infect. Dis*. 1993; 17(Suppl. 1):S131-S135.

- 113- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev.* Oct 2005; 18(4):757-89.
- 114- Waites, K. B., P. J. Sims, D. T. Crouse, M. H. Geerts, R. E. Shoup, W. B. Hamrick, L. B. Duffy, and G. H. Cassell. Serum concentrations of erythromycin after intravenous infusion in preterm neonates treated for *Ureaplasma urealyticum* infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1994; 13:287-293.
- 115- Waites KB, Rudd PT, Crouse DT, Canupp KC, Nelson KG, Ramsey C, Cassell GH. Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections of central nervous system in preterm infants. *Lancet.* 1988; Jan 2-9;1(8575-6):17-21.
- 116- Waites KB, Schelonka RL, Xiao L, Grigsby PL, Novy MJ. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009 Aug;14(4):190-9. Epub 2008 Dec 23.
- 117- Waites KB. *Ureaplasma* Infection. *eMedicine Infectious Diseases.* Updated 2008 Mar; 27.
- 118- Walls SA, Kong L, Leeming HA, Placencia FX, Popek EJ, Weisman LE. Antibiotic prophylaxis improves *Ureaplasma*-associated lung disease in suckling mice. *Pediatr Res.* 2009 Aug;66(2):197-202.
- 119- Walsh, W. F., J. Butler, J. Coalson, D. Hensley, G. H. Cassell, and R. A. deLemos. A primate model of *Ureaplasma urealyticum* infection in the premature infant with hyaline membrane disease. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 17(Suppl. 1):S158-S162.
- 120- Wang EE, Ohlsson A, Kellner JD. Association of *Ureaplasma urealyticum* colonization with chronic lung disease of prematurity: results of a metaanalysis. *J Pediatr* 1995; 127: 640-644.

- 121- Yoon, B. H., R. Romero, J. H. Lim, S. S. Shim, J. S. Hong, J. Y. Shim, and J. K. Jun. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003; 189:919-924.
- 122- Yoon, B. H., R. Romero, J. K. Jun, K. H. Park, J. D. Park, F. Ghezzi, and B. I. Kim. Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997; 177:825-830.
- 123- Yoon, B. H., R. Romero, J. S. Park, J. W. Chang, Y. A. Kim, J. C. Kim, and K. S. Kim. Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998; 179:1254-1260.
- 124- Yoon, B. H., R. Romero, M. Kim, E. C. Kim, T. Kim, J. S. Park, and J. K. Jun. Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 183:1130-1137.

8- ARTIGO EM PORTUGUÊS

PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR *UREAPLASMA UREALYTICUM* E *PARVUM* EM RECÉM-NASCIDOS DE MUITO BAIXO PESO

Luciana T. Fonseca (1)

Rita C. Silveira (2)

Renato S. Procianoy (3)

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

(2) Professora Adjunta de Pediatria da UFRGS, Chefe do Ambulatório de Seguimento dos Prematuros do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

(3) Professor Titular de Pediatria da UFRGS, Chefe do Serviço de Neonatologia do HCPA.

Departamento de Pediatria, Serviço de Neonatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Fonte de Financiamento: FIPE/HCPA.

Palavras-chave: *Ureaplasma*; prematuridade; sepse neonatal; trabalho de parto prematuro.

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

RESUMO

Introdução: Há tempos Micoplasmas Genitais como o *Ureaplasma* vêm sendo implicados na patogênese de trabalho de parto prematuro e morbidade neonatal, mas seu real papel permanece obscuro e sua prevalência no sangue de recém-nascidos de muito baixo peso ainda não foi estudada em nosso meio.

Objetivo: Determinar a prevalência da infecção por *Ureaplasma urealyticum* (Uu) e *Ureaplasma parvum* (Up) em uma amostra de recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP) e avaliar os fatores associados.

Pacientes e métodos: Foi realizada extração de DNA de amostras de sangue de RNMBP coletadas nas primeiras 72 horas de vida e a presença de Uu e/ou Up foi identificada por técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Os recém-nascidos foram acompanhados até a alta hospitalar.

Resultados: Noventa e cinco recém-nascidos de muito baixo peso foram incluídos no estudo. A detecção de Uu e/ou Up ocorreu em 12 recém-nascidos (12,63%). Em 5,26% foi detectado somente Uu, em 5,26% somente Up e em 2,11% ambos. Na análise univariada a presença de *Ureaplasma* foi associada à infecção ovular e a trabalho de parto prematuro. Pré-eclâmpsia e ser PIG foram associados a menor ocorrência de *Ureaplasma*. Quando analisados apenas os nascimentos decorrentes de trabalho de parto prematuro, a prevalência da infecção por *Ureaplasma* foi de 25%. Pela regressão logística passo a passo, somente trabalho de parto prematuro manteve-se estatisticamente significativo aumentando em 9 vezes a chance de positividade para *Ureaplasma*.

Conclusão: A infecção por *Ureaplasma* é comum em recém-nascidos de muito baixo peso, principalmente entre os nascidos de trabalho de parto prematuro, reforçando a hipótese de associação entre prematuridade e infecção por *Ureaplasma*.

Palavras-chave: *Ureaplasma*, prematuridade, sepse neonatal, parto prematuro, displasia broncopulmonar.

INTRODUÇÃO

O *Ureaplasma urealyticum*, dividido recentemente em *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, é um microorganismo classificado como *Micoplasma*, que pode colonizar o trato genital feminino em até 67% das mulheres sexualmente ativas na idade reprodutora¹. É o microorganismo mais frequentemente isolado do líquido amniótico e da placenta de mães de recém-nascidos prematuros². A colonização por *Ureaplasma* em gestantes está associada à ruptura prematura de membranas, corioamnionite e parto prematuro¹⁻³. Há evidências de que o tempo, a duração e a intensidade da resposta inflamatória à infecção por *Ureaplasma* sejam os principais determinantes dos resultados gestacionais e neonatais¹.

O foco principal do *Ureaplasma* no neonato é pulmonar. Ele pode causar pneumonia congênita e a bacteremia por *Ureaplasma* pode ser acompanhada de pneumonia grave⁴. O *Ureaplasma* é encontrado colonizando o trato respiratório de 20 a 45% dos RNMBP¹ e tem sido associado à displasia broncopulmonar (DBP) e doença pulmonar crônica⁵⁻⁷, embora existam controvérsias sobre a real contribuição deste microorganismo no desenvolvimento da DBP⁸. *Micoplasmas* genitais como *Ureaplasma*, eventualmente, são isolados do sangue de recém-nascidos sépticos. Foi relatado que em recém-nascidos com culturas endotraqueais positivas para *Ureaplasma urealyticum* pode ocorrer bacteremia concomitante em 26% dos casos⁹; entretanto, outros autores não isolaram *Micoplasmas* genitais do sangue ou do líquido de recém-nascidos com suspeita de sepse^{10, 11}, o que pode ter ocorrido devido às suas peculiares necessidades para crescimento em cultura, que geram dificuldades na sua detecção.

A proposta deste estudo é determinar a prevalência do *Ureaplasma urealyticum* e do *Ureaplasma parvum* em RNMBP através da identificação destes patógenos no sangue por técnica de PCR e avaliar as possíveis associações desta infecção com diversos fatores perinatais e desfechos neonatais.

PACIENTES E MÉTODOS

População e logística:

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo onde foram considerados elegíveis todos os recém-nascidos prematuros com peso de nascimento menor ou igual a 1500g que internaram na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) nas primeiras 72 horas de vida, no período de março de 2009 a julho de 2010. Foram excluídos os recém-nascidos portadores de malformações congênitas maiores, síndromes cromossômicas e infecções congênitas do grupo STORCH (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes). Os recém-nascidos foram acompanhados até a alta hospitalar ou óbito.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e o termo de consentimento informado foi assinado pelos pais ou responsáveis. As amostras de sangue foram coletadas nas primeiras 72 horas de vida, em pequeno volume adicional, junto ao requisitado pelo médico assistente.

A idade gestacional foi determinada pela história obstétrica materna (data da última menstruação) e confirmada por ecografia obstétrica precoce (nas primeiras 12 semanas de gestação). Na ausência de dados maternos confiáveis, a idade gestacional foi determinada pelo exame físico do recém-nascido através do método de New

Ballard¹². Pequeno para idade gestacional (PIG) foi definido quando abaixo do percentil 10 de acordo com a curva de Alexander et al¹³.

Foi considerada corioamnionite clínica ou infecção ovular a presença de sinais clínicos como febre materna, hipertonia uterina, líquido amniótico purulento ou com odor fétido, leucocitose materna ou taquicardia fetal¹⁴.

Pré-eclâmpsia foi definida como pressão arterial maior que 140 x 90 mmHg após a vigésima semana de gestação, acompanhada por proteinúria significativa¹⁵.

Considerou-se Doença da Membrana Hialina (DMH) quando o recém-nascido apresentava sinais de desconforto respiratório (gemido expiratório, batimento de asas nasais, retração esternal) com necessidade de 40% ou mais de oxigênio na presença de exame radiológico de tórax com padrão retículo-granular difuso e com necessidade de reposição de surfactante exógeno.

O diagnóstico de pneumonia congênita foi baseado em sinais clínicos de desconforto respiratório acompanhado por exame radiológico de tórax compatível.

O diagnóstico clínico de infecção foi baseado na presença de um ou mais itens de pelo menos três das categorias referidas: a) Fator de risco materno como febre, infecção urinária, infecção do trato genital, corioamnionite e bolsa rota por mais de 18 horas antes do parto; b) Instabilidade térmica, sendo hipotermia a temperatura axilar inferior a 36,5°C e hipertermia superior a 37,5°C; c) Apneia, bradipneia, taquipneia, gemência, retrações esternais e subcostais, batimentos de asas nasais e cianose; d) Hipotonia e convulsões; e) Irritabilidade e letargia; f) Distensão abdominal, vômitos e dificuldade de aceitação alimentar; g) Icterícia idiopática; h) Palidez cutânea, pele fria e sudorética, hipotensão e tempo de enchimento capilar superior a 3 segundos; i) Sinais de sangramento, quadro clínico de Coagulação Intravascular Disseminada; j) Avaliação

subjetiva: recém-nascido que “parece não estar bem”¹⁶⁻¹⁹. Havendo cultura positiva foi estabelecido o diagnóstico de sepse neonatal comprovada.

Enterocolite necrosante (ECN) foi diagnosticada quando os pré-termos apresentavam intolerância alimentar, distensão abdominal ou vômitos associados com pneumatose intestinal ou pneumoperitônio ao exame radiológico de abdômen.

A presença de Hemorragia peri-intraventricular (HPIV) foi determinada através de exames de ultrassom cerebral seriados realizados semanalmente até a sexta semana de vida ou alta hospitalar conforme rotina assistencial do serviço, utilizando a classificação de Papile et al²⁰.

Displasia broncopulmonar foi definida pela necessidade de oxigênio (O₂) suplementar nos primeiros 28 dias de vida^{21,22}.

Extração do DNA e PCR:

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas e o plasma foi congelado em *freezer* com temperatura de -80°C. No momento da análise, as amostras foram descongeladas e foi realizada identificação do Uu/Up através do Kit *Ureaplasma parvum/urealyticum* Real-TM (Sacace Biotechnologies). A identificação do microorganismo foi baseada em dois processos: isolamento do DNA das amostras e amplificação em tempo real. O DNA do Uu/Up foi extraído das amostras, amplificado e detectado através de sondas fluorescentes específicas de acordo com o protocolo do fabricante. Foram realizadas amplificações em duplicata para cada amostra, com 100% de concordância nos resultados.

Análise estatística:

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa WinPEPI e baseado no estudo de Viscardi et al. de 2009²³. Para um intervalo de confiança de 95%, uma população estimada de 100 RNMBP no período da coleta, uma prevalência de *Ureaplasma urealyticum* e/ou *parvum* de 18% e uma margem de erro de 5%, obteve-se um total mínimo de 70 recém-nascidos.

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão (distribuição simétrica) ou mediana e amplitude interquartil (distribuição assimétrica). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

Para comparar as variáveis quantitativas em relação à presença ou não do *Ureaplasma*, foram aplicados ou o teste *t* de Student (distribuição simétrica) ou o teste de Mann-Whitney (distribuição assimétrica). Para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas, foi empregado o teste qui-quadrado.

Foi realizada uma regressão logística passo a passo (*stepwise*) com as variáveis que foram significativas na análise estatística univariada.

O nível de significância estatística adotado foi $p < 0,05$ e as análises foram realizadas no programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versão 13.0.

RESULTADOS

No período do estudo, 106 RNMBP foram internados no HCPA nas primeiras 72h de vida. Destes, 6 foram excluídos (2 devido a malformações congênicas e 4 devido a infecção congênita do grupo STORCH) e 5 foram perdidos (amostra insuficiente ou recusa dos pais em participar da pesquisa). Noventa e cinco recém-nascidos participaram da análise final.

A prevalência da infecção por Uu e/ou Up foi de 12,63% (12 casos): 5 (5,26%) positivos somente para Uu, 5 (5,26%) positivos somente para Up e 2 (2,11%) positivos para ambos. Os recém-nascidos foram divididos em dois grupos: um positivo para Uu e/ou Up e outro negativo para ambos.

Os dois grupos foram similares quanto à idade materna, peso de nascimento, idade gestacional, proporção de parto cesariano, escore de Apgar no quinto minuto, tempo de internação e mortalidade. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à incidência de DMH, pneumonia congênita, sepse precoce presumível, sepse precoce comprovada por cultura, ECN, HPIV grau III ou IV e DBP (Tabela 1).

Pela análise univariada, a presença de *Ureaplasma* foi associada à infecção ovular ($p= 0,024$) e a trabalho de parto prematuro ($p= 0,003$). Pré-eclâmpsia e ser PIG associou-se com menor ocorrência de PCR positivo para *Ureaplasma* ($p=0,025$ e $p=0,024$ respectivamente) (Tabela 1). Quando analisados apenas os nascimentos decorrentes de trabalho de parto prematuro, a prevalência da infecção por *Ureaplasma* foi de 25% (10 positivos em 40 casos).

A regressão logística passo a passo (*stepwise*) mostrou que, entre as variáveis significativas na análise univariada, a única que se manteve significativa foi o trabalho de parto prematuro (OR= 9,138 IC 95% 1,874- 44,553, $p=0,006$).

Tabela 1. Comparação dos fatores perinatais entre recém-nascidos com e sem *Ureaplasma* no sangue

	Pacientes negativos para <i>Ureaplasma</i>	Pacientes positivos para <i>Ureaplasma</i>	P
Idade materna	26,16 +- 6,61	25,25 +- 6,12	0,655
Peso de nascimento	1051,46 +- 297,74	1090,42 +- 337,66	0,678
Idade gestacional	29,57 +- 2,59	28,17 +- 2,65	0,085
Parto cesariano	63 (75,9%)	8 (66,7%)	0,491
Trabalho de parto prematuro	30 (36,1%)	10 (83,3%)	0,003*
Pré-eclâmpsia	36 (43,9%)	1 (8,3%)	0,025*
Infecção ovular	15 (18,3%)	6 (50%)	0,024*
Pequeno para idade gestacional	42 (50,6%)	2 (16,7%)	0,033*
Apgar 5'	7,24 +- 2,15	6,92 +- 2,67	0,762
Doença de Membrana Hialina	53 (63,9%)	7 (63,6%)	1,000
Pneumonia congênita	8 (9,6%)	0 (0%)	0,590
Sepse precoce clínica	64 (77,1%)	10 (90,9%)	0,447
Sepse precoce comprovada	2 (2,4%)	0 (0%)	1,000
Enterocolite Necrosante	13 (15,7%)	3 (27,3%)	0,391
Hemorragia Peri-intraventricular graus III ou IV	13 (18,3%)	2 (20%)	1,000
Displasia Broncopulmonar	15 (26,8%)	2 (25%)	1,000
Tempo de internação	60,46 +- 33,18	58,88 +- 36,67	0,701
Mortalidade	33 (39,8%)	4 (33,3%)	0,760

* Diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

Dados apresentados em média +- desvio padrão ou número de positivos (%).

DISCUSSÃO

Em nosso estudo encontramos uma prevalência de infecção por *Ureaplasma* no sangue de RNMBP de 12,6% e uma associação significativa da presença deste microorganismo com trabalho de parto prematuro. Encontramos também relação entre positividade para *Ureaplasma* e infecção ovular e uma associação inversa com pré-eclâmpsia e ser PIG; mas após regressão logística, apenas trabalho de parto prematuro manteve significância estatística, aumentando em 9 vezes a chance de positividade para *Ureaplasma*.

O papel deste microorganismo como causador de infecção ovular, aborto espontâneo e trabalho de parto prematuro já foi bem documentado por diversos autores^{7, 24-27}, e existem artigos explicando os mecanismos fisiopatológicos pelos quais o *Ureaplasma* desencadeia trabalho de parto prematuro, mesmo em casos de infecção subclínica²⁸⁻³². Nossos achados reforçam este papel ao demonstrar que a taxa de infecção por *Ureaplasma* é maior entre pré-termos nascidos devido a trabalho de parto prematuro do que entre aqueles casos de gestação interrompida devido a outras patologias, sendo a pré-eclâmpsia a mais frequente delas. Kundsinn et al. observaram que as placentas com menores taxas de recuperação de *Ureaplasma* foram de nascimentos devido a PE ou crescimento intrauterino restrito³³. Nós também encontramos uma associação inversa entre pré-eclâmpsia e ser PIG com a presença de *Ureaplasma*. Isto ocorre porque a maioria dos casos de nascimentos sem trabalho de parto espontâneo é de mães com pré-eclâmpsia e de fetos com crescimento intra-uterino restrito. Entretanto, essa associação não se manteve estatisticamente significativa após análise multivariada na nossa amostra.

Muitos estudos associaram colonização respiratória do neonato por *Ureaplasma* e DBP, e duas metanálises reforçam esta associação^{6, 5}. Em nosso estudo, não encontramos associação entre a presença de *Ureaplasma* no sangue e a ocorrência de DBP. Nossos achados estão de acordo com o descrito, já que os dois únicos estudos que pesquisaram infecção invasiva do neonato pré-termo por *Ureaplasma*^{34, 35} também não encontraram associação estatisticamente significativa com DBP.

A prevalência de infecção por *Ureaplasma* encontrada por nós foi inferior à descrita na literatura. Goldenberg et al. realizaram cultura de sangue de cordão umbilical de prematuros nascidos entre 23 e 32 semanas de idade gestacional e encontraram uma prevalência de *U. urealyticum* de 17,9%³⁴. Viscardi et al. realizaram PCR a partir do DNA extraído de sangue de cordão umbilical ou venoso (quando o sangue de cordão não estava disponível) e do LCR de RNMBP e *Ureaplasma* foi detectado no soro de 18,7% dos neonatos³⁵. Nós encontramos uma prevalência de 12,6%. Esta diferença pode ter ocorrido porque pesquisamos esse microorganismo exclusivamente no sangue coletado do recém-nascido, enquanto os outros trabalhos utilizaram sangue de cordão umbilical. É possível que a presença do *Ureaplasma* na corrente sanguínea do neonato seja transitória e que seu sistema imune seja capaz de conter esta infecção sem tratamento. Há estudos demonstrando que uma proporção significativa de pacientes com meningite por *Ureaplasma* elimina o microorganismo sem tratamento antibiótico específico³⁶. A colonização do trato respiratório por *Ureaplasma* também já se mostrou transitória em alguns casos. Castro-Alcaraz et al. estudaram 125 RNMBP durante 12 meses, coletando amostras de secreção endotraqueal e nasofaríngea com 1, 3 e 7 dias de vida e após semanalmente. Quarenta crianças (32%) apresentaram uma ou mais amostras positivas para *U. urealyticum* por cultura ou PCR. Foram identificados 3 padrões de colonização: persistentemente positivo (n=18),

precoce transitório (n=14) e aquisição tardia (n=8). Ao comparar as taxas de doença pulmonar crônica nos 3 grupos com o grupo não colonizado, encontraram uma taxa significativamente mais alta de doença pulmonar crônica com 28 dias de vida (OR 8,7; 95% CI 3,3-23) e com 36 semanas de idade pós-concepcional (OR 38,5, 95% CI: 4-374) apenas para aqueles com colonização persistentemente positiva (45% dos colonizados)³⁷.

O ponto positivo do nosso estudo é o fato de termos pesquisado *Ureaplasma* exclusivamente no sangue coletado do recém-nascido. Nos estudos anteriores a pesquisa foi realizada também utilizando sangue de cordão umbilical^{34, 35} e não existem outros estudos com PCR para *Ureaplasma* exclusivamente no sangue dos neonatos.

Uma limitação do nosso estudo foi termos pesquisado o *Ureaplasma* no sangue dos recém-nascidos em apenas um momento. Se tivéssemos realizado duas coletas com um intervalo de dias, talvez pudéssemos comprovar a hipótese da transitoriedade do microorganismo na corrente sanguínea dos neonatos, independente do uso de antibiótico específico. Apesar da impossibilidade de concluir sobre o padrão da infecção por *Ureaplasma* no recém-nascido pré-termo, o fato de mostrarmos a presença desta bacteremia em recém-nascidos pré-termos torna nosso trabalho significativo. É necessário que este padrão seja definido antes de se pensar sobre a necessidade de tratamento do neonato infectado ou em opções terapêuticas. É provável que a infecção por *Ureaplasma*, mesmo que transitória, não seja inócua. No estudo que demonstrou a transitoriedade deste patógeno no LCR foi mostrada também uma associação com hemorragia intraventricular, hidrocefalia e atraso de desenvolvimento³⁶. Os efeitos da infecção intra-uterina por *Ureaplasma* no neurodesenvolvimento ainda são pouco conhecidos. Berger et al. estudaram uma coorte de 114 prematuros nascidos entre 23 e 33 semanas de idade gestacional de mães que tiveram cultura de líquido amniótico

obtida durante a cesariana. Essas crianças foram subsequentemente avaliadas com 24 +/- 1,1 mês de idade corrigida através da escala de desenvolvimento infantil de Bayley II e exame neurológico padronizado. Um grupo de 67 crianças com cultura de líquido amniótico negativa foi comparado a 47 crianças com cultura positiva, sendo positiva para *U. urealyticum* em 32 casos e para outras bactérias em 15 casos. Pacientes com cultura positiva apresentaram um risco significativamente maior de apresentar um escore PDI (índice de desenvolvimento psicomotor) adverso (OR 3,1; CI 1.3-3.7), um desfecho neurológico anormal (OR 4,8; CI 1,4-16,4) e uma maior probabilidade de diagnóstico de paralisia cerebral (OR 4,8; CI 1,4-16,4) aos dois anos de idade corrigida em comparação aos com cultura negativa³⁸.

Apesar de persistirem muitas dúvidas sobre a patogenicidade do *Ureaplasma* no neonato, sua associação com trabalho de parto prematuro é inegável e foi demonstrado mais uma vez no nosso estudo. Isso demonstra a importância de se pesquisar esse patógeno e possivelmente tratar as gestantes com TPP, já que a prevenção do nascimento prematuro é a maior arma para a diminuição da mortalidade neonatal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Vania Naomi Hirakata pelo auxílio na análise estatística, à Dra. Ursula Matte e à Valeska Lizzi Lagranha pela assistência na análise laboratorial e ao FIPE/HCPA pelo financiamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Viscardi RM. *Ureaplasma* Species: Role in diseases of prematurity. Clin Perinatol. 2010; 37: 393-409.

- 2- Waites KB, Schelonka RL, Xiao L, Grigsby PL, Novy MJ. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009;14:190-9.
- 3- Volgmann T, Ohlinger R, Panzig B. *Ureaplasma urealyticum*-harmless commensal or underestimated enemy of human reproduction? A review. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;273:133-9.
- 4- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:757-89.
- 5- Wang EE, Ohlsson A, Kellner JD. Association of *Ureaplasma urealyticum* colonization with chronic lung disease of prematurity: results of a metaanalysis. *J Pediatr* 1995; 127: 640–644.
- 6- Schelonka RL, Katz B, Waites KB, Benjamin Jr DK. Critical appraisal of the role of *Ureaplasma* in the development of bronchopulmonary dysplasia with metaanalytic techniques. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 1033–1039.
- 7- Honma Y, Yada Y, Takahashi N, Momoi MY, Nakamura Y. Certain type of chronic lung disease of newborns is associated with *Ureaplasma urealyticum* infection in utero. *Pediatr Int.* 2007;49:479-84.
- 8- Ollikainen J, Korppi M, Heiskanen-Kosma T, Heinonen K. Chronic lung disease of the newborn is not associated with *Ureaplasma urealyticum*. *Pediatr Pulmonol.* 2001;32:303-7.
- 9- Cassell GH, Waites KB, Crouse DT. Perinatal mycoplasmal infections. *Clin Perinatol.* 1991;18:241-62.
- 10- Dyke MP, Grauaug A, Kohan R, Ott K, and Andrews R. *Ureaplasma urealyticum* in a neonatal intensive care population. *J. Paediatr. Child Health.* 1993; 29:295-297.

- 11- Izraeli S, Samra Z, Sirota L, Merlob P, Davidson S. Genital mycoplasmas in preterm infants: prevalence and clinical significance. *Eur J Pediatr.* 1991;150:804-7.
- 12- 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.
- 13- Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol.* 1996;87:163-8.
- 14- Thuler LC. Diagnóstico microbiológico das bacteremias. *JBM* 1995; 69:123-8.
- 15- Wagner L. Diagnosis and Management of Preeclampsia. *American Family Physician* 2004; 70: 2317-2324.
- 16- Silveira RC, Procianoy RS, Dill JC, da Costa CS. Periventricular leukomalacia in very low birth weight preterm neonates with high risk for neonatal sepsis. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84:211-216.
- 17- Vieira RCS, Procianoy RS, Mülle LD, Prado CHA. The influence of intrapartum antibiotic therapy on the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *J Pediatr (Rio J).* 1997;73:171-5.
- 18- Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 1991;18:361-81.
- 19- Miura E, Silveira RC, Procianoy RS. Neonatal sepsis: diagnosis and treatment. *J Pediatr (Rio J).* 1999;75: S57-S62.
- 20- Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr.* 1978;92:529-34.

- 21- Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1723-9.
- 22- Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA, Wrage LA, Poole K. National Institutes of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics.* 2005;116:1353-60.
- 23- Viscardi RM, Hasday JD. Role of *Ureaplasma* species in neonatal chronic lung disease: epidemiologic and experimental evidence. *Pediatr Res.* 2009;65:84R-90R.
- 24- Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, Celik O. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Int J Infect Dis.* 2010;14:e90-5.
- 25- Olomu IN, Hecht JL, Onderdonk AO, Allred EN, Leviton A. Perinatal correlates of *Ureaplasma urealyticum* in placenta parenchyma of singleton pregnancies that end before 28 weeks of gestation. *Pediatrics.* 2009;123:1329-36.
- 26- Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, and Witkin SS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J. Infect. Dis.* 2003; 187:518-521.
- 27- Cassell GH, Waites KB, and Crouse DT. Mycoplasmal infections. *In* J. S. Remington and J. O. Klein (ed.), *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 5th ed. W.B. Saunders Co., Inc., Philadelphia, Pa. 2001; 733-767.
- 28- Novy MJ, Duffy L, Axthelm MK, Sadowsky DW, Witkin SS, Gravett MG, Cassell GH, Waites KB. *Ureaplasma parvum* or *Mycoplasma hominis* as sole

- pathogens cause chorioamnionitis, preterm delivery, and fetal pneumonia in rhesus macaques. *Reprod Sci.* 2009;16:56-70.
- 29-Harada K, Tanaka H, Komori S, Tsuji Y, Nagata K, Tsutsui H, Koyama K. Vaginal infection with *Ureaplasma urealyticum* accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. *Microbiol Immunol.* 2008;52:297-304.
- 30-Klein LL and Gibbs RS. Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; 190:1493-1502.
- 31-Koyama M, Ito S, Nakajima A, Shimoya Z, Azuma C, Suehara N, Murata Y and Tojo H. Elevations of group II phospholipase A2 concentrations in serum and amniotic fluid in association with preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 183:1537-1543.
- 32-De Silva NS and Quinn PA. Characterization of phospholipase A1, A2, C activity in *Ureaplasma urealyticum* membranes. *Mol. Cell. Biochem.* 1999; 201:159-167.
- 33-Kundsinn RB, Leviton A, Allred EN, Poulin SA. *Ureaplasma urealyticum* infection of the placenta in pregnancies that ended prematurely. *Obstet. Gynecol.* 1996; 87:122-127.
- 34-Goldenberg RL, Andrews WW, Goepfert AR, et al. The Alabama Preterm Birth Study: Umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 43.e1-43.e5.
- 35-Viscardi RM, Hashmi N, Gross GW, Sum C-CJ, Rodrigues A, Fairchild KD. Incidence of invasive *Ureaplasma* in VLBW infants: relationship to severe intraventricular hemorrhage. *J Perinatol* 2008;28:759-765.

- 36-Clifford V, Tebruegge M, Everest N, Curtis N. Ureaplasma: pathogen or passenger in neonatal meningitis? *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:60-4.
- 37-Castro-Alcaraz S, Greenberg EM, Bateman DA, Regan JA. Patterns of colonization with *Ureaplasma urealyticum* during neonatal intensive care unit hospitalizations of very low birth weight infants and the development of chronic lung disease. *Pediatrics.* 2002;110:e45.
- 38-Berger A, Witt A, Haiden N, Kaider A, Klebermasz K, Fuiko R, Langgartner M, Pollak A. Intrauterine infection with *Ureaplasma* species is associated with adverse neuromotor outcome at 1 and 2 years adjusted age in preterm infants. *J Perinat Med.* 2009;37:72-8.

9- ARTIGO EM INGLÊS

UREAPLASMA BACTEREMIA IN VERY LOW BIRTH WEIGHT INFANTS IN BRAZIL

Abbreviated title: *Ureaplasma* bacteremia and prematurity

Running head: *Ureaplasma* bacteremia

Luciana T Fonseca, MD

Rita C Silveira, PhD, MD

Renato S Procianoy, PhD, MD

Department of Pediatrics, Newborn Section, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

R. S. Procianoy, Rua Tobias da Silva 99 conj 302, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90570-020. Tel.:+55-51-33315726. Fax: +55-51-33312738.

email:renatosp@terra.com.br

Key words: *Ureaplasma*; prematurity; neonatal sepsis; brochopulmonary dysplasia; preterm labor

The authors do not have any conflict of interest to disclose.

This study was supported in part by FIPE-HCPA.

ABSTRACT

Objective: To determine the prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* bacteremia in very low birth weight infants and to evaluate the associated factors.

Patients and methods: Ninety-five very low birth weight newborns with gestational age ≤ 32 weeks were included in the study from March 2009 to July 2010. DNA was extracted from blood samples collected during the first 72 hours of life and *Ureaplasma urealyticum* and/or *Ureaplasma parvum* were identified by Polymerase Chain Reaction. The newborns were followed up until hospital discharge.

Results: The prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and/or *Ureaplasma parvum* bacteremia was 12.6% (12 cases): 5 (5.2%) for *Ureaplasma urealyticum*, 5 (5.2%) for *Ureaplasma parvum* and 2 (2.1%) for both. By univariate analysis the presence of *Ureaplasma* was associated with clinical chorioamnionitis and spontaneous preterm labor. Pre-eclampsia and small for gestational age were associated with lower incidence of *Ureaplasma*. When spontaneous preterm labor was present, the prevalence of *Ureaplasma* bacteremia was 25%. Only spontaneous preterm labor was a statistically significant factor after step by step logistic regression analysis ($p=0.006$) with 9-fold increase in chance of neonatal *Ureaplasma* bacteremia.

Conclusions: *Ureaplasma* bacteremia is common in very low birth weight infants, especially among those born after preterm labor.

INTRODUCTION

Ureaplasma urealyticum and *Ureaplasma parvum* are the most frequently isolated microorganisms from amniotic fluid and placenta of mothers of preterm newborns, and colonize up to 67% female genital tract of sexually active women in the

reproductive age (1,2). *Ureaplasma* colonization in pregnant women is associated with premature rupture of membranes, chorioamnionitis and preterm delivery (1-3). There is evidence that the timing, duration and intensity of the inflammatory response to *Ureaplasma* infection are the main determinants of pregnancy and neonatal outcomes (1).

Ureaplasma colonizes 20 to 45% of very low birth weight (VLBW) infants' respiratory tracts (1), and it has been associated with bronchopulmonary dysplasia (BPD) (4,5). *Ureaplasma* bacteremia can lead to severe pneumonia (6). Bacteremia occurs in 26% of the neonates with positive tracheal cultures for *Ureaplasma urealyticum* (7).

The purpose of this study was to determine the prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in VLBW infants and to evaluate the perinatally associated factors with neonatal *Ureaplasma* bacteremia.

PATIENTS AND METHODS

Study population:

We conducted a prospective cohort study including all newborn infants with birth weights $\leq 1500\text{g}$ and gestational ages ≤ 32 weeks admitted to the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) during the first 72 hours of life from March 2009 to July 2010. We excluded infants with major congenital malformations, chromosomal syndromes, congenital infections of the STORCH group (syphilis, toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus and herpes), and death in the delivery room. The newborns were followed up until discharge or death.

Ethical considerations:

The study protocol was approved by Institution's Ethics Committee and informed consent was signed by parents or guardians. A single blood sample per newborn was obtained for *Ureaplasma* detection in the first 72 hours of life in a small volume additional to that requested by the attending neonatologist.

Variables and definitions:

Gestational age was determined by maternal dates, confirmed by early obstetric ultrasound (in the first 12 weeks of gestation) and neonatal examination. Small for gestational age (SGA) was defined as birth weight below the 10th percentile (8).

Diagnosis of maternal preeclampsia was arterial hypertension (blood pressure ≥ 140 mmHg systolic and/or ≥ 90 mmHg diastolic) developing after 20 weeks gestation with proteinuria >300 mg in a 24-h urine sample (9). We considered clinical chorioamnionitis when there were maternal fever, uterine hypertonia, purulent or foul smelling amniotic fluid, maternal leukocytosis and fetal tachycardia.

Respiratory Distress Syndrome (RDS) was diagnosed when FIO₂ requirement was ≥ 0.40 , and there were characteristic chest X-ray and need for exogenous surfactant replacement. Diagnosis of congenital pneumonia was based on clinical signs of respiratory distress followed by a compatible chest X-ray.

Clinical diagnosis of early-onset sepsis was based on the presence of one or more items of at least three of the following categories: a) maternal risk factor as fever, urinary tract infection, genital tract infection, chorioamnionitis and rupture of membranes for more than 18 hours before delivery; b) temperature instability, hypothermia: axillary temperature below 36.5° C and hyperthermia: above 37.5° C; c) apnea, bradypnea, tachypnea, grunting, subcostal and sternal retractions, nasal wing beats and cyanosis; d) hypotonia and seizures; e) irritability and lethargy; f) abdominal distension, emesis, and feeding intolerance; g) idiopathic jaundice; h) paleness, cold and

sweaty skin, hypotension and capillary refill time longer than 3 seconds; i) signs of bleeding and disseminated intravascular coagulation; j) subjective evaluation: newborn "does not seem well" (10,11). Diagnosis of proven early-onset sepsis was based on the presence of clinical signs and positive blood and/or CSF cultures. Necrotizing enterocolitis (NEC) was diagnosed when preterm infants presented feeding intolerance, abdominal distension and vomiting associated with pneumatosis intestinalis.

Presence of peri-intraventricular hemorrhage (PIVH) was determined by serial cranial ultrasound performed weekly until the sixth week of life or hospital discharge. PIVH was classified according to Papile et al (12). Bronchopulmonary dysplasia was defined by the need of oxygen supplement in the first 28 days of life (13).

Absolute neutrophil counts were performed with a Sysmex 2100 (TOA Medical Electronic, Kobe, Japan). C-reactive protein (CRP) was determined by rate nephelometry, and a CRP value of 10 mg/L or greater was considered elevated (14).

DNA extraction and PCR:

Blood samples were centrifuged and plasma was frozen at -80°C. At the moment of analysis, samples were thawed and identification of *Ureaplasma* was performed with *Ureaplasma parvum / urealyticum* Real-TM Kit (Sacaca Biotechnologies). Identification of the organism was based on two processes: DNA isolation and amplification of samples in real time. *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* DNA were extracted, amplified and detected from the samples, using specific fluorescent probes according to the manufacturer's protocol. Amplifications were performed in duplicate for each sample, with 100% agreement in results.

Statistical analysis:

Sample size calculation was performed with the program WinPEPI and based on the study by Viscardi et al. (15). For a confidence interval of 95%, an estimated

population of 100 VLBW infants during the study period, a prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and / or *Ureaplasma parvum* of 18% and an error of 5%, we figured out a total of 70 newborns.

To compare quantitative variables for the presence or absence of *Ureaplasma* we used either Student's t test, Mann-Whitney test, chi-square test or Fisher exact test.

We performed a step by step logistic regression (stepwise) with the variables that were significant in univariate statistical analysis.

The level of significance adopted was $p < 0.05$ and analyses were performed using SPSS (Statistical Package for Social Science) version 13.0.

RESULTS

During the study period, 106 VLBW infants were admitted to NICU in the first 72h of life. Of these, six were excluded (two due to congenital malformations and 4 due to congenital infection of STORCH group) and 5 were lost (insufficient samples or parents' refusal to participate in the study). Ninety-five VLBW infants were included in the study.

The prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and/or *Ureaplasma parvum* bacteremia was 12.6% (12 cases): 5 (5.2%) *Ureaplasma urealyticum*, 5 (5.2%) *Ureaplasma parvum* and 2 (2.1%) both. Newborns were divided in two groups: positive for *Ureaplasma urealyticum* and/or *Ureaplasma parvum* and negative for both.

The mean postnatal age of blood collection was 27 ± 17 hours, and sample collection timing was similar in both groups: 28 ± 17 hours and 23 ± 17 hours ($p=0.298$) for *Ureaplasma*- negative and positive infants respectively. The number of positive blood samples was 7 of 39 (17%) collected in the first 24 hours, 3 of 42 (7%) between 24 and 48 hours, and 1 of 12 (8%) between 48 and 72 hours ($p=0.173$).

The two groups were similar regarding maternal age, birth weight, gestational age, proportion of cesarean delivery, Apgar score in the fifth minute, length of hospitalization and mortality. There were also no statistically significant differences between groups regarding the incidence of RDS, congenital pneumonia, clinical sepsis, proven sepsis, NEC, PIVH grade III or IV (Table 1).

We stratified the groups according to birth weight: <750 grams, 750- 999 grams, 1000-1249 grams, and 1250-1500 grams; and the number of positive infants were: 3 (17.6%), 2 (7.4%), 2 (10.5%), and 5 (15.6%) ($p=0.481$), respectively.

BPD occurrence was similar in both groups. Of the survivors at 28 days, 15 (26.8%) negative and 2 (25%) positive ($p=1.00$) *Ureaplasma* infants required oxygen therapy; and of the survivors at 36 weeks postmenstrual age, 10 (18.9%) negative and one (12.5%) positive ($p=1.00$) *Ureaplasma* infants required oxygen. None of the patients was tested for tracheal aspirates.

Univariate analysis demonstrated the presence of *Ureaplasma* associated with clinical chorioamnionitis and spontaneous preterm labor ($p = 0.024$ and $p = 0.003$, respectively). Preeclampsia and SGA were associated with lower incidence of *Ureaplasma* bacteremia ($p = 0.025$ and $p = 0.033$ respectively) (Table 1). When analyzing only the presence of spontaneous preterm labor, the prevalence of *Ureaplasma* bacteremia was 25% (10 positive out of 40 cases). There were no differences between *Ureaplasma*-positive and negative infants delivered after spontaneous preterm labor (Table 2).

Step by step logistic regression (stepwise) showed that among the significant variables in univariate analysis, the only one that remained significant was spontaneous preterm labor (OR= 9.138 CI 95% 1.874 to 44.553, $p = 0.006$).

DISCUSSION

In our study we determined that the prevalence of *Ureaplasma* bacteremia in VLBW infants was 12.6%. There was also a significant association with spontaneous preterm labor with a 9-fold increase in the chance of neonatal *Ureaplasma* bacteremia.

The role of *Ureaplasma* as a cause of chorioamnionitis, abortion and premature labor has been well documented by several authors (16-18). It has been demonstrated that *Ureaplasma* triggers preterm labor, even in cases of subclinical infection (19-23). Our findings showed that the rate of *Ureaplasma* bacteremia is higher among preterm infants born after spontaneous preterm labor. Kundsın et al found that the placentas with lower rates of *Ureaplasma* recovery were from births due to preeclampsia or intrauterine growth restriction (24). We also found an inverse association between preeclampsia and SGA with neonatal *Ureaplasma* bacteremia. Most cases of births without spontaneous labor are of preeclamptic mothers, and newborns with restricted intrauterine growth.

Many studies have associated newborn respiratory tract colonization with *Ureaplasma* and BPD, and two meta-analyses reinforced this association (4, 5). We did not find association between the presence of *Ureaplasma* in neonatal blood and incidence and severity of BPD. The only two other studies that showed the presence of *Ureaplasma* in preterm blood did not find any statistically significant association with BPD either (25, 26).

The prevalence of neonatal *Ureaplasma* bacteremia described by us was lower than that reported previously. Goldenberg et al performed cultures of umbilical cord blood of newborns with gestational ages between 23 and 32 weeks, and found a prevalence of *Ureaplasma urealyticum* of 17% (25). Viscardi et al performed PCR of DNA extracted from umbilical cord or venous blood (when the cord blood was

unavailable) and CSF of VLBW infant; *Ureaplasma* sp was detected in the serum of 18.7% (26). Our prevalence was 12.6% studying just neonatal blood in contrast with previous studies that detected *Ureaplasma* in umbilical cord blood. We may speculate that neonatal *Ureaplasma* bacteremia is transient, and the neonatal immune system is able to contain it without treatment. Previous study showed that a significant proportion of patients with *Ureaplasma* meningitis eliminated the microorganism without specific antibiotic treatment (27). Respiratory tract colonization by *Ureaplasma* is also transient. Castro-Alcaraz et al studied 125 VLBW infants during 12 months collecting nasopharyngeal and tracheal secretion samples at 1, 3 and 7 days of life, and, after that, weekly. Forty children (32%) had one or more positive samples for *Ureaplasma urealyticum* by culture or PCR, and they identified that several patients had an early transient pattern of colonization (28).

Limitation of our study was that we collected PCR for *Ureaplasma* only once. If we had held several collections with intervals of days we could have shown the transience of *Ureaplasma* in the neonatal bloodstream independently of specific treatment. Although it is impossible to conclude on the pattern of *Ureaplasma* bacteremia, the presence of bacteremia in preterm newborn makes our findings significant. We detected *Ureaplasma* exclusively on peripheral neonatal blood differently from previous studies that used umbilical cord blood (25,26). It is necessary to determine the *Ureaplasma* bacteremia pattern before we consider the need for treatment, although we know that *Ureaplasma* bacteremia is not innocuous. It was recently suggested that there is an association between the presence of *Ureaplasma* in CSF and intraventricular hemorrhage, hydrocephalus and developmental delay (27). The effects of intrauterine *Ureaplasma* infection on infants' neurodevelopment are still poorly understood. Berger et al studied a cohort of 114 infants born between 23 and 33

weeks of gestation whose mothers had amniotic fluid culture obtained during cesarean section, and those children were evaluated at 24 months of corrected age. Those with positive cultures showed a significantly higher risk for low Psychomotor Development Index score, abnormal neurological outcome, and increased incidence of cerebral palsy (29).

The association of neonatal *Ureaplasma* bacteremia and preterm labor suggests that future studies should be conducted in order to determine if specific antibiotic therapy will be indicated after spontaneous preterm labor.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Vania Naomi Hirakata for assistance in statistical analysis; Isaura Riedel for English revision; Dr. Ursula Matte and Valeska Lizzi Lagranha for assistance with laboratory analysis; and FIPE/HCPA for the financial support.

REFERENCES

- 1- Viscardi RM. *Ureaplasma* Species: Role in diseases of prematurity. Clin Perinatol. 2010; 37: 393-409.
- 2- Waites KB, Schelonka RL, Xiao L, Grigsby PL, Novy MJ. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. Semin Fetal Neonatal Med. 2009; 14: 190-9.
- 3- Volgmann T, Ohlinger R, Panzig B. *Ureaplasma urealyticum*-harmless commensal or underestimated enemy of human reproduction? A review. Arch Gynecol Obstet. 2005; 273: 133-9.

- 4- Wang EE, Ohlsson A, Kellner JD. Association of *Ureaplasma urealyticum* colonization with chronic lung disease of prematurity: results of a metaanalysis. *J Pediatr* 1995; 127: 640–644.
- 5- Schelonka RL, Katz B, Waites KB, Benjamin Jr DK. Critical appraisal of the role of *Ureaplasma* in the development of bronchopulmonary dysplasia with metaanalytic techniques. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 1033–1039.
- 6- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and *Ureaplasmas* as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:757-89.
- 7- Cassell GH, Waites KB, Crouse DT. Perinatal mycoplasmal infections. *Clin Perinatol.* 1991; 18: 241-62.
- 8- Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol.* 1996; 87: 163-8.
- 9- Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: S1-S22.
- 10- Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 1999; 88: 647-50.
- 11- Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 1991; 18: 361-81.
- 12- Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr.* 1978; 92: 529-34.
- 13- Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 1723-9.

- 14- Ehl S, Gering B, Bartmann P, Högel J, Pohlandt F. C-reactive protein is a useful marker for guiding duration of antibiotic therapy in suspected neonatal bacterial infection. *Pediatrics*. 1997; 99:216-21.
- 15- Viscardi RM, Hasday JD. Role of *Ureaplasma* species in neonatal chronic lung disease: epidemiologic and experimental evidence. *Pediatr Res*. 2009; 65: 84R-90R.
- 16- Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, Celik O. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Int J Infect Dis*. 2010; 14:e90-5.
- 17- Olomu IN, Hecht JL, Onderdonk AO, Allred EN, Leviton A. Perinatal correlates of *Ureaplasma urealyticum* in placenta parenchyma of singleton pregnancies that end before 28 weeks of gestation. *Pediatrics*. 2009; 123: 1329-36.
- 18- Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Witkin SS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J. Infect. Dis*. 2003; 187:518-521.
- 19- Novy MJ, Duffy L, Axthelm MK, et al. *Ureaplasma parvum* or *Mycoplasma hominis* as sole pathogens cause chorioamnionitis, preterm delivery, and fetal pneumonia in rhesus macaques. *Reprod Sci*. 2009; 16: 56-70.
- 20- Harada K, Tanaka H, Komori S, et al. Vaginal infection with *Ureaplasma urealyticum* accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. *Microbiol Immunol*. 2008; 52: 297-304.
- 21- Klein L L, Gibbs RS. Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2004; 190:1493-1502.

- 22- Koyama M, Ito S, Nakajima A, et al. Elevations of group II phospholipase A2 concentrations in serum and amniotic fluid in association with preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 183:1537-1543.
- 23- De Silva N S, Quinn PA. Characterization of phospholipase A1, A2, C activity in *Ureaplasma urealyticum* membranes. *Mol. Cell. Biochem.* 1999; 201:159-167.
- 24- Kundsinn R B, Leviton A, Allred EN, Poulin SA. *Ureaplasma urealyticum* infection of the placenta in pregnancies that ended prematurely. *Obstet. Gynecol.* 1996; 87:122-127.
- 25- Goldenberg RL, Andrews WW, Goepfert AR, et al. The Alabama Preterm Birth Study: Umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 43.e1-5.
- 26- Viscardi RM, Hashmi N, Gross GW, Sum C-CJ, Rodrigues A, Fairchild KD. Incidence of invasive *Ureaplasma* in VLBW infants: relationship to severe intraventricular hemorrhage. *J Perinatol* 2008; 28: 759-765.
- 27- Clifford V, Tebruegge M, Everest N, Curtis N. *Ureaplasma*: pathogen or passenger in neonatal meningitis? *Pediatr Infect Dis J.* 2010; 29: 60-4.
- 28- Castro-Alcaraz S, Greenberg EM, Bateman DA, Regan JA. Patterns of colonization with *Ureaplasma urealyticum* during neonatal intensive care unit hospitalizations of very low birth weight infants and the development of chronic lung disease. *Pediatrics.* 2002; 110: e45.
- 29- Berger A, Witt A, Haiden N, et al. Intrauterine infection with *Ureaplasma* species is associated with adverse neuromotor outcome at 1 and 2 years adjusted age in preterm infants. *J Perinat Med.* 2009; 37: 72-8.

Table 1. Comparison between newborns with and without *Ureaplasma* bacteremia

	Patients negative for <i>Ureaplasma</i> N=83	Patients positive for <i>Ureaplasma</i> N=12	P
Maternal age*	26.16 ± 6.61	25.25 ± 6.12	0.655
Birth Weight*	1051.46 ± 297.74	1090.42 ± 337.66	0.678
Gestational Age*	29.57 ± 2.59	28.17 ± 2.65	0.085
Caesarean delivery**	63 (75.9%)	8 (66.7%)	0.491
Spontaneous preterm labor***	30 (36.1%)	10 (83.3%)	0.003
Preeclampsia***	36 (43.9%)	1 (8.3%)	0.025
Clinical chorioamnionitis**	15 (18.13%)	6 (50%)	0.024
Rupture of membrane duration (hours)****	0(0-12.5)	0 (0-247)	0.128
Small for gestational age***	42 (50.6%)	2 (16.7%)	0.033
Apgar at 5 minutes****	8(7-9)	9(6-9)	0.762
Respiratory Distress Syndrome**	53 (63.9%)	7 (58.3%)	1.000
Congenital pneumonia***	8 (9.6%)	0 (0%)	0.590
Clinical early-onset sepsis***	64 (77.1%)	10 (83.3%)	0.447
Proven early-onset sepsis***	2 (2.4%)	0 (0%)	1.000
Necrotizing Enterocolitis***	13 (15.7%)	3 (25.0%)	0.391
Peri-intraventricular hemorrhage grade III or IV***	13 (15.7%)	2 (16.7%)	1.000
Peripheral blood cell count****	7130 (4990-9490)	6590 (4740- 7750)	0.560
Absolute neutrophil count ****	3020 (1555-5030)	2881 (1620-3750)	0.805
C-reactive protein > 10 mg/L ***	5 (6.0%)	1 (8.0%)	0.522
Length of stay (days)****	51 (34-81)	39 (34-87)	0.701
Mortality***	33 (39.8%)	4 (33.3%)	0.760

Data presented as mean ± standard deviation, median (p25-p75) or number of positive cases (%).

*T test, **Chi-square test, ***Fisher exact test, ****Mann-Whitney test

Table 2. Comparison between *Ureaplasma*-positive and negative infants delivered after spontaneous preterm labor

	Patients negative for <i>Ureaplasma</i> N=30	Patients positive for <i>Ureaplasma</i> N=10	P
Maternal age*	24.97 ± 5.72	24.40 ± 6.29	0.793
Birth Weight*	1031.17 ± 294.05	1133.5 ± 348.76	0.368
Gestational Age*	28.5 ± 2.80	28.4 ± 2.71	0.922
Caesarean delivery**	12 (40%)	6 (60%)	0.300
Clinical chorioamnionitis**	11 (36.6%)	6 (60%)	0.282
Rupture of membrane duration (hours)***	1(0-12.75)	4 (0-210)	0.334
Small for gestational age**	8 (26.7%)	2 (20%)	1.000
Apgar at 5 minutes***	7(5-9)	7(6-8)	0.800
Respiratory Distress Syndrome**	20 (66.7%)	7 (70%)	0.696
Congenital pneumonia**	4 (13.3%)	0 (0%)	0.556
Clinical early-onset sepsis**	26 (86.7%)	8 (80%)	1.000
Proven early-onset sepsis**	1 (3.3%)	0 (0%)	1.000
Necrotizing Enterocolitis**	7 (23.3%)	2 (20.0%)	1.000
Peri-intraventricular hemorrhage grade III or IV**	6 (20.0%)	2 (20%)	1.000
Peripheral blood cell count ***	7130 (4990-9490)	6590 (4740- 7750)	0.560
Absolute neutrophil count ***	3020 (1555-5030)	2881 (1620-3750)	0.805
C-reactive protein > 10 mg/L **	5 (6.0%)	1 (10.0%)	0.522
Mortality**	15 (30.0%)	3 (30.0%)	0.464

Data presented as mean ± standard deviation, median (p25-p75) or number of positive cases (%).

*T test, **Fisher exact test, ***Mann-Whitney test

10- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo demonstramos mais uma vez o papel do *Ureaplasma* como causador de trabalho de parto e nascimento prematuros. Demonstramos uma prevalência deste microorganismo no sangue de RNMBP de 12,6% e uma prevalência de 25% quando considerados apenas aqueles nascidos devido a TPP. Pouco se sabe sobre os efeitos desse patógeno na corrente sanguínea dos neonatos e não conseguimos demonstrar associação da sua presença com sinais clínicos de sepse precoce. Isso não significa que esse microorganismo seja inofensivo e seus efeitos em longo prazo ainda são pouco entendidos.

Essas dúvidas sugerem a condução de novos estudos que tentem principalmente elucidar se o tratamento antibiótico específico de gestantes é capaz de prevenir nascimentos prematuros espontâneos.

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

Título do Estudo: Prevalência da infecção por *Ureaplasma urealyticum* e *parvum* em recém-nascidos de muito baixo peso de nascimento.

O recém-nascido prematuro é uma criança frágil que merece cuidados especiais durante todo o seu período de acompanhamento na UTI neonatal. Toda criança prematura de muito baixo peso precisa coletar exames de sangue. Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que busca descobrir a frequência com que o microorganismo *Ureaplasma* pode ser encontrado no sangue de bebês prematuros.

Para isso, é necessário obter uma amostra de sangue do bebê para exame de laboratório. Não haverá coleta de sangue exclusivamente para pesquisa. Será solicitada apenas a coleta de um pequeno volume extra de sangue quando alguma coleta necessária ao tratamento do bebê for realizada. Nenhuma intervenção ocorrerá com a finalidade de pesquisa. A quantidade de sangue que será coletada é pequena (0,5mL), não causando problemas nem riscos para o bebê.

O conhecimento da prevalência deste microorganismo poderá auxiliar no tratamento desta infecção no futuro; por isso, solicito seu consentimento para participação de seu filho na pesquisa.

Caso não concorde em participar do estudo, não haverá prejuízo na assistência do bebê.

Eu, _____, responsável pelo recém-nascido _____, fui informado (a) dos objetivos do estudo e sua justificativa, de forma detalhada e precisa. Recebi informações específicas sobre o procedimento no qual meu filho está envolvido, e os desconfortos ou possíveis riscos, tanto quanto os benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento e terei plena liberdade de retirar meu filho da pesquisa se acreditar necessário.

Declaro, portanto, que autorizo a inclusão de meu filho na pesquisa realizada pela Dra. Luciana Teixeira Fonseca (fone 21018204), pela Dra. Rita de Cássia Silveira e pelo Dr. Renato Procionoy. Caso desejar, o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA também poderá dar mais informações a cerca de sua participação neste projeto de pesquisa (fone 21018304).

Assinatura do Responsável _____

Data: ____/____/____.

ANEXO 2- PROTOCOLO

Prevalência da Infecção por *Ureaplasma urealyticum* e *parvum* em Recém-Nascidos Prematuros de Muito Baixo Peso

Identificação:

Nome: _____ Nº: _____
 Data de Nascimento: ____/____/____ Prontuário: _____
 Sexo: (1) Feminino (2) Masculino Cor: (1) Branca (2) Preta (3) Parda

Dados Maternos:

Idade: _____ Nº gestações: _____
 Prematuros anteriores: (1) sim (2) não Pré-natal: (1) sim (2) não
 DM / DMG: (1) sim (2) não Pré-eclâmpsia / eclâmpsia: (1) sim (2) não
 Infecção ovular: (1) sim (2) não IGO: _____

Dados do Parto:

BR > 18h: (1) sim (2) não
 LA: (1) claro (2) meconial (3) fétido / purulento (4) ignorado
 Parto: (1) vaginal (2) cesáreo (motivo: _____)
 TPP: (1) sim (2) não

Dados do RN:

Peso de Nascimento: _____ Ballard: _____
 Classificação: (1) PIG (2) AIG (3) GIG IG final: _____
 Apgar: ____ / ____ SNAPPE 2: _____

Dados da Internação:

DMH: (1) sim (2) não
 Surfactante: (1) profilático (2) terapêutico (3) profilático e terapêutico (4) não usou
 Pneumonia congênita: (1) sim (2) não
 HPPRN: (1) sim (2) não
 Sepsis precoce (diagnóstico clínico): (1) sim (2) não
 Sepsis precoce comprovada: (1) sim (Hmc: _____) (2) não
 Hmg infeccioso: (1) sim (relação I/T: ____) (2) não
 Proteína C Reativa: _____
 Meningite neonatal: (1) sim (2) não (3) ignorado
 ECN: (1) sim (2) não
 HPIV (0 a 4): _____ (5) não fez eco
 LPV: (1) sim (2) não (3) não fez eco
 ROP (0 a 5): _____ (6) não examinado
 Tempo de VM: _____ dias
 DBP: (1) sim (2) não (3) não se aplica
 AP placenta: (1) com corioamnionite (2) sem corioamnionite (3) não realizado

PCR para *Ureaplasma urealyticum*: (1) positivo (2) negativo