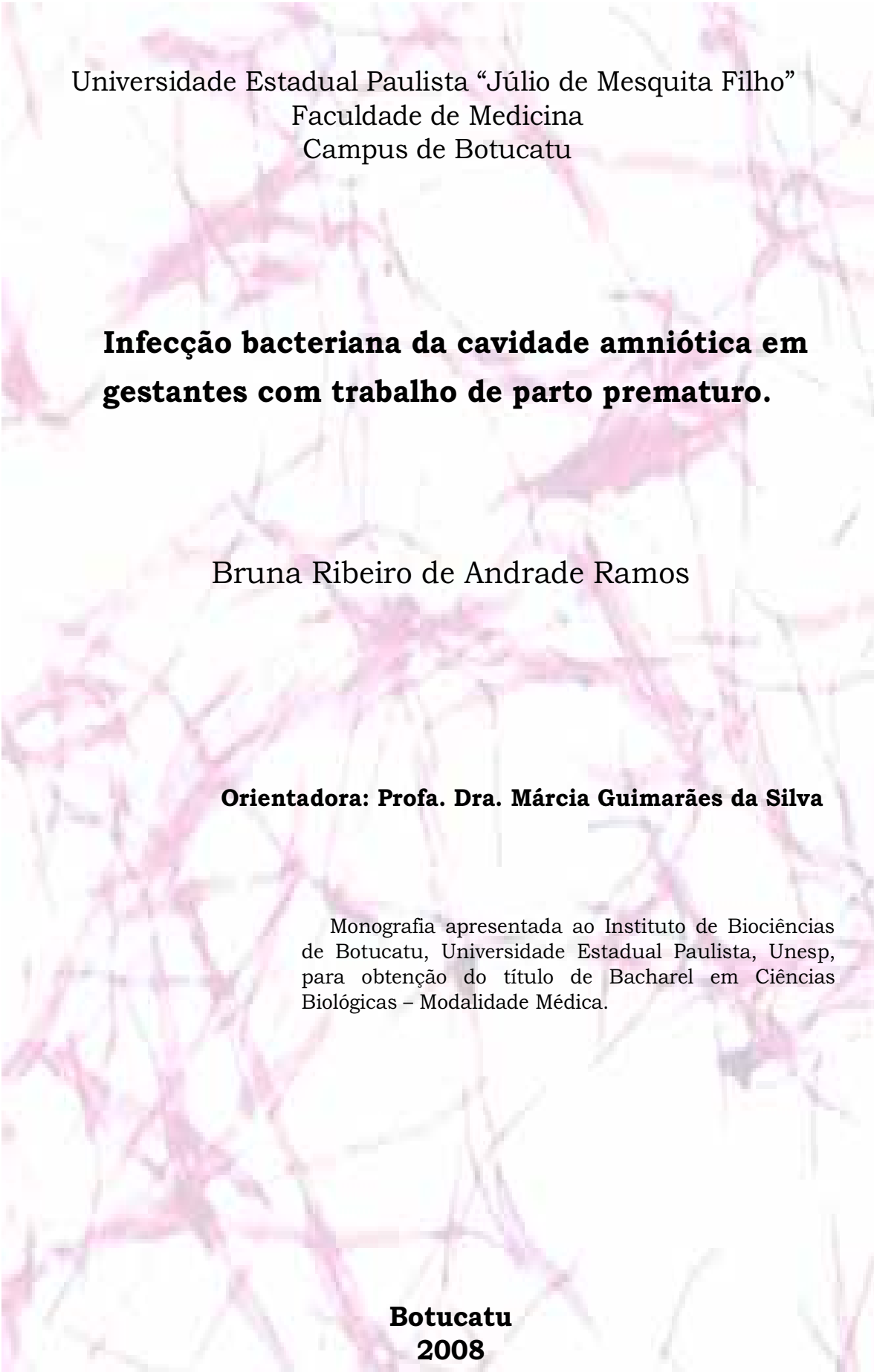




Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina
Campus de Botucatu

**Infecção bacteriana da cavidade amniótica em
gestantes com trabalho de parto prematuro.**

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências
de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Unesp,
para obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas – Modalidade Médica.

**Botucatu
2008**

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

Infecção bacteriana da cavidade amniótica em gestantes com trabalho de parto prematuro.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Unesp, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

**Botucatu
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ramos, Bruna Ribeiro de Andrade.

Infecção bacteriana da cavidade amniótica em gestantes com trabalho de parto prematuro / Bruna Ribeiro de Andrade Ramos. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Márcia Guimarães da Silva

1. Líquido amniótico
2. Parto prematuro
3. Infecção bacteriana

Palavras-chave: Cavidade amniótica; Infecção bacteriana; Sequenciamento

Sumário

1. Resumo.....	02
2. Introdução.....	03
3. Objetivo.....	06
4. Pacientes e Métodos.....	06
4.1. Pacientes.....	06
4.2. Coleta de líquido amniótico.....	07
4.3. Pesquisa de invasão microbiana na cavidade amniótica.....	07
4.3.1. Detecção de <i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Mycoplasma hominis</i> no LA.....	07
4.3.2. Pesquisa de infecção do LA por outras espécies bacterianas através da detecção do gene RNAr 16S.....	09
4.3.3. Clonagem gênica.....	11
4.3.4. Seqüenciamento do gene bacteriano RNAr 16S.....	12
4.4. Análise estatística.....	13
5. Resultados.....	14
5.1. Incidência de TPP e características das gestantes.....	14
5.2. Detecção de invasão microbiana na cavidade amniótica.....	15
5.2.1. Detecção de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma urealyticum</i> no LA.....	15
5.2.2. Detecção de infecção do LA por outras espécies bacterianas.....	16
5.2.3. Identificação das espécies bacterianas no LA pelo seqüenciamento do gene RNAr 16S.....	16
6. Discussão.....	17
7. Referências Bibliográficas.....	20

1. Resumo

Introdução: O trabalho de parto prematuro (TPP) é uma intercorrência obstétrica com etiologia multifatorial, que tem como principal complicação a prematuridade. A infecção da cavidade amniótica (CA) é um fator associado ao TPP e, nos últimos anos, trabalhos têm demonstrado a presença de diferentes espécies bacterianas no líquido amniótico (LA) de pacientes em TPP. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi identificar as espécies bacterianas presentes no líquido amniótico de gestantes em trabalho de parto prematuro. **Pacientes e Métodos:** Foram incluídas, no grupo de estudo, 20 gestantes em TPP e como grupo controle, 20 gestantes, fora de trabalho de parto prematuro, com indicação para amniocentese transabdominal para avaliação da maturidade fetal. As pacientes foram atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de junho de 2005 a outubro de 2007. Para avaliação da presença de infecção na CA, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de líquido amniótico para detecção de *Mycoplasma hominis*, de *Ureaplasma urealyticum* e da sequência conservada inter-espécie do gene RNAr 16S. Os produtos da reação de PCR para o gene RNAr 16S foram clonados para realização do sequenciamento com a finalidade de identificar as espécies bacterianas da CA das gestantes incluídas no estudo. **Resultados:** A incidência de TPP no período do estudo foi de 5,8%. No grupo TPP, a pesquisa de invasão microbiana da CA foi positiva para *M. hominis* (35,0%), *U. urealyticum* (15,0%) e gene RNAr 16S (30,0%), sendo todas as frequências superiores às encontradas no grupo controle ($p < 0,05$). A pesquisa de microrganismos no LA através da pesquisa do gene bacteriano RNAr 16S revelou positividade de seis amostras de LA pertencente à gestante do grupo TPP, além daquelas positivas para *M. hominis* e/ou *U. urealyticum*. Através do sequenciamento do produto do gene RNAr 16S amplificado pela PCR, pode-se identificar microrganismos como *Bacterioides* sp., *Leptotrichia* sp., *Prevotella* sp., *M. hominis* e *U. urealyticum* em quatro amostras pertencentes ao grupo TPP. **Conclusão:** A frequência de infecção na cavidade amniótica de gestantes em TPP é maior que em gestantes fora de trabalho de parto prematuro e que a infecção polimicrobiana é frequentemente encontrada naquelas gestantes.

2. Introdução

O Trabalho de Parto Prematuro (TPP) é uma importante intercorrência obstétrica que acomete de 5 a 10% das gestações¹⁻³ e, apesar dos novos tratamentos e estratégias de prevenção, sua incidência não tem diminuído nos últimos anos⁴. O TPP é caracterizado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos, com ritmo e frequência regulares, acompanhadas de esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm, no período em que a idade gestacional encontra-se entre 22 e 37 semanas⁵. A principal complicação relacionada aos episódios de TPP é a prematuridade, que é responsável por 70% dos índices de morbidade e mortalidade perinatal⁶.

A etiologia do TPP é multifatorial, já que muitos fatores de risco podem estar envolvidos e atuando conjuntamente até a instalação deste processo. Muitos fatores associados à ocorrência de TPP são conhecidos, como a ocorrência de TPP em gestações prévias, múltiplas gestações, polidramnia, sangramento vaginal durante a gestação, rotura prematura de membranas (RPM), vaginose bacteriana (VB), entre outros^{5,7-9}. A diversidade de fatores potencialmente envolvidos na etiologia do TPP é, sem dúvida, uma dificuldade para o desenvolvimento de medidas efetivas para sua prevenção¹⁰.

Atualmente, inúmeros estudos têm buscado elucidar as causas e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do TPP. No entanto, apesar das várias contribuições realizadas, a patogênese do TPP ainda não é completamente conhecida^{1, 11,12}.

Entre os fatores que são conhecidamente relacionados ao desenvolvimento do TPP, a infecção da cavidade amniótica (CA) merece destaque por estar freqüentemente associada a episódios de TPP^{1,13,14}. Define-se como infecção da CA a presença de microrganismos no líquido amniótico (LA), na presença ou ausência de sinais clínicos de infecção¹⁵.

Trabalhos da literatura relatam diferentes taxas de cultura positiva do líquido amniótico, variando de 10 a 40% dos casos de TPP^{14,16-18}. Somado a isso, já foi demonstrado que pacientes com infecção da CA, no segundo trimestre de gestação, têm risco aumentado para o desenvolvimento dessa complicação¹⁹. Segundo Goldenberg et al.¹⁴, a infecção da cavidade amniótica está relacionada a 80% dos casos de TPP com idade gestacional inferior a 30 semanas, comparado com apenas 30% das gestantes, em trabalho de parto,

com idade superior a 37 semanas. Outros estudos, porém, têm relatado a presença de vírus²⁰ e inúmeras espécies de bactérias²¹ no líquido amniótico de pacientes assintomáticas.

Os microrganismos podem ter acesso às membranas corioamnióticas e ao LA por algumas vias: ascendente transcervical, hematogênica através da placenta, iatrogênica no momento da amniocentese e outros procedimentos invasivos ou oriundo da cavidade peritoneal por meio das tubas uterinas¹.

O conceito que a invasão microbiana da cavidade amniótica segue a via ascendente é apoiado pela observação de que, em geral, os microrganismos isolados do líquido amniótico de gestantes com RPM, são similares aos encontrados no trato genital inferior (TGI)²². Sustentando esse conceito, Galask et al.²³ descreveram que os microrganismos presentes no TGI apresentam capacidade de atingir as membranas e infectar a cavidade amniótica. A importância da infecção, por via ascendente, também pode ser demonstrada pelos resultados que revelam presença de bactéria nas membranas corioamnióticas, associadas à resposta inflamatória, em 80% de gestantes em TPP que tiveram a resolução da gestação por cesárea²⁴.

Gyr et al.²⁵ demonstraram que as espécies bacterianas que colonizam o TGI apresentam diferença quanto à capacidade de invasão das membranas corioamnióticas. Somado a isso, já é conhecido que algumas espécies bacterianas encontradas colonizando o TGI, principalmente aquelas associadas à VB, liberam sialidases e prolidases. As sialidases são enzimas que clivam o ácido siálico de glicoproteínas, dentre elas a IgA, mucinas e receptores celulares e, dessa forma, está associada à evasão da imunidade inata e adquirida, pela degradação da IgA cervical e alteração de receptores da membrana celular, respectivamente²⁶. As prolidases são enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular, facilitam a infiltração celular e, portanto, contribuem para a quebra da barreira de proteção das mucosas²⁷. Segundo Cauci et al.²⁸, mulheres, no segundo trimestre de gestação, com maiores atividades de sialidase e prolidase, acompanhadas de aumento de pH vaginal, apresentam maior risco de apresentar parto prematuro. Ainda segundo esses autores, as inter-relações sinérgicas entre os fatores de virulência produzidos por bactérias, presentes na microbiota vaginal alterada, estiveram associados ao risco elevado de resultados gestacionais adversos.

Inúmeras espécies bacterianas são encontradas colonizando o TGI como: *Lactobacillus* sp, *Gardnerella vaginalis*, *Bacterioides* sp., *Mycoplasma*

hominis, *Ureaplasma urealyticum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, entre outros^{29,30}. Dentre os microrganismos citados, as espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*, merecem destaque por serem freqüentemente encontrados no líquido amniótico e associados aos casos de TPP^{19,31-33}.

Estudos recentes têm detectado a presença de micoplasmas em líquido amniótico pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que além de ser mais rápida, apresenta aumento da sensibilidade quando comparada com as técnicas de culturas convencionais^{34,35}. Diferentes espécies de micoplasmas podem ser isoladas do TGI, porém apenas as espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* são consideradas importantes patógenos humanos³⁶. Esses microrganismos estão associados ao desenvolvimento de inúmeras complicações como cervicite, doença inflamatória pélvica, RPM, corioamnionite, parto prematuro, além de infecções em recém-nascidos³⁷.

Acredita-se que as taxas de infecção do LA relatadas por estudos que utilizam métodos de culturas convencionais possam ser subestimadas, visto a inexistência de métodos capazes de suprir todas as exigências dos inúmeros microrganismos potencialmente presentes no LA³⁸. No entanto, a introdução de novas metodologias moleculares que possibilitam a pesquisa de seqüências conservadas inter-espécies, como o gene RNA ribossômico 16S, têm se mostrado muito eficiente para a determinação das freqüências reais de positividade de infecção do LA³⁹⁻⁴¹.

Apesar dos avanços obtidos na Neonatologia, a morbidade e mortalidade resultantes das altas taxas de nascimentos prematuros têm permanecido constantes nas últimas décadas⁴. São muitas as complicações perinatais resultantes da prematuridade, os recém-nascidos prematuros têm maiores riscos para morbidades neurológicas, complicações respiratórias e gastrointestinais⁴². Além disso, há um conseqüente aumento do período de hospitalização e internação em Unidade de Terapia Intensiva, bem como o aumento de utilização de medicamentos de alto custo que, em conjunto, resultam na elevação dos gastos do serviço de saúde nessas situações.

Assim, o conhecimento das espécies bacterianas envolvidas na infecção na cavidade amniótica em gestantes em TPP é importante para compreensão dos mecanismos envolvidos nessa patologia obstétrica.

3. Objetivo

O objetivo desse estudo foi identificar as espécies bacterianas presentes no líquido amniótico de gestantes em trabalho de parto prematuro.

4. Pacientes e Métodos

4.1. Pacientes

Foram incluídas no estudo 20 pacientes em TPP, com idade gestacional entre 26 e 36 semanas, atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou por exame ultrassonográfico precoce (até 20 semanas).

O diagnóstico de TPP foi confirmado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos com ritmo e frequência regulares e esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm⁵.

As pacientes com diagnóstico de TPP foram internadas na Enfermaria de Obstetrícia, sendo controladas clinicamente por meio de avaliação da frequência cardíaca e temperatura a cada 6 horas. Foram excluídas deste estudo, pacientes com gestação múltipla, rotura prematura de membranas, placenta prévia, incompetência istmo-cervical, fertilização *in vitro*, presença de corioamnionite histológica ou presença de sangue no líquido amniótico.

Cinco pacientes em TPP, que tiveram indicação de avaliação de maturidade pulmonar fetal, foram puncionadas através da amniocentese transabdominal guiada por ultra-sonografia, seguindo o protocolo estabelecido pelo Serviço de Obstetrícia. Nas 15 pacientes em TPP, que não havia indicação para amniocentese, o LA foi coletado no momento da resolução da gestação por cesárea ou punção transvaginal. As pacientes em que as amostras de LA foram coletadas durante o parto, somente foram incluídas no estudo, se a resolução da gestação ocorreu em intervalo de tempo de, no máximo, sete dias do início do trabalho de parto. Todas as pacientes em trabalho de parto prematuro, incluídas nesse estudo, apresentaram parto prematuro, como desfecho gestacional.

Como grupo controle, foram incluídas no estudo 20 gestantes com idade gestacional inferior a 37 semanas, pareadas em relação à idade gestacional das pacientes com TPP, que tiveram indicação de amniocentese transabdominal para avaliação da maturidade pulmonar fetal, por apresentarem diabetes e/ou hipertensão arterial.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, tendo sido o projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob o protocolo 448/2005.

4.2. Coleta de líquido amniótico

As amostras de líquido amniótico, obtidas no momento da resolução da gestação ou por amniocentese guiada por ultra-sonografia, foram imediatamente transportadas ao Laboratório de Patologia Placentária do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. As amostras coletadas foram fracionadas em alíquotas de 1,0mL e centrifugadas a 15.000g à temperatura ambiente. Os sobrenadantes e os *pellets* obtidos foram armazenados separadamente a -80°C até o momento do processamento.

4.3. Pesquisa de invasão microbiana na cavidade amniótica

A pesquisa de invasão microbiana da cavidade amniótica foi realizada pela técnica da PCR para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e pela pesquisa do gene bacteriano RNAr 16S para as demais espécies.

4.3.1. Detecção de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* no líquido amniótico

4.3.1.1. Extração do ácido nucléico

O *pellet* do LA obtido por centrifugação foi ressuspendido em 1mL de Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline Solution*) e centrifugado por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado, e adicionado 20μL de água Milli-

Q. Em seguida, a solução foi levada à ebulição por 10 minutos sendo, imediatamente resfriada em gelo³⁵.

4.3.1.2. Controles positivos das PCR

Como controles positivos, foram utilizadas as linhagens padrão adquiridas de *U. urealyticum* (ATCC 27813) e *M. hominis* (ATCC 15488). Essas cepas foram cultivadas utilizando, respectivamente, os meios de cultura B-10 e Hayflick modificado⁴³. Após o período de incubação, de aproximadamente seis dias, alíquotas de 1mL das culturas foram centrifugadas a 15.000g por 60 minutos à 4°C. Após o procedimento de descarte dos sobrenadantes, os *pellets* foram ressuspensos em PBS e submetidos à incubação por 10 minutos a 95°C, com posterior resfriamento para liberação do ácido nucléico.

4.3.1.3. Amplificação da sequência de 429bp do gene da urease de *Ureaplasma urealyticum*

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL em volumes totais de 25µL, contendo 1µL de cada *primer* (25µM) (Tabela 1), 12,5µL de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) e 5µL de amostra. Controles positivos (*U. urealyticum* ATCC 27813) e negativos (água Milli-Q) foram utilizados em todas as reações. A incubação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Personal*), com um ciclo inicial de desnaturação a 98°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 98°C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

4.3.1.4. Amplificação da sequência de 334bp do gene RNA ribossômico 16S de *Mycoplasma hominis*

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL em volumes totais de 25µL, contendo 1µL de cada *primer* (25µM) (Tabela 1), 12,5µL de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) e 5µL da amostra. Controles positivos (*M. hominis* ATCC 15488) e negativos (água Milli-Q) foram utilizados em todas as reações. A incubação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Personal*), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

4.3.1.5. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações do gene da urease de *U. urealyticum* e RNAr 16S de *M. hominis* foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% preparado em tampão 1X TBE (0,09M Tris-Borato; 0,002 EDTA) e corado com Brometo de Etídeo (0,1µg/mL), em 100 V por 30 minutos. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100bp, e posteriormente, fotografado sob transiluminação ultravioleta.

4.3.2. Pesquisa de infecção do LA por outras espécies bacterianas através da detecção do gene RNAr 16S

4.3.2.1. Extração do ácido nucléico com solução de CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*)

Os *pellets* de LA obtidos por centrifugação foram submetidos à etapa prévia de digestão com 5µL de proteinase K (400,0µg/mL) por 3 horas a 56°C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 96°C para inativação da enzima. Foram adicionados aos produtos digeridos 100µL de solução de NaCl 5M e 100µL da solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 56°C. As amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos e, em seguida, foram adicionados 750µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1. O material foi agitado por 10 segundos e centrifugado por 5 minutos a 15.700g a 4°C. Posteriormente, os sobrenadantes foram transferidos para novo microtubo e adicionados 450µL de etanol absoluto a -20°C, seguido de uma incubação por 10 minutos a -20°C. Após essa incubação, as amostras foram novamente centrifugadas, o álcool eliminado e adicionados 450µL de etanol a 70%. Seguido de nova centrifugação, o álcool foi eliminado e os microtubos mantidos em ambiente seco para secagem. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 50µL de tampão TE (Tris/EDTA).

O protocolo de extração utilizado foi padronizado no Laboratório de Patologia Placentária e a eficiência das extrações realizadas foi confirmada através da detecção, por PCR, do gene da β -globina de todas as amostras avaliadas.

4.3.2.2. Amplificação da sequência de aproximadamente 1500bp do gene bacteriano rRNA 16S

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL em volumes totais de 25µL, contendo 1µL de cada *primer* (25,0µM) (Tabela 1), 12,5µL de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) e 5µL da amostra. Controles positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 19095) e negativos (água Milli-Q) foram utilizados em todas as reações. A incubação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Personal*), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

4.3.2.3. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% preparado em tampão 1X TBE (0,09M Tris-Borato; 0,002 EDTA) e corado com Brometo de Etídeo (0,1µg/mL), em 100 V por 40 minutos. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 250bp, e posteriormente, fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Tabela 1. Sequências iniciadoras para a detecção do gene da urease de *Ureaplasma urealyticum*⁴⁴, do gene rRNA 16S de *Mycoplasma hominis*⁴⁵ e do gene bacteriano RNAr 16S⁴¹.

GENES	MICROORGANISMOS	SEQUÊNCIAS INICIADORAS	PRODUTOS
Urease	<i>U. urealyticum</i>	U5 5'-CAA TCT GCT CGT GAA GTA TTA C-3'	429bp
		U4 5'-ACG ACG TCC ATA AGC AAC T-3'	429bp
RNAr 16S	<i>M. hominis</i>	M1 5'-CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C-3'	334bp
		M2 5'-GGT ACC GTC AGT CTG CAA T-3'	334bp
RNAr 16S	Várias spp.	FD1 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	~1.500bp
		RP1 5'-ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT-3'	~1.500bp

4.3.3. Clonagem gênica

4.3.3.1. Purificação dos produtos da PCR e quantificação de DNA

As bandas obtidas dos produtos da reação para pesquisa do gene bacteriano RNAr 16S foram recortadas do gel de agarose e purificadas utilizando o *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Após a purificação, o DNA das amostras foi quantificado por leitura em *NanoDrop* (Eppendorf) na absorbância de 260nm (A_{260}).

4.3.3.2. Ligação do fragmento purificado ao Vetor

A etapa de ligação do produto de PCR amplificado e purificado ao vetor bacteriano foi realizada utilizando-se o *Kit pGEM® T Easy Vector System* (Promega), sob protocolo otimizado a partir do original de 1µl de T4 ligase, 5µl de tampão, 1µl do vetor *pGEM-T* e 2µl do fragmento de DNA e 1µl de água milliQ autoclavada, obtendo-se 10µl de reação final à concentração de 30 ng/µL. A reação foi mantida a 16°C por 16 horas.

4.3.3.3. Clonagem

Para transformação de células competentes, foi acrescido o volume total da reação de ligação a 50µl de células competentes DH5- α de *Escherichia coli* (Invitrogen®), sendo então submetidas a choque térmico e plaqueadas em meio Circle Grow (CG) ágar contendo ampicilina (50ng/ml), juntamente com os marcadores X-GAL e IPTG. As placas foram estocadas em estufa a 37°C *overnight*. No dia seguinte, ao menos 10 colônias brancas de cada amostra, nas quais os plasmídeos com o inserto estavam potencialmente presentes, foram selecionadas com ponteiros estéreis, mergulhadas em microtubos contendo um *mix* previamente preparado com o *primer* M13 *forward* e *reverse* e riscadas em outra placa com CG e ágar, para produção de colônias permanentes.

A reação de PCR com o *primer* M13 foi otimizada utilizando-se 2,0 µl de tampão 10X (Invitrogen), 0,8µl de MgCl₂ (50µM), 1µl de dNTP (10mM cada), 1,5µl de *primer* F (20µM), 1,5µl de *primer* R (20 µM), 0,25µl de DNA Taq polimerase (5U/µl) (Invitrogen) e água destilada ou deionizada para um volume final de 20µl. O programa de amplificação consiste em uma desnaturação inicial de 3 minutos a 95° C, 35 ciclos de 45 segundos a 95° C, 45 segundos a 55° C e 1 minuto a 72° C, com extensão de 5 minutos a 72° C.

Os clones com cerca de 1700 bp confirmados pela visualização sob transiluminação ultra-violeta da eletroforese em gel de agarose a 1% foram selecionados e os produtos de PCR que mostraram apresentar o inserto foram purificados utilizando 2µl da enzima Exosap (GE Healthcare) para cada 8µl do produto de reação em banho maria por 33 minutos à 37°C e em seguida por 15 minutos à 80°C. Em seqüência a esse procedimento, as amostras foram armazenadas à -20°C. Os procedimentos da clonagem gênica foram realizados no Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu.

4.3.4. Seqüenciamento do gene bacteriano RNAr 16S

4.3.4.1. Reação de precipitação

Os produtos obtidos na reação de sequenciamento foram submetidos à precipitação. Inicialmente foram adicionados 80µL de isopropanol 80% nos microtubos contendo os produtos da reação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16.100g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Após a adição de 150µL de etanol 70%, foram realizadas nova centrifugação e descarte, e armazenamento dos microtubos em local seco à temperatura ambiente para secagem.

4.3.4.2. Reação de sequenciamento

As amostras foram diluídas em 2,2µL de *Blue Dextran* acrescido de 5º *Dye* (*Applied Biosystems*) em concentração 1:8 para posterior aplicação em gel desnaturante de uréia-poliacrilamida 5% (*Long Ranger Singel Packs/BMA*).

As reações foram realizadas em microtubos de 0,2mL com volumes totais de 10µL, contendo 2µL de *ABI PRISM Big Dye Terminator Cicle Sequencing Ready Reaction Kit* (*Applied Biosystems*), 0,5µL do *primer foward* (10,0µM) e 2µL do produto obtido na PCR. As mesmas reações foram repetidas utilizando o *primer reverse* (10,0µM). A incubação foi realizada em termociclador (*PTC 200, MJ Research*), com um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos com desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

4.3.4.3. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático de DNA, *DNA Sequencer ABI Prism 377 (Applied Biosystems)*, com voltagem fixada em 300V e o intervalo de tempo para a coleta de sinais fluorescentes em 2400 scans por hora. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X (0,09M Tris-Borato; 0,002 EDTA) por 3 horas e 30 minutos a 200W com temperatura aproximada de 51°C.

Durante a eletroforese, a fluorescência detectada na região do *laser scanner* foi coletada e estocada pelo *software Data Collection 2.6 (Applied Biosystems)*. Posteriormente, os dados foram analisados pelo *software Sequencing Analysis 3.4 (Applied Biosystems)*, através da transformação da intensidade de fluorescência em picos correspondentes aos nucleotídeos de acordo com matriz padrão instalada no *software* (cromatograma).

4.3.4.4.. Identificação das espécies bacterianas

As seqüências obtidas foram analisadas utilizando o BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para avaliação da porcentagem de identidade e determinação da espécie bacteriana referente ao gene RNAr 16S analisado.

4.4. Análise estatística

Os dados relativos às características das gestantes em relação às variáveis sócio-demográficas e gestacionais foram submetidos ao teste z de comparação entre proporções. A idade materna e a idade gestacional no momento da obtenção do líquido amniótico e foram submetidas ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os grupos controle e TPP. O nível de significância adotado para os testes empregados foi de 5,0%⁴⁶. O software utilizado para as análises foi o Sigma Stat 3.1 (Jandel Corporation).

5. Resultados

5.1. Incidência de TPP e características das gestantes

No período do estudo, foram realizados 1785 partos no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Nesse período, a incidência de TPP com bolsa íntegra foi de 5,8%. Os dados referentes às variáveis sócio-demográficas, à gestação atual e aos antecedentes obstétricos foram avaliados em todas as gestantes incluídas no estudo. Os dados relativos aos antecedentes obstétricos revelaram que as pacientes do grupo TPP apresentaram maior frequência de episódios de TPP em gestações prévias. Quanto às demais variáveis avaliadas não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos estudados (Tabela 2).

Em relação à idade gestacional no momento da inclusão no estudo, a mediana do grupo controle foi de 34s2d (30s2d-36s2d) e no grupo TPP foi de 33s1d (26s2d-36s), não apresentando diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2. Variáveis sócio-demográficas e obstétricas de gestantes dos grupos controle e TPP.

Variáveis	Controle (N=20)	TPP (N=20)	p
Idade (anos)*	30 (20-43)	25 (14-39)	0,09
Estado civil			
Solteira	3 (15,0%)	4 (20,0%)	1,00
União Estável	17 (75,0%)	16 (80,0%)	1,00
Etnia			
Branca	17 (85,0%)	17 (85,0%)	0,66
Não branca	3 (15,0%)	3 (15,0%)	0,66
Tabagismo	2/18 (11,1%)	3/14 (21,4%)	0,78
Paridade			
Primigesta	5 (25,0%)	7 (35,0%)	0,73
Multigesta	15 (75,0%)	13 (65,0%)	0,73
Intercorrências gestacionais anteriores			
RPM	-	-	-
Abortos	3/15 (20,0%)	3/13 (23,1%)	0,73
TPP	2/15 (13,3%)	8/13 (61,5%)	0,02

*valores expressos em mediana e (valores mínimos e máximos)

5.2. Detecção de invasão microbiana na cavidade amniótica

5.2.1. Detecção de *M. hominis* e *U. urealyticum* no líquido amniótico

A pesquisa de *M. hominis* foi positiva em sete amostras de líquido amniótico de gestantes pertencentes ao grupo TPP (35,0%) e em apenas uma amostra do grupo controle (5,0%) ($p=0,04$). Em relação à detecção de *U. urealyticum*, foram observadas três amostras positivas (15,0%), sendo que todas foram provenientes de gestantes do grupo TPP e apresentaram co-infecção por *M. hominis* (Tabela 3).

5.2.2. Detecção de infecção do líquido amniótico por outras espécies bacterianas

A presença do gene bacteriano RNAr 16S foi observada em 30,0% (6/20) das amostras de LA das gestantes do grupo TPP. Dentre as seis amostras positivas para o RNAr 16S, cinco (83,3%) foram positivas para, pelo menos, uma espécie de micoplasma (Tabela 3). Os resultados obtidos nessa análise não revelaram positividade dentre as amostras de LA grupo controle ($p=0,03$).

5.2.3. Identificação das espécies bacterianas no líquido amniótico pelo sequenciamento do gene RNAr 16S

A avaliação das seqüências do gene RNAr 16S detectados nas amostras de LA possibilitou a identificação de diferentes espécies bacterianas em 66,7% das amostras analisadas (4/6 amostras). Considerando os resultados da detecção de todos os genes bacterianos pesquisados, foram observadas oito amostras de LA de pacientes em TPP positivas para um ou mais dos genes bacterianos pesquisados (Tabela 3). Portanto, a frequência de infecção da CA em pacientes em TPP foi de 40,0%, enquanto que apenas uma amostra (5,0%) do grupo controle apresentou positividade para infecção ($p<0,05$). A figura 1 representa um eletroferograma obtido no sequenciamento das amostras.

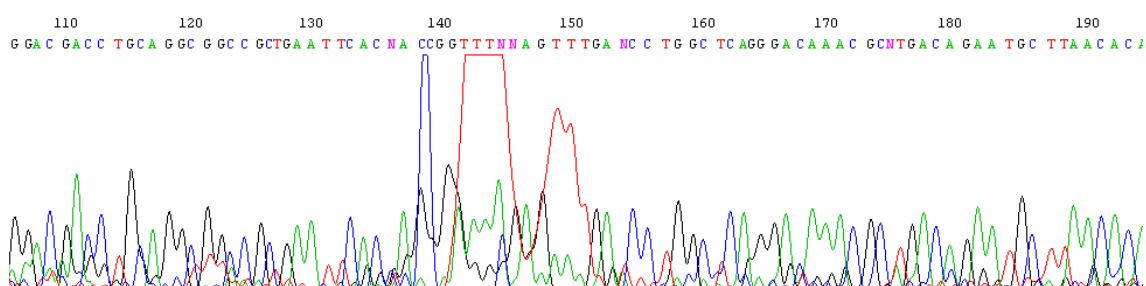


Figura 1: Eletroferograma (cromatograma) obtido do sequenciamento das amostras submetidas à clonagem gênica.

Tabela 3. Microrganismos identificados no líquido amniótico de gestantes em TPP pela técnica da PCR para pesquisa de *M. hominis* e *U. urealyticum* e do gene bacteriano RNAr 16S.

LA de pacientes em TPP	Pesquisa de micoplasma	Pesquisa de RNAr 16S bacteriano	Sequenciamento do RNAr 16S bacteriano
Amostra 1	Mh, Uu	Positiva	—
Amostra 2	Mh, Uu	Positiva	<i>Leptotrichia</i> sp., Mh
Amostra 3	Mh	Positiva	Mh, Uu
Amostra 4	Negativa	Positiva	<i>Bacterioides</i> sp., <i>Prevotella</i> sp.
Amostra 5	Mh	Negativa	—
Amostra 6	Mh	Positiva	—
Amostra 7	Mh	Negativa	—
Amostra 8	Mh	Positiva	<i>Bacterioides</i> sp., <i>Prevotella</i> sp.

Mh= *Mycoplasma hominis* , Uu= *Ureaplasma urealyticum*.

6. Discussão

O TPP é uma grave intercorrência obstétrica, em cuja etiologia multifatorial pode-se destacar a infecção da cavidade amniótica e a inflamação intra-amniótica¹⁴. Microrganismos presentes na microbiota vaginal ascendem transcervicalmente atingindo e infectando a CA. A morbidade perinatal resultante da liberação de endotoxinas e exotoxinas desses microrganismos e da estimulação da produção de citocinas inflamatórias, prostaglandinas e metaloproteínas incluem, principalmente, a prematuridade com aumento da suscetibilidade a complicações cerebrais⁴⁷ e pulmonares⁴⁸. Apesar das novas terapias farmacológicas e dos programas de prevenção, a incidência de TPP não tem diminuído nas últimas décadas.

No período do estudo, foram realizados 1785 partos no Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e a prevalência de TPP foi de 5,8%. Essa incidência é similar à encontrada na literatura, que relata incidência variando entre 5 e 10% do total de gestações¹⁻³.

Quanto às variáveis sócio-demográficas, a análise estatística não revelou diferença significativa entre os grupos TPP e controle para os dados referentes à idade, estado civil, etnia, tabagismo, paridade e ocorrência de aborto ou rotura prematura de membranas pré-termo em gestações anteriores. No entanto, houve maior freqüência de episódios prévios de TPP nas gestantes do grupo TPP, dado já bem estabelecido na literatura^{8,49}. Somado a isso, a ocorrência de episódios de TPP em gestações subseqüentes está relacionada com a infecção intrauterina persistente ou recorrente⁴⁹.

Embora múltiplos fatores estejam associados ao desenvolvimento de TPP, o papel da infecção da CA tem se tornado cada vez mais importante na sua etiologia, à medida que são realizados trabalhos com excelência metodológica e análise precisa dos resultados. Nesse sentido, a realização de estudos com técnicas de biologia molecular para detecção de microrganismos no LA tem contribuído para consolidar o papel da infecção no desenvolvimento do TPP, especialmente quando se trata de espécies conhecidamente fastidiosas como os micoplasmas^{34,35}. Embora as espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* sejam freqüentemente detectadas no LA de gestantes^{35,50}, seu papel no desenvolvimento do TPP ainda tem sido pouco estudado.

Nesse estudo, a positividade de *M. hominis* no LA de gestantes em TPP foi de 35,0%, sendo sete vezes superior à freqüência encontrada em gestantes do grupo controle. Considerando o total de pacientes incluídas neste estudo, houve detecção de *M. hominis* em 20,0% das amostras de LA, freqüência superior à encontrada em outros estudos, que empregaram a técnica de PCR para detecção desse microrganismo em LA, obtido através de amniocentese, em segundo trimestre de gestação^{14,51} e em amostras de LA de pacientes em TPP^{52,53}.

Em relação à infecção por *U. urealyticum*, 15,0% das pacientes em TPP apresentaram presença deste microrganismo no LA. Esta taxa de infecção é superior a maioria dos relatos encontrados da literatura^{41,35,54}, embora Witt et al.⁵⁵ tenham encontrado positividade de 43,6% em LA de pacientes em TPP e bolsa íntegra.

A pesquisa de microrganismos no LA através da pesquisa do gene bacteriano RNAr 16S revelou positividade de seis amostras de LA pertencentes às gestantes do grupo TPP, além daquelas positivas para *M. hominis* e/ou *U. urealyticum*. Através do seqüenciamento do produto do gene RNAr 16S amplificado pela PCR, pode-se identificar esses microrganismos como *Bacterioides* sp., *Leptotrichia* sp., *Prevotella* sp., *M. hominis* e *U. urealyticum*. Espécies do gênero *Bacterioides* são associadas à vaginose bacteriana⁵⁶ e são freqüentemente isoladas no LA de pacientes em TPP^{9,13}. A espécie *Leptotrichia amnionii* sp. foi descrita, em relato de caso, como bactéria isolada no líquido amniótico de gestação com óbito fetal⁵⁷. Segundo DiGiulio et al.⁵⁸, a diversidade bacteriana identificada no líquido amniótico de gestantes em TPP inclui as espécies *Delfia acidovorans*, *Neisseria cinerea*, *Sneathia sanguinegens*, *Leptotrichia amnionii*, entre outras. Para esses autores⁵⁸, a cavidade amniótica de gestantes em TPP apresenta uma diversidade microbiana superior à diagnosticada em outros estudos, principalmente pela presença de espécies não cultiváveis.

Outro gênero identificado nas amostras de LA do presente estudo foi *Prevotella* sp. Trata-se de uma bactéria Gram negativa, anaeróbia, não formadora de esporos que, de acordo com Lawson et al.⁵⁹, foi identificada no líquido amniótico de gestantes. Em estudos experimentais a *P. bivia* esteve relacionada com parto prematuro⁶⁰.

Os resultados do presente estudo demonstram infecção polimicrobiana do líquido amniótico. Trabalhos anteriores já demonstraram que a infecção por mais de uma espécie bacteriana é freqüentemente encontrada no LA⁵⁵ e em membranas corioamnióticas⁶¹ de pacientes em TPP.

Considerando a metodologia empregada e os resultados obtidos, podemos concluir que a freqüência de infecção na cavidade amniótica de gestantes em TPP é maior que em gestantes fora de trabalho de parto e que a infecção polimicrobiana é freqüentemente encontrada naquelas gestantes.

Assim, o estudo da resposta inflamatória frente à infecção polimicrobiana poderá contribuir para a compreensão da fisiopatologia do TPP e encorajar o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento em gestantes em TPP.

7. Referências Bibliográficas*

1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008; 371:75-84.
2. Tracy SK, Tracy MB, Dean J, Laws P, Sullivan E. Spontaneous preterm birth of liveborn infants in women at low risk in Australia over 10 years: a population-based study. *BJOG* 2007; 114:731-5.
3. McPheeters ML, Miller WC, Hartmann KE, Savitz DA, Kaufman JS, Garrett JM, et al. The epidemiology of threatened preterm labor: A prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1325-30.
4. Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, Guyer B, MacDorman MF. Annual summary of vital statistics-2003. *Pediatrics* 2005; 115:619-34.
5. *Gestação de Alto Risco / Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher*. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. 164 p.
6. McCormik MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med* 1985;312:82-90.
7. Hitti J, Nugent R, Boutain D, Gardella C, Hillier SL, Eschenbach DA. Racial disparity in risk of preterm birth associated with lower genital tract infection. *Pediatr and Perinat Epidemiol* 2007; 21:330-7.
8. Lo CC, Hsu JJ, Hsieh CC, Hsieh TT, Hung TH. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among Taiwanese women. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007; 46:389-94.
9. Varma R, Gupta JK, James DK, Kilby MD. Do screening-preventative interventions in asymptomatic pregnancies reduce the risk of preterm delivery – A critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 127:145-59.
10. Ancel PY. Perspectives in the prevention of premature birth. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 2004;117S:S2-5.
11. McNamara HM. Problems and challenges in the management of preterm labor. *BJOG* 2003;110:79-85.
12. Hirsch E, Wang H. The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: insights from the murine model. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:145-55.

* Elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47.

13. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obst Gynecol* 1992;166:1515-28.
14. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.
15. Romero R, Marzor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1988;31:553-84.
16. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts H, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obst Gynecol* 1993;81:941-8.
17. Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8:3-13.
18. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst RM, Wennerholm IB, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women in preterm labor. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:120-8.
19. Horowitz S, Mazor M, Romero R, Horowitz J, Glezerman M. Infection of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* in the midtrimester of pregnancy. *J Reprod Med* 1995;40:375-9.
20. Wenstrom KD, Andrews WW, Bowles NE, Towbin JA, Hauth JC, Goldenberg RL. Intrauterine viral infection at time of second-trimester genetic amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1998;92:420-4.
21. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 2002;109:527-33.
22. Romero R, Hanaoka S, Mazor M, Athanassiadis AP, Callahan R, Hsu YC, et al. Meconium-stained amniotic-fluid: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:859-62.
23. Galask RP, Varner MW, Petzold CR, Wilbur SL. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:915-28.
24. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 2006;113:17-42.
25. Gyr TN, Malek A, Mathez Loic F, Altermatt HJ, Bodmer T, Nicolaides K, et al. Permeation of human chorioamniotic membranes by *Escherichia coli* in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:223-7.

26. Cauci S, Monte R, Driussi S, Lanzafame P, Quadrifoglio F. Impairment of the mucosal immune system: IgA and IgM cleavage detected in vaginal washings of a subgroup of patients with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 1998;178:1698-706.
27. McGregor JA, French JI, Jones W, Milligan K, McKinney PJ, Patterson E, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamicyn cream. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1048-59.
28. Cauci S, McGregor J, Thorsen P, Grove J, Guaschino S. Combination of vaginal sialidase and prolidase activities for prediction of low birth weight and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:489-96.
29. Newton ER, Piper JM, Shain RN, Perdue ST, Pears W. Predictors of the vaginal microflora. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:845-55.
30. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MTS. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003;81:175-82.
31. Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. *Obstet Gynecol* 1998;92:77-82.
32. Shimada M, Kotani T, Sameshima H, Nagamine Y, Kodama Y, Ikenoue T, et al. Two patients with premature labor associated with *Mycoplasma hominis* infection. *J Med Microbiol* 1998;47:179-82.
33. Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Wikin 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;187:518-21.
34. Yoon BH, Romero R, Kim M, Kim EC, Kim T, Park JS, et al. Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1130-7.
35. Yoon BH, Romero R, Lim JH, Shim SS, Hong JS, Shim JY, et al. 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;189:919-24.
36. Cassel GH, Cole BC. Mycoplasmas as agents of human disease. *N Engl J Med* 1981;304:80-3.
37. Taylor-Robinson D. Infections due to species of *Mycoplasma* and

- Ureaplasma*: an update. Clin Infect Dis 1996;23:671-84.
38. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel MD, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. Semin Reprod Med 2007;25:21-39.
39. Jalava J, Mäntymaa ML, Ekblad U, Toivanen P, Skurnik M, Lassila O, et al. Bacterial 16S rDNA polymerase chain reaction in the detection of intra-amniotic infection. Br J Obstet Gynecol 1996;103:664-9.
40. Gardella C, Riley DE, Hitti J, Agnew K, Krieger JN, Eschenbach D. Identification and sequencing of bacterial rDNA in culture-negative amniotic fluid from woman in preterm labor. Am J Perinatol 2004; 21:319-23.
41. Miralles R, Hodge R, McParland PC, Field DJ, Bell SC, Taylor DJ, et al. Relationship between antenatal inflammation and antenatal infection identified by detection of microbial genes by polymerase chain reaction. Pediatr Res 2005;57:570-7.
42. Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. Lancet 2008; 371:261-9.
43. Shmuel R, Tully JG. Methods in mycoplasmaology. New York: Academic Press Inc, 1983.
44. Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K. 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;17:148-53.
45. Blanchard A, Yáñez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell GH. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993;31:1358-61.
46. Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. Bioestatística. E.P.U. Editora, 1981.
47. Hagberg B, Hagberg G, Beckung E, Uvebrant P. Changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991-94. Acta Paediatr 2001;90:271-7.
48. Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner D, Eschenbach DA. Vaginal indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. Obstet Gynecol 2001;97:211- 9.
49. Goldenberg RL, Andrews WW, Faye-Petersen O, Cliver BA, Goepfert AR, Hauth JC. The Alabama Preterm Birth Project: Placental histology in recurrent spontaneous and indicated preterm birth. Am J Obstet Gynecol

- 2006;195:792-6.
50. Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, Tuttle SL, Paraskevas LR, Chasen ST, et al. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. Am J Obstet Gynecol 2004;191:1382-6.
51. Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS. *Mycoplasma hominis* in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. J Perinat Med 2004;32:323-6.
52. Markenson GR, Martin RK, Tillotson-Criss M, Foley KS, Stewart Jr RS, Yancey M. The use of the polymerase chain reaction to detect bacteria in amniotic fluid in pregnancy complicated by preterm labor. Am J Obstet Gynecol 1997;177:1471-7.
53. Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Wennerholm UB, Hagberg H, Jacobsson B. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. Acta Obstet Gynecol Scan 2005;84:551-557.
54. Watts H, Krohn MA, Hiller SL, Eschenbach DA. The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor. Obst Gynecol 1992;79:351-7.
55. Witt A, Berger A, Gruber CJ, Petricevic L, Apfalter P, Worda C, et al. Increased intrauterine frequency of *Ureaplasma urealyticum* in women with preterm labor and preterm premature rupture of membranes and subsequent cesarean delivery. Am J Obstet Gynecol 2005;193:1663-9.
56. Martius J, Eschenbach DA. The role of bacterial vaginosis as a cause of amniotic fluid infection, chorioamnionitis and prematurity – a review. Arch Gynecol Obstet 1990;247:1-13.
57. Shukla SK, Meier PR, Mitchell PD, Frank DN, Reed KD. *Leptotrichia amnionii* sp. nov., a novel bacterium isolated from the amniotic fluid of a woman after intrauterine fetal demise. J Clin Microbiol 2002;40:3346-9.
58. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. PLoS ONE 2008; 26;3:e3056.
59. Lawson PA, Moore E, Falsen E. *Prevotella amnii* sp. nov., isolated from human amniotic fluid. Int J Syst Evol Microbiol 2008;58:89-92.

60. Gibbs RS, McDuffie RS Jr, Kunze M, Barr JM, Wolf DM, Sze CI, et al. Experimental intrauterine infection with *Prevotella bivia* in New Zealand White rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1082-6.
61. Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med* 1988;319:972-80.