



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE - DSAU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA

JESSICA SANTOS PASSOS COSTA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE
PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA OROFARÍNGEA DE
COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS):
ESTUDO DE INTERVENÇÃO**

FEIRA DE SANTANA

2023

JESSICA SANTOS PASSOS COSTA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE
PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA OROFARÍNGEA DE
COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS):
ESTUDO DE INTERVENÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana, linha de pesquisa “Saúde de Grupos Populacionais Específicos”, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Saúde Coletiva.

Orientadora: Profa. Dra. Graciete Oliveira Vieira

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Guimarães Benevides.

FEIRA DE SANTANA

2023

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Costa, Jessica Santos Passos

C873a Análise metagenômica da microbiota intestinal de prematuros em imunoterapia orofaríngea de colostro atendidos no Sistema Único de Saúde (SUS): estudo de intervenção. / Jessica Santos Passos Costa. – 2023.
176 f.: il.

Orientadora: Graciete Oliveira Vieira

Coorientadora: Raquel Guimarães Benevides

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa, de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Feira de Santana, 2023.

1.Metagenômica. 2.Microbiota. 3.Colostr. 4.Recém-nascido – Prematuro.
5.16S 6.rRNA I.Vieira, Graciete Oliveira, orient. II.Benevides, Raquel Guimarães,
coorient. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.Título.

CDU: 616-053.2

Maria de Fátima de Jesus Moreira - Bibliotecária - CRB-5/1120

JESSICA SANTOS PASSOS COSTA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE
PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA OROFARÍNGEA DE COLOSTRO
ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE
INTERVENÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana, linha de pesquisa “Saúde de Grupos Populacionais Específicos”, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Saúde Coletiva.

Feira de Santana, 13 de junho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: PROF^a DR^a GRACIETE OLIVEIRA VIEIRA.
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Examinadora: PROF^a DR^a CARLA ROMANO TADDEI
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Examinador: PROF^a DR^a ARISTOTELES GOES NETO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Examinadora: PROF^a DR^a CAMILLA DA CRUZ MARTINS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Examinadora: PROF^a DR^a JULIANA NASCIMENTO ANDRADE
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à **Deus**, pelas bênçãos e graças concedidas. Por ter me permitido chegar até aqui na concretização do meu sonho, agradeço por todas as pessoas que passaram e ficaram no meu caminho.

Aos meus pais **Gil** e **Sílvia**, pela educação, amor, apoio e incentivo. Minhas irmãs, **Marjory** e **Gilmara** pelo convívio e carinho. Em especial a minha mãe, por ser meu exemplo de vida, meu alicerce, minha inspiração!

Aos amores da minha vida, meus filhos queridos **Bernardo** e **Lorenzo**, que me impuseram meu maior desafio (doutorado e maternidade), e ao meu marido, **Rodrigo**, pelo companheirismo, compreensão, dedicação, incentivo nos momentos difíceis e pela tolerância diante das mudanças bruscas de humor.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva e à Universidade Estadual de Feira de Santana, pelo pronto atendimento, esclarecimentos, disponibilidade, direcionamento e auxílio, o que possibilitou a realização da minha pesquisa, colaborou no custeio dos manuscritos, de viagens para capacitação e cursos em outra universidade.

A minha orientadora profa. **Graciete Oliveira Vieira**, por ter acreditado e embarcado nessa pesquisa inovadora e desafiadora, pelos ensinamentos, acompanhamento e direção de toda minha trajetória desde o mestrado, além da paciência diante das minhas limitações.

A minha coorientadora profa. **Raquel Guimarães Benevides**, por todo acolhimento, direcionamento da melhor técnica a ser utilizada neste estudo, e aceite em embarcar nessa pesquisa, sem me conhecer previamente! Gratidão Professora.

A todos os integrantes do Núcleo de Pesquisa e Extensão em Saúde – NUPES, que colaboraram de alguma maneira para o andamento dessa Pesquisa, em especial à **Camilla da Cruz Martins** por ter colaborado na construção e correção árdua dos manuscritos, garantindo a qualidade, sempre com muita paciência.

A profa. **Heli Vieira**, que aceitou em ser responsável técnica perante o CNPq, fato que viabilizou a realização desta pesquisa. Gratidão professora pela confiança e pela condução de todo o processo com muito profissionalismo.

A profa. **Carla Taddei** pela parceira, pelo apoio, pelos ensinamentos e direcionamentos em me receber em seu laboratório e compartilhar seus conhecimentos conosco. Além de todos os parceiros e colaboradores do laboratório, em especial ao **Gustavo e Pedro**

As minhas amigas fiéis, que me deram colo, escuta, consolo e me ajudaram a buscar o meu balde toda vez que eu chutava para longe. Em especial a **Aline**, amiga querida, que Deus colocou no meu caminho, e, que levarei para minha vida. As minhas amigas do grupo de apoio de vida Código do Goku: **Vitória, Camila e Bianca**, pela escuta compreensiva nos momentos difíceis dessa longa trajetória.

À amiga **Fabiane**, há quase 20 anos de lealdade e parceria, agradeço pelas conversas, conselhos, puxões de orelha, pelo ombro amigo, apoio e incentivo. Às amigas **Marcelle e Itana**, sempre fiéis e acolhedoras, mesmo depois de anos sem nos falar, nosso reencontro foi maravilhoso! À amiga **Suzana**, grande presente que a docência no curso de Educação Física da UEFS me trouxe, nossa conexão foi rápida e verdadeira, obrigada cremosa por tanto!

Aos amigos, parentes, colaboradores, aos meus alunos e ex alunos pelas orações e vibrações positivas, pelo auxílio direta ou indiretamente que de alguma maneira contribuíram nessa caminhada.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro disponibilizado para execução da pesquisa, permitindo alcançar este título.

Agradeço também a CAPES por desempenhar papel fundamental na expansão e consolidação do nosso programa de pós-graduação.

Aos membros da banca de qualificação e defesa que participaram e auxiliaram no direcionamento e qualidade desta pesquisa.

*"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."
(Charles Chaplin)*

RESUMO

COSTA, J.S.P. Análise metagenômica da microbiota intestinal de prematuros em imunoterapia orofaríngea de colostro atendidos no Sistema Único de Saúde (SUS): estudo de intervenção. Tese (176f.). Doutorado em Saúde Coletiva – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana- BA, 2023.

A análise metagenômica da microbiota intestinal revela, de maneira rápida e eficiente, a estrutura da comunidade e a variação bacteriana, mediante a identificação das espécies presentes no intestino. Objetivo: Avaliar, por meio da análise do DNA metagenômico, o estabelecimento da microbiota intestinal em Recém-Nascidos Pré-termos (RNPT), tratados ou não com a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro (IOC) em hospitais de Feira de Santana – BA. Métodos: A amostra foi composta por RNPT atendidos no Hospital Inácia Pinto dos Santos, como grupo de intervenção; e atendidos no Hospital Estadual da Criança, como grupo controle. As variáveis maternas investigadas foram: as características sociodemográficas, assistenciais no pré-natal/parto; hábitos de vida; da criança: sexo, peso ao nascer e apgar. A coleta de dados ocorreu por meio de questionários e dados dos prontuários da criança/mãe. As amostras fecais foram coletadas por meio de 4 amostras, porém as análises foram realizadas no mecônio e na amostra do 7º dia de vida. Para a coleta utilizou-se recorte de tecido cirúrgico estéril dentro da fralda, as fezes foram coletadas com auxílio de espátula de Ayre estéril, armazenadas em coletor estéril, congeladas a -20°C, e posteriormente, -80°C. A análise foi realizada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA com análise de alfa diversidade (*Chao1*, *Shannon* e *Simpson*) e de coordenadas principais de beta diversidade. As variáveis categóricas foram descritas por meio das frequências absolutas e relativas; as variáveis numéricas por média, mediana, desvio padrão e interquartis. Realizou-se teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, e o teste não-paramétrico de *Wilcoxon rank sum exact test*, nível de significância foi de 5%. Foram utilizados os pacotes estatísticos: *Statistical Package for the Social Sciences* e *software R studio*. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e registrada no Registros Brasileiros de Ensaio Clínicos. Resultados: coletou-se dados de 52 crianças, 41 do grupo controle e 11 do grupo intervenção, após exclusões, foram analisadas e sequenciadas 6 neonatos do grupo intervenção e 23 do grupo controle. Analisou-se os dados independentes entre os grupos, resultando em três artigos. O primeiro apresentou os resultados da sistematização do protocolo de coleta das amostras fecais. O segundo, os resultados do grupo controle, demonstrou evolução da microbiota com baixa diversidade. Houve associação estatística com gêneros *Enterobacterales*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*, e dominância do gênero *Staphylococcus*, possivelmente relacionada a prevalência de nascimentos por parto cesáreo, microbiota do leite materno e cavidade oral; no terceiro, realizado no grupo intervenção, não foi observado efeito da IOC sobre a predominância de gêneros comensais. Não houve dominância de gêneros específicos, porém destaca-se a maior prevalência de *Bacteroides*, *Streptococcus* e *Listeria* no mecônio e *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Bacteroides* no 7º dia de vida. Conclusão: este é um estudo inovador, sendo o único trabalho nacional que discutiu a evolução da microbiota intestinal de RNPT de MBP e EBP, com extrema relevância na área clínica. Conhecer os fatores que alteram a microbiota de RNPT são importantes por apresentarem repercussões a curto e longo prazo na qualidade de vida destes neonatos.

Palavras-chave: Metagenômica, Microbiota, Colostro, Recém-Nascido Prematuro, 16S rRNA

ABSTRACT

COSTA, J.S.P. Metagenomic analysis of the intestinal microbiota of preterm infants on oropharyngeal colostrum immunotherapy treated in the unified health system (SUS): an intervention study. Doctoral thesis (176f.). PhD in Collective Health – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana- BA, 2023.

The metagenomic analysis of the intestinal microbiota quickly and efficiently reveals the structure of the community and bacterial variation, by identifying the species present in the intestine. Objective: To evaluate, through metagenomic DNA analysis, the establishment of the intestinal microbiota in Preterm Newborns (PTNB), treated or not with Oropharyngeal Colostrum Immunotherapy (OTI) in hospitals in Feira de Santana - BA. Methods: The sample consisted of PTNBs treated at the Hospital Inácia Pinto dos Santos, as an intervention group; and assisted at the Children's State Hospital, as a control group. The maternal variables investigated were: sociodemographic characteristics, assistance in prenatal care/delivery; life habits; of the child: gender, birth weight, Apgar score. Data collection takes place through questionnaires and data from the child's/mother's medical records. The fecal samples were collected using 4 samples, however the analyzes were performed on the meconium and on the sample from the 7th day of life. For collection, a sterile surgical tissue clipping was used inside the diaper, the feces were collected with the aid of a sterile Ayre spatula, stored in a sterile collector, frozen at -20°C, and later, -80°C. The analysis was performed by sequencing of the 16S rRNA gene with analysis of alpha diversity (Chao1, Shannon and Simpson) and principal coordinates of beta diversity. Categorical variables were described using absolute and relative frequencies; numeric variables by mean, median, standard deviation and interquartiles. A Shapiro-Wilk normality test was performed, and the non-parametric Wilcoxon rank sum exact test, significance level was 5%. Statistical packages were used: Statistical Package for the Social Sciences and R studio software. The research was approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings and registered in the Brazilian Register of Clinical Trials. Results: data were collected from 52 children, 41 from the control group and 11 from the intervention group, after exclusions, 6 neonates from the intervention group and 23 from the control group were analyzed and sequenced. Independent data between groups was analyzed, resulting in three articles. The first presented the results of the systematization of the fecal sample collection protocol. The second, the results of the control group, showed the evolution of the microbiota with low diversity. There was a statistical association with the genera Enterobacterales, Streptococcus, Bacteroides, Clostridium_sensu_stricto_1, Enterococcus and Bifidobacterium, and dominance of the genus Staphylococcus, possibly related to the prevalence of births by cesarean delivery, microbiota of breast milk and oral cavity; in the third, carried out in the intervention group, no effect of COI on the predominance of commensal genera was observed. There was no dominance of specific genres, but there was a higher prevalence of Bacteroides, Streptococcus and Listeria in the meconium and Staphylococcus, Enterococcus and Bacteroides on the 7th day of life. Conclusion: This is an innovative study, being the only national work that discussed the evolution of the intestinal microbiota of PTNB with MBP and EBP, with extreme relevance in the clinical area. Knowing the factors that alter the microbiota of PTNBs is important because they have short and long-term repercussions on the quality of life of these newborns.

Key-words: Metagenomic, Microbiota, Colostrum, Infant, Premature, RNA, Ribosomal, 16S

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Figura 1 – Modelo de determinação social da saúde baseado em Dahlgren e Whitehead (1991), com a Distribuição dos fatores do estudo no esquema hierárquico proposto.	28
Figura 2 - Modelo Teórico Conceitual baseado na Teoria da Determinação Social do Processo Saúde Doença e na Teoria da Complexidade para a investigação da modulação da microbiota em recém-nascidos pré-termos, a partir da utilização da Imunoterapia Orofaríngea de Colostro.	38
Quadro 01 – Estudos que evidenciaram a relação entre a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro/leite materno humano com a colonização da microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termos nos primeiros dias de vida, 2023.	41-42
Quadro 2 – Critérios estabelecidos para parâmetros normais em neonatos.	44-45
Quadro 3 - Covariáveis maternas a serem pesquisadas.	51-52
Quadro 4 - Covariáveis do recém-nascido a serem pesquisadas.	52-53
Figura 3 – Fluxograma da pesquisa, 2023.	57
Artigo 1	
Figura 1 – Algoritmo do protocolo de coleta de amostras fecais, acondicionamento, transporte e armazenamento para extração do material genético.	65
Quadro 1 – Recomendações de cada etapa do fluxograma do protocolo, Feira de Santana, 2021.	67-68
Artigo 2	
Figura 1 - Índices de Diversidade <i>Chao 1</i> , <i>Shannon</i> e <i>Simpson</i> na primeira semana de vida de recém-nascidos pré-termos.	84

Figura 2 - Análise de coordenadas principais beta diversidade, comparações ao longo da primeira semana T0 e T1, e quanto ao uso de antibiótico, 2023.	85
Figura 3 - Abundância Relativa quanto ao gênero bacteriano na amostra de fezes de recém-nascidos pré-termos ao longo do tempo.	87
Artigo 3	
Figura 1 - Índices de Diversidade <i>Chao 1</i> , <i>Shannon</i> e <i>Simpson</i> na primeira semana de vida de recém-nascidos pré-termos que realizaram a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.	105
Figura 2 - Análise de coordenadas principais beta diversidade, comparações ao longo da primeira semana, de recém-nascidos pré-termos que realizaram a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.	106
Figura 3 - Abundância Relativa quanto ao gênero bacteriano na amostra de fezes de recém-nascidos pré-termos que fizeram a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.	108

LISTA DE TABELAS

Artigo 2

Tabela 1 - Estatística descritiva de mães de recém-nascidos pré-termos na primeira semana de vida, 2023. 80-81

Tabela 2 - Estatística descritiva de recém-nascidos pré-termos na primeira semana de vida, 2023. 82-83

Tabela 3 - Composição e Variações Taxonômicas de amostras ao nível de gênero e suas abundâncias relativas ao longo do tempo. 86

Artigo 3

Tabela 1 - Características de mães de recém-nascidos pré-termos em uso de Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023. 102-103

Tabela 2 - Características de recém-nascidos pré-termos em uso de Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023. 103-104

Tabela 3 - Índices de Diversidade *Chao1*, *Shannon* e *Simpson* na primeira semana de vida de recém-nascidos pré-termos que realizaram a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023. 105

Tabela 4 - Composição e Variações Taxonômicas de amostras ao nível de gênero e suas abundâncias relativas ao longo do tempo em recém-nascido pré-termos que fizeram uso de Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023. 107

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

ASVs - *Amplicon Sequencing Variant*

BA - Bahia

BLH - Banco de Leite Humano

BPN - Baixo Peso ao Nascer

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNS - Conselho Nacional de Saúde

CO - Monóxido de Carbono

CONSORT - *Consolidated Standards of Reporting Trials*

DCNT - Doenças Crônicas não Transmissíveis

DM - Diabetes *mellitus*

DRC - Doença Renal Crônica

DSS - Determinantes Sociais em Saúde

EBP - Extremo Baixo Peso

EPI - Equipamentos de Proteção Individual

GEE - *Generalized Estimating Equations*

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica

HEC - Hospital Estadual da Criança

HIPS - Hospital Inácia Pinto dos Santos

HMO - Human Milk Oligosaccharides

HPIV - Hemorragia Peri-intraventricular

IL - Interleucinas

IOC - Imunoterapia Orofaríngea de Colostro

IRPM - Incursões Respiratórias Por Minuto

IST - Infecções Sexualmente Transmissíveis

LAPEM - Laboratórios de Pesquisa em Microbiologia

MBP - Muito Baixo Peso

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NEC - Enterocolite Necrosante

NPT - Nutrição Parenteral Total

NUPES - Núcleo de Pesquisa e Extensão em Saúde

O₃ - Monóxido de Ozônio
OMS - Organização Mundial de Saúde
OLH – Oligossacarídeos do Leite Humano
OTU - Unidades Operacionais Taxonômicas
PCA - Persistência do Canal Arterial
PCoA - Análise de Coordenadas Principais
PIG - Pequeno para Idade Gestacional
QIC - *Independence Criterion*
REBEC - Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
RN - Recém-nascido
RNPT - Recém-nascido Pré-termo
SO₂ - Dióxido de Enxofre
SUS - Sistema Único de Saúde
T0 - Primeira Amostra Coletada
T1 - Amostra Coletada ao 7º dia de Vida
TALE - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1 - Helper 1
Th2 -Helper 2
TORCHS - Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes Simples, Sífilis
UCIN - Unidade de Cuidados Intensivos
UCINCA - Unidade de Cuidado Intermediário Canguru
UCINCO - Unidade de Cuidado Intermediário Convencional
UEFS - Universidade Estadual de Feira de Santana
USIN - Semi-Intensiva Neonatal
USP - Universidade de São Paulo
UTIN - Unidades de Terapia Intensiva
UTN - Número de Julgamento Universal
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 A prematuridade	21
3.1.1 Determinantes proximais da prematuridade	22
3.1.2 Determinantes intermediários da prematuridade	25
3.1.3 Determinantes distais da prematuridade	27
3.2 Leite Humano e os Aspectos Imunológicos do Colostro	29
3.3 Microbiota Intestinal e Metagenômica	33
3.4 Modelo Teórico para Investigação	37
3.5 A Imunoterapia Orofaríngea de Colostro na modulação da microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termos	39
4 METODOLOGIA	43
4.1 Desenho do estudo	43
4.2 Local do estudo	43
4.3 Amostra/ Amostragem	44
4.3.1 Intervenção	46
4.3.2 Controle	47
4.4 Coleta de dados	47
4.4.1 Coleta de dados de prontuários	47
4.4.2 Protocolo de coleta das amostras fecais	48
4.5 Variáveis	50
4.5.1 Variável quase-experimental (exposição)	50
4.5.2 Variável de controle da exposição	50
4.5.3 Variável desfecho	51
4.5.4 Covariáveis	51
4.6 Análise dos dados	53
4.7 Extração do DNA metagenômico e sequenciamento	54
4.7.1 Amplificação do domínio V4 do gene 16S rRNA	54
4.7.2 Análise da microbiota por ferramentas de bioinformática	55
4.8 Aspectos Éticos	56

5 RESULTADOS	57
5.1 Artigo 1 - protocolo para coleta, acondicionamento e transporte de amostras fecais de recém-nascidos pré-termos	
5.2 Artigo 2 - evolução da microbiota intestinal na primeira semana de vida de recém-nascidos pré-termos	74
5.3 Artigo 3 - efeito da imunoterapia orofaríngea de colostro na microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termos	95
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
REFERÊNCIAS	121
ANEXO A – Carta de Anuência dos Pesquisadores	134
ANEXO B – Carta Resposta Aceite do HIPS	135
ANEXO C – Carta de Encaminhamento ao HIPS	136
ANEXO D – Carta de aprovação de projeto – CNPQ	137
ANEXO E – Carta de Anuência do Departamento de Biologia da UEFS	138
ANEXO F - Protocolo de treinamento HIPS	139
ANEXO G - Protocolo de treinamento HEC	140
ANEXO H - Declaração de colostroterapia HIPS	141
ANEXO I - Declaração de não colostroterapia HEC	142
ANEXO J - Declaração de prescrição de uso de leite materno – HEC	143
ANEXO K - Solicitação de exames HIPS	144
ANEXO L - Solicitação de exames HEC	145
ANEXO M - Carta de Encaminhamento ao HEC	146
ANEXO N - Carta Resposta Aceite do HEC	147
ANEXO O – Declaração de Comprometimento Pesquisadora Responsável	148
APÊNDICE A – TCLE (intervenção) para mãe	149
APÊNDICE B – TCLE (intervenção) para o responsável legal	151
APÊNDICE C – TCLE (intervenção) para mãe Adolescente	153
APÊNDICE D - TCLE (controle) para Mãe	155
APÊNDICE E - TCLE (controle) para o responsável legal	157
APÊNDICE F - TCLE (controle) para a mãe adolescente	159
APÊNDICE G – Questionário – primeira parte	161
APÊNDICE H - Formulário – segunda parte	165
APÊNDICE I – Protocolo do Fluxo de coleta de dados HIPS	171
APÊNDICE J – Protocolo do Fluxo de coleta de dados HEC	175
APÊNDICE K - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	177

1 INTRODUÇÃO

O microbioma é representado pela coleção de genes da microbiota, que tem a capacidade de interagir com o genoma dos indivíduos que o habitam. Já a microbiota, é um conceito dado as comunidades de microrganismos que habitam ecossistemas constituídos por bactérias, fungos, vírus e protozoários (AHEARN-FORD; BERRINGTON; STEWART, 2022).

A microbiota mais estudada atualmente é a do intestino. As bactérias que o habitam são de composição variável, podendo ser comensais ou simbiotes (benéficas ao desenvolvimento saudável) ou patobiontes (ocasionando patologias ao hospedeiro) (BLASER, 2017). A microbiota intestinal é uma entidade complexa, que pode ser modulada por fatores endógenos (antecedentes genéticos e imunológicos) e/ou exógenos (ambiente, dieta, uso de antibióticos e tipo de parto); cuja colonização inicia-se em ambiente intrauterino, e tem característica progressiva e dinâmica nos primeiros anos de vida até a estabilização na vida adulta (WERNROTH et al., 2022).

Dentre os fatores de modulação exógenos, destaca-se o tipo de alimentação, pela importância na modulação da comunidade bacteriana intestinal (WERNROTH et al., 2022). A exposição do recém-nascido ao leite materno, precocemente, pode ser importante para a formação de uma microbiota constituída por bactérias comensais (GREGORY et al., 2016), que é fundamental para os Recém-Nascidos Pré-termo (RNPT), sobretudo os de Muito Baixo Peso e Extremo Baixo Peso (MBP/EBP) ($\leq 1.500\text{g}$), para os quais as questões nutricionais, a exemplo do início precoce da alimentação trófica, é importante para a nutrição e sobrevivência (UNDERWOOD, 2013; MILANI et al., 2017; AZAD et al., 2016).

No ano de 2021, o Brasil registrou 288.909 casos de Recém-Nascidos (RN) pré-terms, desses, 81.237 nascimentos ocorreram na Região Nordeste do país (BRASIL, 2022). Os RNPTs, diante de sua imaturidade fisiológica, imunológica e das condições clínicas de gravidade, frequentemente apresentam retardo no início da alimentação trófica, sendo exposto tardiamente ao leite materno e suas propriedades benéficas. Neste aspecto, a administração do colostro, como terapia imunológica, por meio do protocolo de Imunoterapia Orofaríngea de Colostro (IOC), pode ser uma estratégia viável para proporcionar a essa população os benefícios imunológicos do colostro e favorecer a maturação gastrointestinal (GAROFALO, 2019; DA CRUZ MARTINS et al., 2020). O

uso do protocolo de IOC é recomendado pelo Ministério da Saúde no Manual de Atenção Humanizada ao RNPT: método canguru (BRASIL, 2017).

O colostro, produto de lactação secretado até o 5º dia após o parto, por conter elevado teor de peptídeos antimicrobianos atuam na prevenção de desordens gastrointestinais, assim como, promove a maturação do intestino. Após esse período o leite continua sendo imunologicamente enriquecido (TUDEHOPE, 2013). Além disso, o colostro de mães de RNPT, difere da mãe a termo, por possuir maior quantidade de proteínas, gorduras e aminoácidos, e maior ação probiótica, fator que pode prevenir a disbiose intestinal do neonato, reduzindo assim, risco de infecções intestinais, um dos principais contribuintes para a morbimortalidade neonatal (GRANGER et al., 2020; KIJNER, KOLODNY, YASSOUR et al., 2022).

O uso do colostro como terapia imunológica tem sido evidenciado em estudos, por representar um importante modulador precoce de uma microbiota saudável (MARTÍN-ÁLVAREZ et al., 2020; DA CRUZ MARTINS et al., 2020), pelos seus substratos energéticos, pelos compostos prebióticos (como os Oligossacarídeos do Leite Humano conhecidos como "Human Milk Oligosaccharides" - HMOs, na sigla em inglês ou OLH em português) e pela presença de comunidades de microrganismos lácticos bacterianos que promovem função probiótica no intestino da criança, tendo como gêneros mais comuns encontrados: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, dentre outros (PLAZA DIAS, 2018).

O reconhecimento das espécies bacterianas benéficas ao ser humano é de suma importância para a saúde. No entanto, a dificuldade de cultura *in vitro* para diversos tipos de comunidades bacterianas é uma limitação para o seu estudo. Nos últimos anos, o sequenciamento do DNA, por meio das análises dos seus genes coletivos (metagenoma) vem sendo considerado o melhor método de identificação (CHO; BLASER, 2012).

A análise metagenômica evidencia o material genético de uma comunidade de microrganismos independente das técnicas de cultivo individuais das mesmas. Essa técnica é considerada inovadora pois representa a nova geração de identificação do DNA, de diferentes origens como das bactérias presentes no intestino (DEVI et al., 2015). Por meio dessa análise, pode-se revelar a estrutura da comunidade e a variação da microbiota de maneira rápida e eficiente, garantindo a identificação com qualidade das espécies presentes no intestino, permitindo um alto rendimento de identificação da ecologia intestinal, envolvida nos mecanismos fisiopatológicos de afecções, como: obesidade,

doenças cardiovasculares, asma, alergias, dentre outras (DEVI et al., 2015; BRUGÈRE et al., 2009; MANDAL; SAHA; DAS, 2015; CHO; BLASER, 2012).

A realização desta pesquisa é inovadora por ser o primeiro que se propõe a estudar a evolução da microbiota intestinal de RNPT de MBP, além de possuir poucos estudos longitudinais, que foram conduzidos com avaliação do efeito da IOC na microbiota intestinal do RNPT na primeira semana de vida. Diante disso, essa investigação assume como questão norteadora: como se dá o estabelecimento da microbiota intestinal de prematuros, tratados ou não com a IOC, atendidos no SUS?

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar, por meio da análise do DNA metagenômico, o estabelecimento da microbiota intestinal em RNPT, tratados ou não com a IOC, atendidos no SUS no município de Feira de Santana / BA.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever o desenvolvimento de protocolo e testar um algoritmo da sequência de ações e procedimentos de coleta, acondicionamento, transporte e armazenamento de amostras fecais de RNPT internados em UTIN;
- Avaliar a evolução da microbiota intestinal na primeira semana de vida de RNPT, atendidos em hospital público;
- Avaliar o efeito da administração da IOC no desenvolvimento da microbiota intestinal de RNPT, atendidos em hospital público.

3 REVISÃO DE LITERATURA

No sentido de obter as informações para discutir acertadamente o conhecimento sobre a colonização intestinal de RNPT tratados ou não com a IOC, fez-se necessário ampliar os estudos por meio de uma revisão de literatura que foi subdividida nas seguintes seções: A Prematuridade e seus determinantes; Microbiota Intestinal e Metagenômica; Leite humano e os Aspectos Imunológicos do Colostro; A Imunoterapia Orofaríngea de Colostro na modulação da microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termo e Modelo Teórico para Investigação.

3.1 A prematuridade

O termo prematuridade é definido segundo a Organização Mundial de Saúde quando a gestação termina entre a 20^a e a 37^a semanas ou entre 140 e 257 dias após o primeiro dia da última menstruação (ALMEIDA et al., 2013; VICTORA et al., 2013); podendo ainda, ser classificado de acordo à idade gestacional, como: prematuro extremo (<28 semanas), prematuro moderado (28 a <32 semanas) e prematuro moderado a tardio (32 a <37 semanas) (WHO, 2014); ou, quanto ao peso de nascimento (independentemente da idade gestacional), assim bebês com menos de 2.000 g são denominados como baixo peso, com menos de 1.500 g MBP e aqueles com peso inferior a 1.000 g EBP (ALMEIDA et al., 2013).

Estima-se que no mundo mais de 15 milhões de crianças nascem antes das 37 semanas gestacionais, em torno de 1 a cada 15 neonatos. No ano de 2021, o Brasil registrou cerca de 288.909 nascimentos precoces, ocupando o décimo lugar no *ranking* mundial, o dobro do índice quando comparados ao de países europeus, já na América Latina ocupa o terceiro lugar no *ranking*. As complicações da prematuridade são consideradas a causa principal dos óbitos neonatais no ano de 2021, a Secretaria Municipal de Saúde de Feira de Santana (BA) registrou o nascimento de 130 RNPT de baixo peso, com mortalidade precoce (0 a 6 dias) de 62 neonatos por ano (WHO, 2022, BRASIL, 2022).

O nascimento prematuro apresenta-se como um fator de risco para o desenvolvimento motor; e, frequentemente encontra-se associado a problemas neonatais como: Hemorragia Peri-intraventricular (HPIV) (FELICE et al., 2010; HENTGES et al., 2010), hipóxia (FELICE et al., 2010), intercorrências neurológicas/falhas do fechamento

da tubo neural – anencefalia, encefalocele e espinha bífida (mielocele e mielomeningocele) (FELICE et al., 2010; HENTGES et al., 2010), apneia, hidrocefalia, leucomalácia periventricular, hiperbilirrubinemia (HENTGES et al., 2010), alterações oftálmicas (como estrabismo, erros de refração ou retinopatias), atraso de desenvolvimento no sistema oral, motor e cognitivo (CARLINO, LAMÔNICA, ALVARENGA, 2010) e pressão arterial sistólica elevada (JOHANSSON et al., 2005B).

Sendo a prematuridade um fator de risco para uma série de complicações à vida dessas crianças, é necessário que haja organização e planejamento para a prestação de serviços especializados na rede do SUS. Dessa maneira, contar com unidades equipadas e equipes capacitadas garantem ao neonato monitoramento e intervenção cuidadosa desde o nascimento até a internação nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN).

O próprio conceito de promoção à saúde e prevenção de sequelas da prematuridade é um desafio dentro do SUS, quando ainda coexistem visões e práticas que reforçam uma ideia fragmentada da saúde, em detrimento de uma visão integral da mesma, e, por consequência, isso se reflete em suas ações e em seus serviços (SARRETA, 2009). A relação causal entre os fatores de risco ainda não é completamente compreendida, dessa maneira, a literatura tem proposto modelos teóricos na tentativa de elucidar a conexão dos diversos contribuintes e determinantes de diversas ordens (LIMA, CARVALHO, VASCONCELOS, 2008; RODRIGUES, MELLO, SILVA, 2011).

Buscando o aprofundamento das discussões acerca dessa temática, optou-se pelo modelo teórico proposto por Rocha e colaboradores (2022), que apresenta as principais variáveis descritas na literatura relacionadas ao nascimento prematuro, bem como as possíveis relações e inter-relações, classificando-as em níveis hierárquicos: proximais, intermediários e distais (ROCHA, FALCÃO, TEIXEIRA et al., 2022).

3.1.1 Determinantes proximais da prematuridade

Conceitua-se determinantes proximais da prematuridade, a relação entre os fatores de risco que estão relacionados diretamente à mãe e ao feto (ROCHA, FALCÃO, TEIXEIRA et al., 2022). No modelo estudado, como fatores proximais, são destacados os fatores ligados ao biológico materno, ao feto e ao ambiente.

No que tange aos principais fatores predisponentes maternos pode-se destacar, a idade materna jovem ou avançada. Mães adolescentes apresentam elevado risco de ter um parto prematuro em decorrência da imaturidade biológica, do colo uterino não maduro e

do baixo aporte sanguíneo necessário para sustentar uma gestação, comprometendo o suprimento nutricional de ambos. Além da relação com o fator biológico, a gestação na adolescência pode ter efeitos na prematuridade quando associadas a questões de ordem psicológica e ou socioeconômicas (AMORIM et al., 2009; AZAD et al., 2016; ROCHA, FALCÃO, TEIXEIRA et al., 2022). Já, as mães, maiores de 35 anos, os fatores de relação com a prematuridade estão associados às condições de adoecimentos crônicos pré-existentes como a Diabetes Mellitus, a Hipertensão Arterial Sistêmica, pré-eclâmpsia, dentre outros (LUDFORD et al., 2012; POALELUNGI et al., 2018).

A gestação também pode ser influenciada pelo estado nutricional da mãe como excesso de peso e a desnutrição, destacados na literatura com diferentes mecanismos fisiopatológicos. A desnutrição afeta as concentrações de vitaminas, aminoácidos e minerais (como o ácido fólico), e por consequência torna o organismo vulnerável a infecções, além disso, a deficiência nutricional acarreta na redução do fluxo sanguíneo ideal para manutenção da gestação. Já o excesso de peso (sobrepeso e a obesidade), podem ocasionar o parto prematuro, pelas condições citadas anteriormente como as Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) anterior a gravidez (POALELUNGI et al., 2018). Além disso, fatores relacionados ao hábito alimentar e de vida como elevada ingestão de cafeína, e/ou, álcool também se relacionam com nascimento prematuro (HENTGES et al., 2010)

As DCNT maternas se relacionam a complicações gestacionais, entretanto a literatura aponta uma relação bidirecional entre esses fatores, resultando em um ciclo vicioso. As mulheres que possuem patologias crônicas prévias possuem maior risco de terem um parto precoce, assim como RNPT possuem maior risco de ter DCNT na vida adulta, e se for mulher, de ter um parto prematuro. Dessa forma, essa condição exige atenção aos cuidados pré-natais, evitando possíveis complicações futuras (ROCHA et al., 2022).

A deficiência nutricional pode ser acentuada quando ocorre um intervalo curto entre as gestações, não havendo tempo para o organismo materno se recuperar e recompor as reservas energéticas necessárias para completar a gestação seguinte, tornando-a despreparada biologicamente para engravidar novamente. Essa hipótese, se justifica pela deficiência de folato (dentre outros), podendo ocasionar anemia e comprometendo a formação adequada do tubo neural do feto, acarretando malformações congênitas (PIMENTEL et al, 2020; KEATS et al., 2019).

O estado de peso se relaciona também com os fatores raciais maternos descritos como possíveis predisponentes. A etnia (raça afrodescendentes, aborígenes e hispânicas) da mãe se inter-relaciona com a prematuridade, pela relação com fatores modificáveis como o elevado estado de peso. Assim, mulheres negras possuem maior probabilidade de terem sobrepeso e obesidade, e dessa maneira aumenta possibilidade de terem um parto prematuro. Outros fatores modificáveis também são citados como pré-natal inadequado e elevado nível de estresse (MURPHY, 2007).

Na atual conjuntura mundial, observa-se principalmente em países com níveis socioeconômicos médio e alto, o maior acesso a reprodução assistida, com implantação de embriões fecundados, aumentando a estatística da proporção de gestações múltiplas, apontado na literatura como risco para o parto prematuro. Dessa forma, múltiplas gestações, podem ocasionar hiperdistensão do útero e ruptura prévia da membrana, e, como consequência o parto espontâneo (SUNDERAM et al., 2017).

A infecção materna é outro importante determinante relacionado ao nascimento precoce e é considerada uma causa evitável, pode-se destacar as infecções: urinárias; intrauterinas e sistêmicas. Os mecanismos fisiológicos que justificam esse fato estão na ativação do sistema imunológico e da estimulação precoce da contração uterina, podendo induzir a ruptura da membrana, entretanto não é claro se a infecção é causa ou consequência deste rompimento (ROMERO, DAY, FISHER, 2014). A infecções maternas resistentes e recorrentes se relacionam a prematuridade, desenvolvendo uma história de parto prematuro, com tendência à reincidência (AZAD et al., 2016).

Fatores relacionados ao aparelho genital feminino, alterações placentárias (placenta prévia e descolamento prematuro), excesso de líquido amniótico (VICTORA et al., 2013; WHO, 2014), descolamento da placenta, assim como histórico de abortos, condição de Pequeno para Idade Gestacional (PIG) e o enfraquecimento da parede uterina em decorrência do manejo cirúrgico do parto cesariano, também podem se relacionar a prematuridade (MALACOVA et al., 2018).

Ainda ligado aos determinantes maternos, a literatura aponta a predisposição do traço genético para o parto precoce, alicerçados em partos prematuros em mulheres que foram prematuras, aumentando a relação de risco entre mães e filhas (ROCHA et al., 2022). Além disso, fatores genéticos também são evidenciados como os polimorfismos (fator VII e XIII) dos genes TNF- α que possuem relação com essa condição (AZAD et al., 2016).

Além dos fatores maternos, evidencia-se também os predisponentes ligados ao feto como o sexo masculino e malformação congênita. Estudos têm apontado que gravidez com feto masculino está relacionado ao elevado risco de complicações obstétricas e incidência do parto precoce. A possível explicação estaria no maior ganho de peso nesses casos, quando comparados às mães portadoras de fetos femininos (AL-QARAGHOULI, FANG, 2017; ROCHA et al., 2022).

Aponta-se que a má formação congênita como outros predisponentes causais, podem induzir anomalias e interferir na gestação independentemente da idade gestacional. Entretanto, essa relação não é totalmente conhecida, uma vez que há um compartilhamento de fatores multidirecionais na causação dessa condição, como por exemplo: fatores socioeconômicos, culturais, sociais, comportamentais, dentre outros (KELKAY et al., 2019).

Os fatores ambientais também podem se relacionar com a prematuridade. O contato com a poluição do ar atmosférico e seus poluentes como: Móxido de Carbono (CO), Dióxido de Enxofre (SO₂), dentre outros, podem induzir a ruptura da membrana, o estado de inflamação do útero, além disso, a exposição ao Monóxido de Ozônio (O₃), pode ser responsável por desencadear uma resposta inflamatória que contribui para o parto prematuro (CHEN et al., 2018). Outros fatores ambientais são citados em outros estudos como: as Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), infecções periodontais e hábitos comportamentais respaldadas pelo ambiente/social (uso de substâncias tóxicas/ilícitas) (AZAD et al., 2016; WHO, 2014).

Embora não esteja descrito no modelo de Rocha e colaboradores (2022), pode-se também relacionar os fatores paternos como possíveis determinantes no nascimento prematuro, quando este possui idade avançada. Embora os mecanismos fisiológicos não sejam claros, estudos mostraram forte associação da maior idade com parto abaixo das 32 semanas gestacionais (ASTOLFI, DE PASQUALE, ZONTA, 2006; ZHU, MADSEN, VESTERGAARD, 2005; AZAD et al., 2016).

3.1.2 Determinantes intermediários da prematuridade

Os determinantes considerados intermediários, são aqueles que não possuem uma relação diretamente ligada a ocorrência da interrupção precoce da gestação, porém são relevantes, a saber: a saúde psicológica da mãe, comportamentos inadequados (de risco),

e a acessibilidade aos serviços de saúde para manutenção da gestação (ROCHA et al., 2022).

A instabilidade emocional provocada pela gestação pode ocasionar vulnerabilidades psicológicas, como elevação dos níveis de estresse materno e como consequência desenvolvimento de depressão e ansiedade. Dentre as causas da instabilidade estão: a rede de apoio fraca ou inexistente, incertezas sobre o futuro (relacionados às questões financeiras), dentre outras. Essas demandas emocionais podem contribuir para uma pior condição psicológica da mãe (MERKLINGER-GRUCHALA, KAPISZEWSKA, 2019).

Além disso, as próprias mudanças corporais e hormonais, em decorrência da própria gestação podem trazer insegurança, como a auto aceitação do corpo, além do aguçamento das emoções. Esses determinantes psicológicos podem ser responsáveis pelo resultado da gestação, sejam eles por vias comportamentais ou fisiológicos (ROCHA et al., 2022).

Estudos apontam que a exposição à ansiedade e depressão durante a gestação podem elevar as concentrações do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e de citocinas que aumentam o estado inflamatório sistêmico, elevando o risco do nascimento prematuro. Isso ocorre, devida a desregulação da via eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical, ocasionando em liberações de cortisol na corrente sanguínea, interferindo assim no funcionamento do sistema imune, tornando essa mãe mais vulnerável a infecções (AL-QARAGHOULI, FANG, 2017; ROCHA et al., 2022).

Além disso, fatores ligados ao comportamento e hábitos de vida também podem interferir no andamento da gestação, como já citado anteriormente, o tabagismo, uso de drogas e álcool. Esses hábitos podem ser intensificados e reforçados por uma má condição psicológica da mãe. Estudos apontam que a nicotina está relacionada a uma resposta pró inflamatória, assim como o consumo de álcool se relaciona com a elevação da secreção de prostaglandinas, responsáveis pelas contrações uterinas. O uso dessas substâncias tóxicas e outras (cocaína e heroína), podem desencadear uma intoxicação do feto, comprometendo o seu correto desenvolvimento (KELKAY et al., 2019; ROCHA et al., 2022).

Outros fatores podem se relacionar com o desenvolvimento adequado da gestação como a assistência pré-natal. Esses determinantes também se relacionam com as condições socioeconômicas e de escolaridade maternas, assim, mães que possuem baixa escolaridade e baixa renda estão mais susceptíveis a essas condições. Evidenciando que

embora tenham ampliado aumento da cobertura de assistência às gestantes, ainda ocorre de maneira inadequada. Reforçando que a realização do acompanhamento de qualidade do pré-natal pode ter uma robusta influência na ocorrência do nascimento precoce (DOMINGUES et al., 2015).

3.1.3 Determinantes distais da prematuridade

No modelo apresentado por Rocha e colaboradores (2022), os determinantes distais são representados pelos fatores socioeconômicos e demográficos. As teorias interpretativas do processo saúde-doença refletem no desenvolvimento do próprio pensamento humano e na interpretação dos fatores sociais. O modelo de surgimento da doença como ação de múltiplos fatores relacionados ao sujeito, ao meio ambiente e ao agente causador não dá conta de explicar esses agravos em saúde, uma vez que o Brasil é um país com profundas desigualdades sociais (ALMEIDA FILHO, 2004).

A causa da determinação da doença pressupõe e engloba uma dialética entre dois fenômenos: a causa imediata e o lugar que o indivíduo ocupa na sociedade, ou seja, a vivência social das diferenças biológicas (BARATA, 1997). Nessa perspectiva, a epidemiologia social rompe com o reducionismo biológico e incorpora o materialismo dialético como marco teórico para compreender o processo de saúde doença, e, busca compreender a relação entre os determinantes que atuam no plano social e os que atuam na dimensão singular do indivíduo (SOBRAL; FREITAS, 2010).

Dessa maneira, os determinantes biológicos (biologia molecular e a microbiologia), por si só não são suficientes para explicar a causalidade das doenças e suas associações com os fatores sociais, mesmo tendo sido aprimorados o diagnóstico de patologias e de permitir a identificação de associações (ALMEIDA FILHO et al., 1998).

Nesse sentido, para se compreender a prematuridade e o processo de modulação da sua microbiota intestinal, além de suas consequências, como estar envolvido na patogênese de doenças imunológicas, cardiovasculares e metabólicas (HARRIS et al., 2012), é necessário e relevante a compreensão dos aspectos socioeconômicos e biológicos maternos como determinantes sociais para compreensão da prematuridade.

Os elementos estruturantes sociais são usados como prováveis causas para ampliar o conhecimento sobre os determinantes sociais. Esses fatores são considerados Determinantes Sociais em Saúde (DSS), que pelo modelo de Dahlgren e Whitehead (1991), estão organizados em camadas, e partem do nível micro com determinantes

relacionados ao biológico/indivíduo, para o macro determinantes sociais, conforme figura 1. Assim, os determinantes podem ser compreendidos como fatores sociais, econômicos, culturais, étnicos/ raciais, dentre outros, que influenciam a população exposta (BUSS; PELLEGRINI FILHO, 2007).

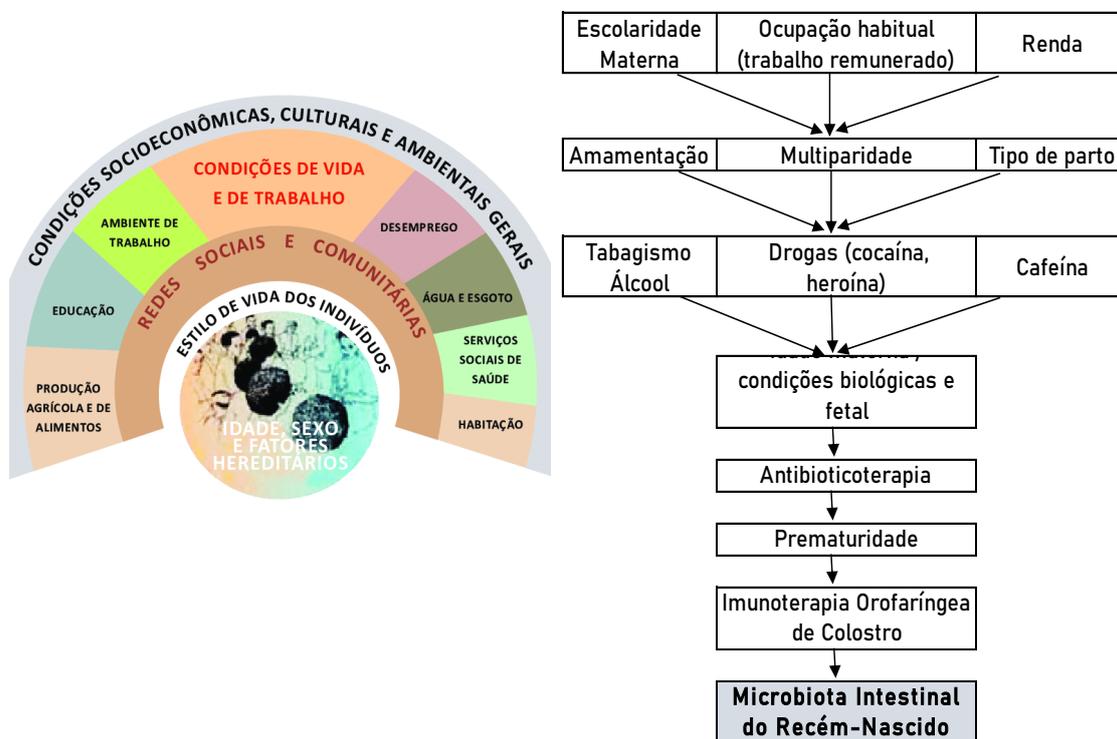


Figura 1 – Modelo de determinação social da saúde baseado em Dahlgren e Whitehead (1991), com a Distribuição dos fatores do estudo no esquema hierárquico proposto.

Nesse esquema representativo é possível organizar as variáveis em um modelo hierárquico multinível como proposta plausível na explicação e caracterização do perfil de morbidade dos RNPT. Pode-se observar que embora sejam considerados distais, a condição socioeconômica são grandes responsáveis pelas diferenças ao acesso de saúde (ROCHA et al., 2022).

A desigualdade econômica pode expor o indivíduo a estressores psicossociais como: pobreza, falta de moradia, residência em bairros perigosos, violência doméstica, falta de saneamento básico, dentre outros, além de impactar nas jornadas de trabalho. Dessa maneira, elevadas jornadas de trabalho com maior vigor físico durante o período gestacional pode resultar em eventos adversos ao nascimento, como a prematuridade (SADOVSKY et al., 2018).

Dentre os determinantes mais importantes, abordados nessa dimensão, destaca-se a renda familiar, por estar intimamente relacionada às desigualdades em saúde. Essas diferenças podem determinar a natureza laboral, o acesso aos serviços de saúde e ao tipo de alimentação. Dessa maneira, a renda determina um padrão de vida e as oportunidades que essas pessoas irão ter (CAI et al., 2019).

Além da renda, o nível de escolaridade entre as mulheres possui grande impacto na prematuridade. Estudos mostram que mães que possuem alto nível educacional, têm maior probabilidade de acesso a melhores posições de trabalho, maior renda, e como consequência maior procura pelos serviços de saúde (pela compreensão da sua importância), além de maior poder aquisitivo para adquirir alimentos de melhor qualidade. Dessa forma, o alto nível educacional se relacionava com a redução de comportamentos de risco como uso de substâncias tóxicas, comportamentos sedentários, dentre outros (CAI et al., 2019; ROCHA et al., 2022).

As relações conjugais maternas, e alta rotatividade de parceiros, também podem trazer consequências na gestação. Mães que possuem companheiros, apoio emocional, e segurança financeira estão menos expostas aos fatores de risco (ROCHA et al., 2022). A habitação é outro determinante associado aos desfechos negativos nesse período, moradias com exposição à umidade/mofo, aglomeração de pessoas por cômodo (alta ocorrência de infecções respiratórias), a falta de saneamento, moradias em locais perigosos (barragens e encostas), também podem gerar impactos na duração da gestação (HARVILLE, RABITO, 2018).

O local de moradia, é um fator determinado pelo poder aquisitivo e estipula o nível de vizinhança, além da alta violência local (como invasões e favelas). Todos esses fatores contribuem para a insegurança, aumentando o estresse e por consequência ansiedade e depressão, sugerindo efeitos indiretos no risco de nascimentos prematuros (MERKLINGER-GRUCHALA, KAPISZEWSKA, 2019).

Diante do exposto, é possível verificar que a prematuridade é um fenômeno multicausal, que envolve várias relações diretas, indiretas e multidirecionais complexas, que não podem ser totalmente elucidados em um único modelo.

3.2 Leite humano e os Aspectos Imunológicos do Coloostro

O leite materno é um fluido biológico, complexo, rico em nutrientes e componentes bioativos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento saudável do

RN. Considerado padrão ouro, possui componentes benéficos ao desenvolvimento do neonato, como carboidratos, proteínas, imunoglobulinas, oligossacarídeos, e também bactérias (FROST et al., 2014; WANG et al., 2015). Dentre seus componentes imunobiológicos, contém vários fatores antimicrobianos e mediadores de ativação imunológica, que melhoram as deficiências imune, a instabilidade clínica do prematuro (SEIGEL et al., 2013; HURLEY, THEIL, 2011) e influenciam a composição da microbiota do RN, atuando como probiótico (NOVAK et al., 2001).

A composição do leite humano sofre variações nas duas primeiras semanas de lactação, tornando-se constante à medida que a prática vai se estabelecendo; até o 5º dia de vida ele é denominado colostro, do 8º até o 10º leite de transição e a partir de então leite maduro (RIBEIRO et al., 2007; AAP, 1997).

O colostro é rico em vitaminas lipossolúveis (RIBEIRO et al., 2007), apresenta vários fatores imunes, como: lisozimas, imunoglobulinas e citocinas, que conferem proteção imunológica; e, em alguns momentos, com concentrações mais elevadas do que o leite maduro (SEIGEL et al., 2013; KIJNER et al, 2022). Ademais, a alimentação trófica precoce com o colostro é rica em peptídeos antimicrobianos que atuam no tratamento de distúrbios gastrointestinais e promove a maturação do intestino (TUDEHOPE, 2013; KIJNER et al, 2022).

A composição do leite humano é complexa e dinâmica podendo ser subdividida em três partes. A maior dela é composta por água, seguida pelos macros e micronutrientes (responsáveis pela nutrição infantil, como lipídios, lactose e proteínas), e a terceira parte composta por componentes imunomoduladores como os oligossacarídeos (OLH's) e os probióticos que estão ligados diretamente aos aspectos imunológicos do leite humano (RAY et al., 2019).

Os OLH's são glicanos complexos, solúveis presentes abundantemente no leite materno, e, embora apresentem diferentes tipos e funções, possuem um projeto estrutural básico, sintetizadas a partir de 5 monossacarídeos básicos: galactose, glicose, N-acetilglucosamina, fucose e o ácido siálico, que não são digeridos pelo trato gastrointestinal (DONNOVAN; COMSLOCK, 2016).

A concentração desses compostos no leite humano varia ao longo da lactação e pela idade gestacional. Estudos realizados (RAY et al., 2019; NOLAN; RIMER; GOOD, 2020), apontam que esses componentes são maiores em mães de prematuros, do que em mães a termo. Os OLH's podem atuar como prebióticos, exercendo mecanismos de defesas diretos contra patógenos, como moléculas sinalizadoras, anti-inflamatórias e

imunomoduladores, além de servir como nutrientes para o desenvolvimento neurológico do neonato (RAY et al., 2019).

Na função de prebióticos, os OLH's chegam ao intestino com integridade estrutural, servindo como fonte de carbono para bactérias comensais e adaptadas ao muco como as Bifidobactérias. Essas reações produzem ácido graxos de cadeia curta, e, além de não permitir o crescimento de bactérias nocivas, podem ativar o sistema imunológico, aumentar o recrutamento de células pró-inflamatórias, desempenhando papel importante na inflamação intestinal (YANG, 2015; MILANI et al, 2017).

Além da função prebiótica, elas constituem o sistema imunológico inato do RN, uma vez que, previnem a ligação de patógenos, proporcionando vantagem competitiva aos comensais. Assim, demonstram alta eficiência no bloqueio de lectinas (que contribuem para a virulência de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*), com redução da citotoxicidade das células epiteliais intestinais (PLAZA-DÍAZ; FONTANA; GIL, 2018; RAY et al., 2019).

A literatura aponta, além dos OLH's, outros componentes imunomoduladores como o IgA, lactoferrina, lisozima, lactaderina, fatores de crescimento, óxido nítrico, glutamina e as citocinas. O RNPT possui maior vulnerabilidade imunológica quando comparado ao RN a termo, incluindo a baixa produção de citocinas e outras proteínas imunológicas, dessa maneira, a presença desses compostos no leite materno fornece proteção passiva e modulação imune no receptor infantil (NOLAN; RIMER; GOOD, 2020).

O leite de mãe do prematuro contém baixo nível de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e fator- α de necrose de tumor), alto nível de citocinas anti-inflamatórias (anti-IL-6, IL-10 e IL-13), de imunoglobulina A, de proteínas, sódio, zinco e cálcio (TUDEHOPE, 2013; CHEN et al., 2022).

Evidências apontam que o leite materno pode promover um estado de inflamação fisiológica, responsável por manter o equilíbrio e interação entre as bactérias e o epitélio intestinal (GROER et al., 2015). A responsável pela ação protetiva do leite é dada pela composição da sua microbiota (BIAGI et al., 2017; MURPHY et al., 2017; PANNARAJ et al., 2017).

As bactérias comensais com função probiótica, também presentes no leite, compõe uma comunidade de organismos, influenciados tanto pela microbiota da mãe, quanto do leite materno, ajudando a modular a comunidade microbiana e na permeabilidade do intestino do neonato. Esses microrganismos comensais evidenciaram

capacidade de ampliar a diversidade bacteriana e reduzir a colonização por gêneros patogênicos (PATEL et al., 2013; JOHNSON et al., 2015; NOLAN; RIMER; GOOD, 2020).

Essa comunidade de bactérias probióticas sofre influência à exposição de antibióticos nas UTIN, aos quais os RNPT de MBP se encontram. O uso de antibiótico profilático de amplo espectro reduz a diversidade da microbiota, incluindo a população de *Bifidobacterium e Bacteroides*, podendo levar a disbiose intestinal (ligadas ao aumento das morbimortalidades como sepse e morte), e à resistência antimicrobiana. Dessa maneira, o tratamento com antibioticoterapia em prematuros deve ser prescrita criteriosamente (NOLAN; RIMER; GOOD, 2020).

Acredita-se que a colonização do leite materno, por meio dos probióticos, se dê pelo eixo entero-mamário, ao qual as bactérias maternas sejam propostas às células dendríticas da mucosa intestinal englobando-as e as levando por meio da circulação sanguínea até as glândulas mamárias onde são incorporadas na composição da microbiota do leite materno (FERNANDEZ et al., 2013). Ressalta-se, portanto, a importância da exposição precoce ao leite materno e ao seu microbioma específico na maior possibilidade de nutrir bactérias promotoras da saúde, e que são essenciais para a modulação imunológica para o neonato (GREGORY et al., 2016).

Dessa maneira, a dieta é evidenciada na literatura com papel dominante na nutrição e no fortalecimento imunológico do RNPT, reforçando o aleitamento materno, com um importante papel na determinação da saúde do RNPT (HURLEY; THEIL, 2011; RAY et al., 2019; NOLAN; RIMER; GOOD, 2020).

3.3 Microbiota Intestinal e Metagenômica

A microbiota gastrointestinal é um ecossistema complexo e dinâmico que consiste em várias centenas de milhares de microrganismos, principalmente bactérias. A investigação sobre a composição da microbiota teve início em 1900 (TISSIER, 1900), e era realizada por meio de cultura *in vitro*; as modernas e recentes técnicas de sequenciamento de DNA, e a sua grande capacidade para identificar as espécies bacterianas (incluindo as que não podiam ser cultivadas *in vitro*), permitiu desvelar o ecossistema gastrointestinal (GUARALDI; SALVATORI, 2012).

A microbiota é composta principalmente de microrganismos (que compartilham características evolutivas comuns), essa composição varia de acordo com a localização

anatômica, dessa maneira existem espécies comumente encontradas nas regiões do cólon ou vagina. As bactérias que constituem usualmente esses locais são: *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Escherichia*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (CHO; BLASER, 2012; GOULET, 2015).

A concentração e a composição da microbiota intestinal variam fisiologicamente ao longo do trato gastrointestinal (se adequando a acidez do meio), variam também no que diz respeito os estágios da vida (sofrendo influência de fatores externos e internos), progredindo da pouca variabilidade do RN até a colonização complexa do adulto (GUARALDI; SALVATORI, 2012).

Muitas funções são concedidas à microbiota intestinal dos seres humanos, como modulação imunológica, absorção de nutrientes, barreira protetora contra patógenos, produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas, dentre outros (JANDHYALA et al., 2015). A inter-relação entre as bactérias que compõe a microbiota e células epiteliais ou imunológicas, geram reações que possuem papel imunológico equilibrado no reconhecimento de bactérias patológicas, e, induzem a produção de interleucinas e imunoglobulinas (DONALDSON, LEE, MAZMANIAN, 2015; WALKER, 2010). Assim, a competição entre os microrganismos por receptores específicos na mucosa intestinal e as interações com o hospedeiro, garante a variabilidade de gêneros (JOST et al., 2015).

A modulação imunológica dada pela composição da microbiota possui capacidade de diminuir a incidência/prevalência de doenças atópicas, equilibrando a relação dos fenótipos de reação helper 1 (Th1) e helper 2 (Th2) com a produção de imunoglobulinas. Os linfócitos T CD4+, também chamado de auxiliar (Helper), quando ativados secretam citocinas que promovem o crescimento, diferenciação e funções de linfócitos B, macrófagos e outras células. Esses linfócitos podem ser definidos por dois tipos de citocinas que secretam: Th1 (T helper 1) e Th2 (T helper 2). As células Th1 são grandes produtoras de interferon gama (IFN-g), e são necessárias para uma resposta efetora contra patógenos intracelulares, já as Th2 secretam Interleucinas (IL), IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e possuem relação com a produção de anticorpos IgE e reações imunes contra alérgenos e helmintos (SCHOLTENS et al., 2012).

A metabolização de carboidratos realizada pela microbiota produz substratos, e esses produtos são reabsorvidos pela mucosa do intestino. Dentre os substratos produzidos, estão os Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC); acetato; lactato; butirato, dentre outros. Essas moléculas, além de terem ação anti-inflamatória, estimulam a

diferenciação das células do epitélio intestinal. As bactérias do gênero *Eubacterium*, *Roseburia* e *Bifidobacterium* estão envolvidas no metabolismo e conversão desses substratos em outros produtos, essas conversões auxiliam na regulação do pH intestinal (PLAZA-DÍAZ; FONTANA; GIL, 2018).

A função de barreira protetora é dada pela parede intestinal, que possui papel importante nesse processo, pois é composta por uma camada de muco, que possui ação contra invasão de microrganismos patogênicos. Esse muco é formado por glicoproteínas, denominadas de mucinas, que além do papel protetor, auxilia no reconhecimento de determinadas bactérias pelas células imunológicas (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015; PEREZ-CANO, 2022).

Dada essas evidências, verifica-se a importância que a composição da microbiota intestinal tem para a saúde em neonatos. A literatura atual já evidencia que a colonização intestinal do RN se inicia na vida intrauterina, pela presença de DNA bacteriano na placenta e no mecônio (COLLADO et al., 2016; AAGAARD et al., 2014), porém a abundância bacteriana é fortemente determinada pelo tipo de parto (WERNROTH et al, 2022) .

O modo de entrega pode afetar a colonização intestinal no início da vida, pois ao nascer por cesariana o neonato apresenta diferenças na sua microbiota, que passa a ser constituída por bactérias semelhantes às encontradas na pele materna, dos profissionais de saúde e do ambiente hospitalar. Na microbiota de lactentes nascidos de parto normal, esses microrganismos se assemelham à microbiota vaginal e intestinal de suas mães. Essa diferença, em um estado de vulnerabilidade imunológica, como no caso do RNPT, pode favorecer a pouca variabilidade, predominância de gêneros patológicos e por consequência conferir um ambiente disbiótico, favorável a desfechos negativos à saúde do bebê (FERRARO et al., 2019; HO et al., 2018).

Após o nascimento, outros fatores são evidenciados como relevantes na colonização intestinal. Assim, a modulação imunitária do neonato, ou seja, equilíbrio da microbiota intestinal, pela intervenção probiótica (colonização por meio de bactérias) é um processo complexo e ocorre por sucessivas etapas sob influência de fatores internos e externos (KIJNER et al, 2022).

Dessa maneira, as bactérias que inicialmente colonizam o neonato são da mãe (tipo de parto e amamentação) e ambientais (hospitalares, da equipe de saúde). Esses fatores colonizadores são agrupados em duas categorias, a saber: externos (bactérias maternas, ambiente circulante, medidas de higiene, etnia, hábitos alimentares,

antibioticoterapia, inibidores de bomba de prótons, e modo de nascimento) e internos (genética e resposta imunológica do neonato, pH da mucosa, interações, e secreções intestinais), dentre outros (FALLANI et al., 2010, ROZÉ et al., 2020).

O tipo de dieta por meio da amamentação e do leite materno possui um importante papel na colonização intestinal dos neonatos, por conter prebióticos (como os OLH's) e ser fonte de bactérias simbiotes com função probiótica (KIJNER et al, 2022). Os gêneros mais comuns identificados no leite materno são: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacteria* e *Enterococcus* (PLAZA-DÍAZ; FONTANA; GIL, 2018).

Devido a abundância de oxigênio no intestino do RN ao nascimento, os primeiros colonizadores são, predominantemente, bactérias aeróbias facultativas (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* e *Streptococcus*). Com o crescimento gradual dessa população, há a redução do oxigênio disponível (pelo consumo gradual), favorecendo a proliferação de gêneros bacterianos anaeróbios, com domínio (em um ambiente equilibrado) de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium*, superando em número as bactérias aeróbias (GUARALDI; SALVATORI, 2012).

Distúrbios na colonização inicial da microbiota, atribuídos aos fatores anteriormente citados, somados ainda às condições que o neonato pré termo está submetido como longos períodos internados em UTIN (em incubadoras), em uso de oxigenoterapia invasiva, além de outros fatores (ROZÉ et al., 2020), podem contribuir para a ocorrência de alergias alimentares, obesidade, doenças inflamatórias e doenças crônicas (RAJANI; SEPPÖ; JARVINEN, 2018). Além disso, evidências atuais apontam que padrões de colonização estão se associando com a ocorrência de Enterocolite Necrosante (NEC) e sepse tardia (SIM et al., 2023).

Evidências atuais sugerem que o estabelecimento da microbiota em RNPT possui grandes diferenças do RN a termo. Observou-se que o estabelecimento de bactérias anaeróbias como *Bifidobacterium* e *Bacteroides* é mais lenta em RNPT do que em RN a termo provavelmente justificados pelo uso de antibióticos, principalmente na primeira semana de vida, pela idade gestacional e pelo peso ao nascer (SIM et al., 2023; ARBOLEYA et al., 2015).

A riqueza e variabilidade da microbiota intestinal continuam seu curso de desenvolvimento até a sua estabilização aos 2 anos de idade, que passa a apresentar uma composição semelhante à do adulto. Embora haja diversas teorias explicativas para a colonização bacteriana, muitos mecanismos ainda não são totalmente conhecidos. Dentre

os motivos apontados como limitantes desse processo está o método de identificação dos genes bacterianos (KHAN et al., 2023).

As diversidades de espécies bacterianas que habitam o intestino são inerentes a comunidades complexas, cada fragmento genômico é sequenciado a partir de uma única espécie, porém dentro de uma amostra fecal existem muitas espécies diferentes, e para a maioria delas não possuem um genoma completo (MANDAL; SAHA; DAS, 2015).

Essa abordagem se constitui na extração do DNA comunitário e com base neste genoma é realizada a construção de uma biblioteca metagenômica (com o genoma misto extraído) para identificação das espécies correspondentes já conhecidos e catalogados, e com a utilização de tecnologias de sequenciamento e bioinformática. Por isso a análise desses genomas é considerada inovadora, pois permite a revelação do mundo da microbiota por meio de técnicas independentes de cultivo (CHO; BLASER, 2012; MANDE; MOHAMMED; GHOSH, 2012, BREITWIESER; SALZBERG, 2019).

Dessa maneira, o gene 16S rRNA além de auxiliar no processo de tradução e produção proteica, é uma região que possui poucas mutações ao longo das gerações, o que facilita a identificação do microrganismo, de maneira que é possível a comparação de grupos taxonômicos diversos, ou seja, apresenta uma importante sequência de nucleotídeos evolutivos conservados, como uma sequência de assinatura única para cada espécie bacteriana (BREITWIESER; SALZBERG, 2019).

Na microbiologia a utilização da molécula de rDNA é considerada a mais adequada para estudos de diversidade. Para a análise de diversidade microbiana são utilizados *primers* (para amplificação dos genes) para diferentes regiões do gene 16S rRNA que permite a classificação taxonômica a nível de espécie, podendo ser utilizada até 9 regiões. Contudo, as regiões habitualmente amplificadas são as V3 e V4, pois são mais representativas para amostras ambientais (BREITWIESER; SALZBERG, 2019).

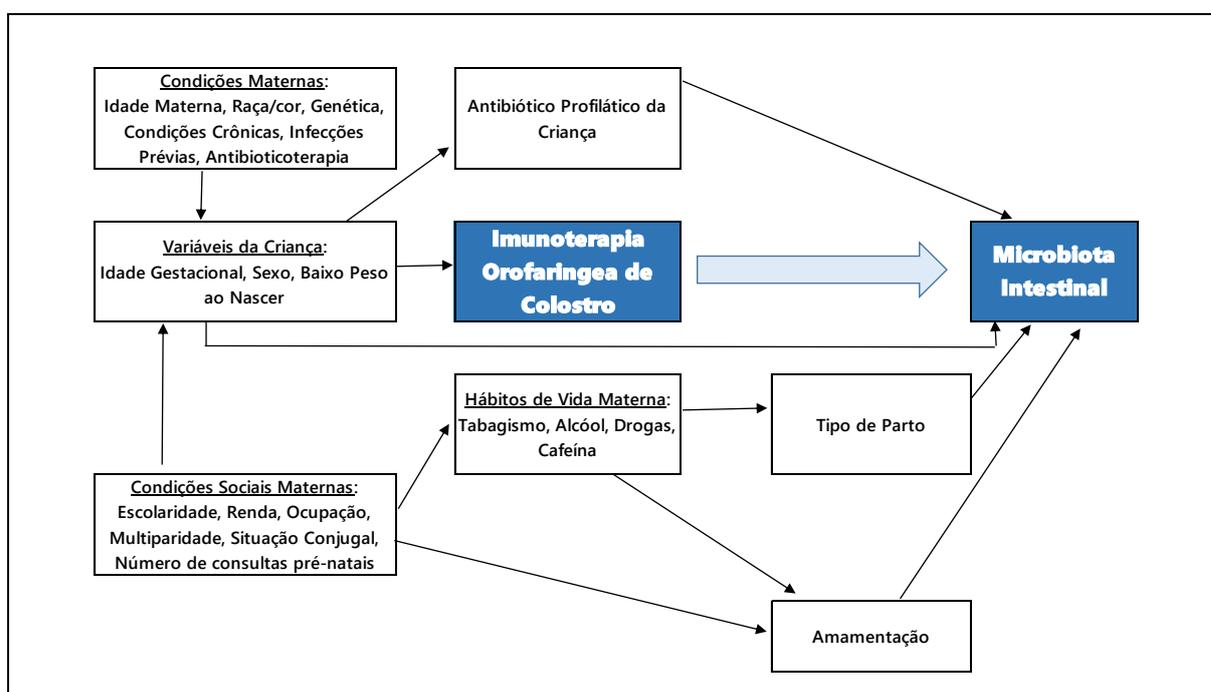
Esse método de sequenciamento representa uma importante ferramenta com alta precisão para estudo de microrganismos ambientais, e, com o aumento da utilização dessa técnica, observa-se a elevação de pesquisas dessa natureza, e com isso ampliam consecutivamente os bancos de dados utilizados nos experimentos expandindo o catálogo de nomenclaturas dos genomas taxonômicos, contribuindo assim para melhorar o conhecimento sobre o ecossistema intestinal (BREITWIESER; SALZBERG, 2019).

3.4 Modelo Teórico para Investigação

A estrutura teórica/conceitual facilita a apresentação das diversas maneiras de se pensar o problema, de representação de como os fatores complexos se relacionam entre si, e, derivam basicamente de teorias ou modelos teóricos que apresentam suposições do funcionamento dessas relações. Para a construção da estrutura do presente estudo, utilizou-se a combinação de duas teorias (Modelo Teórico Conceitual baseado na Teoria da Determinação Social do Processo Saúde Doença e na Teoria da Complexidade) com objetivo de ampliar a compreensão dos diversos aspectos do problema, as prováveis soluções, no intuito de evitar tendenciosidades (BORDAGE, 2009).

O modelo teórico proposto foi construído baseado nas investigações presentes na literatura nacional e internacional da modulação microbiana em RNPT, a partir da utilização do leite materno, adaptados para investigação dos demais fatores associados.

Para construção deste modelo teórico utilizou-se uma adaptação dos dois modelos (já definido por Dahlgren e Whitehead (1991), mais utilizado no Brasil, para a determinação social do processo saúde doença, e, da Teoria da Complexidade proposto por Almeida Filho (1996)) (figura 2) (BUSS e PELLEGRINI FILHO, 2007; PUTTINI; PEIREIRA JÚNIOR; OLIVEIRA, 2010), dessa maneira optou-se pela construção de um modelo próprio.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

Figura 2 - Modelo Teórico Conceitual baseado na Teoria da Determinação Social do Processo Saúde Doença e na Teoria da Complexidade para a investigação da modulação da microbiota em recém-nascidos pré-termos, a partir da utilização da Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.

3.5 A Imunoterapia Orofaríngea de Colostro na modulação da microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termos

A IOC, também abordada em alguns estudos como colostroterapia, é uma técnica que consiste na administração do colostro materno (produto de lactação secretado até o 5º dia de vida pós-parto), na mucosa orofaríngea do neonato, normalmente realizado em RNPT de MBP, na há impossibilidade de iniciar a nutrição trófica (por complicações decorrentes da condição de prematuridade), pois sua função não é nutricional e sim imunológica (PARIGI; ELDH; LARSEN, 2015; GUILHERME; MATTAR; BATISTA, 2010).

É um procedimento que vem sendo realizado em algumas unidades neonatais como proposta de prática clínica objetivando o fortalecimento da imunidade e preparando o tubo digestório do RNPT para a alimentação. No entanto, esta conduta, ainda carece de maiores evidências científicas para que seu uso possa ser ampliado para as diversas unidades neonatais (RODRIGUEZ et al, 2009; GUILHERME; MATTAR; BATISTA, 2010).

A IOC permite a interação da mucosa imatura do neonato pré-termo com a IgA secretora e substâncias pré e probióticas que determinam a colonização do trato gastrointestinal por uma microbiota comensal com capacidade de competição com os microrganismos patogênicos, impedindo a adesão desses últimos na mucosa intestinal e reduzindo a possibilidade de translocação bacteriana, passagem desses microrganismos ou de endotoxinas pela mucosa intestinal para a corrente sanguínea (GOULET, 2015).

Um estudo realizado nos Estados Unidos para determinar a segurança da IOC para crianças com EBP nos primeiros dias de vida, concluiu que é uma prática fácil e bem tolerada (RODRIGUEZ et al., 2015). Alguns hospitais já desenvolveram protocolos para aplicar a IOC, mas para o sucesso da intervenção é vital prover o cuidado canguru, precocemente, bem como um protocolo para orientar adequadamente a utilização do colostro no ambiente de terapia intensiva neonatal (PATEL et al., 2013; RODRIGUEZ et al., 2015). Nesse direcionamento, no ano de 2020, em Feira de Santana, foi conduzido, pelo Núcleo de Pesquisa e Extensão em Saúde (NUPES), um estudo para estabelecer um

protocolo clínico de utilização da IOC, o qual descreveu a implementação da técnica em RNPT de MBP em uma unidade neonatal (DA CRUZ MARTINS et al., 2020).

A relação entre a IOC e a colonização intestinal de neonatos pré-termos nos primeiros dias de vida, ainda é pouco investigada. Em uma pesquisa mais recente conduzida em um hospital universitário de São Paulo, evidenciou que a administração da IOC, antes da introdução da dieta enteral, foi capaz de favorecer bactérias do gênero *Bacteroides* na microbiota intestinal do RNPT, e apresentou correlação positiva com maiores abundâncias de *Bifidobacterium* (MOREIRA, 2019).

Tendo em vista a incipiência da literatura sob a temática principal desta investigação, foi realizado uma busca na literatura publicada que abordassem tanto a utilização de protocolo de IOC como também a administração de colostro/leite materno. Utilizou-se para a seleção dos artigos, os seguintes descritores: “*Microbiota gut*” and “*neonatal*” and “*colostrum*”, nas bases de dados: *Pubmed e Scientific Electronic Library Online — SciELO*, com recorte de 10 anos de publicação. Foram excluídos teses e dissertações, além de estudos que não verificassem a modulação da microbiota gastrointestinal (quadro 1).

Dessa maneira, foram selecionados 8 estudos conduzidos com RNPT, destes 4 ensaios clínicos, 3 estudos longitudinais observacionais (coorte) e 1 estudo transversal. Todos utilizaram como método de sequenciamento gene V3-V4 16S rRNA.

No estudo de Cortez e colaboradores (2021), único que contemplou o objetivo deste estudo, evidenciou a maior abundância de *Bifidobacterium* e *Bacteroides* no grupo submetido a IOC na primeira semana de vida. Os demais, embora não verificassem especificamente a associação da IOC com a microbiota intestinal, averiguaram o impacto do leite materno sobre a colonização bacteriana. Os gêneros mais abundantes encontrados nesses estudos foram: *Clostridium sensu strictue*, *Lactobacillus* (EMBLETON; SPROAT; UTHAYA et al., 2023); *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter* e *Acinetobacter* (CHANG; CHIANG CHIAU; CHANG, 2022; AMANDITO; MALIK; ROHSISWATMO, 2022; LIU; ROY; GUO, 2016; CORONA-CERVANTES; GARCÍA-GONZÁLEZ; VILLALOBOS-FLORES, 2020); *Citrobacter* (PARRA-LLORCA; GORMAZ; ALCÂNTARA, 2018).

Quadro 01 – Estudos que evidenciaram a relação entre a Imunoterapia Orofaríngea de Coloostro/leite materno humano com a colonização da microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termos nos primeiros dias de vida, 2023.

Autor / Ano de publicação	País / Tipo de estudo / População / Método de sequenciamento	Objetivo	Resultados Principais
Embleton ND; Sproat T; Uthaya S; Young GR; Garg S; Vasu V, et al., 2023	Reino Unido. Ensaio Clínico Randomizado. 126 recém-nascidos pré-termos nas primeiras 72 horas de vida (<30 semanas gestacionais). Sequenciamento do gene V4 16S rRNA	Determinar as diferenças de uma dieta exclusiva com leite humano de uma contendo produtos derivados de bovinos na microbiota intestinal de recém-nascidos muito prematuros.	<i>Lactobacillus</i> foram os únicos gêneros significativos que diferiram entre os grupos do ensaio, sendo menor em lactentes que receberam a dieta exclusiva de leite humano. A abundância relativa de <i>Bifidobacterium</i> não esteve associada a uma dieta exclusivamente de leite humano. Na dieta exclusiva com leite materno: maior abundância dos gêneros: <i>Clostridium sensus strictue</i> ; e menor de <i>Enterobacteriaceae</i> .
Cortez RV; Fernandes A; Sparvoli LG; Padilha M; Feferbaum R; Neto CM, et al., 2021	Brasil. Estudo longitudinal e observacional. 24 recém-nascidos pré-termos avaliados ao 1º, 7º, 14º e 21º dia de vida (idade gestacional entre 28 e 35 semanas de gestação). Sequenciamento do gene V3-V4 16S rRNA	Avaliar as primeiras semanas de desenvolvimento da microbiota oral de recém-nascidos pré-termos recebendo colostro orofaríngeo, em comparação com um grupo controle recebendo cuidados padrão.	Houve maior abundância de <i>Bifidobacterium</i> e <i>Bacteroides</i> no grupo que houve administração orofagínea de colostro na primeira semana de vida.
Chang HY, Chiang Chiau JS, Chang JH, Hsu CH, Lin CY, Ko MH, et al., 2022	Austrália. Ensaio Clínico. 20 prematuros de muito baixo peso com IG ≤ 32 semanas, avaliados nos dias 7, 14 e 30. Sequenciamento do gene V3-V4 16S rRNA	Investigar a composição da microbiota intestinal de prematuros pequenos para idade gestacional com muito baixo peso em comparação aos prematuros com peso adequado para idade gestacional com muito baixo peso.	Houve diferenças na composição microbiana intestinal entre os grupos. A principal composição a nível de gênero encontradas em ambos os grupos foram: <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Escherichia/Shigella</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> e <i>Acinetobacter</i> .

Amandito R; Malik A; Rohsiswatmo R, 2022	Indonésia. Estudo observacional prospectivo de coorte. 8 recém-nascidos pré-termos, avaliados nos dias 4 e 7. Sequenciamento do gene V3-V4 16S rRNA	Caracterizar o microbioma fecal no início da vida e determinar sua influência nas condições clínicas dos recém-nascidos.	Evidenciou-se que nas amostras de mecônio tiveram maior abundância de: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Ureaplasma</i> . Prevalceram os gêneros <i>Staphylococcus</i> no dia 4 e no dia 7 por <i>Clostridiales</i> .
Parra-Llorca A; Gormaz M; Alcántara C; Cernada M; Nuñez-Ramiro A; Vento M, 2018	Espanha. Estudo prospectivo, observacional de coorte unicêntrico. 69 recém-nascidos <32 semanas de gestação. Sequenciamento do gene 16S rRNA	Determinar o impacto do leite humano pasteurizado de doadora na microbiota intestinal de prematuros admitidos em uma unidade de terapia intensiva neonatal de referência	Foram observadas diferenças significativas na composição da microbiota de prematuros, de acordo com o tipo de alimentação. O leite do Banco de leite favoreceu um microbioma intestinal mais semelhante ao leite cru da própria mãe. A nível de gênero, níveis altos de: <i>Bifidobacterium</i> , <i>Citrobacter</i> e <i>Clostridiaceae</i> .
Underwood MA, Gaerlan S, De Leoz ML, Dimapasoc L, Kalanetra KM, Lemay DG, 2015	Califórnia. Ensaio Clínico. 14 prematuros. Sequenciamento de próxima geração (NGS)	Determinar a composição de oligossacarídeos do leite, urina e fezes de 14 prematuros recebendo apenas leite humano de suas mães e correlacioná-los com a composição da microbiota fecal.	Os oligossacarídeos do leite materno, podem influenciar a microbiota intestinal em prematuros. Foram observadas tendências para níveis mais altos de <i>Proteobacteria</i> e níveis mais baixos de <i>Firmicutes</i> .
Liu Z, Roy NC, Guo Y, Jia H, Ryan L, Samuelsson L, et al., 2016	China. Ensaio Clínico. 120 recém-nascidos, coletadas amostras do dia 1 e dia 21. Método de sequenciamento utilizado não foi esclarecido.	Comparar os efeitos do leite humano e fórmulas infantis em recém-nascidos humanos e um modelo de rato desmamado.	As concentrações fecais de <i>Bifidobacterium</i> foram maiores em recém-nascido alimentados exclusivamente com leite materno.
Corona-Cervantes K, García-González I, Villalobos-Flores LE, Hernández-Quiroz F, Piña-Escobedo A, Hoyo-Vadillo C, Rangel-Calvillo MN, 2020	México. Estudo transversal. 67 recém-nascidos, avaliados entre os dias 1 e 6. Sequenciamento de alto rendimento de bibliotecas de rDNA V3-16S	Avaliar o efeito da microbiota do leite humano na composição bacteriana do intestino do recém-nascido nos primeiros dias	Maiores prevalências das famílias: <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Clostridium</i> , e os gêneros: <i>Bifidobacterium</i> nas fezes dos recém-nascidos.

Fonte: Elaboração própria, 2023.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um ensaio clínico controlado não randomizado (quase experimental). Neste tipo de estudo existem dois grupos, intervenção e controle; entretanto, a maneira de seleção dos participantes não ocorre de maneira aleatória. Esse tipo de estudo se aplica quando se pretende demonstrar a eficácia de um novo tratamento. A principal limitação é a dificuldade de controlar as variáveis de confundimento, porém com a identificação prévia das mesmas, essas podem ser ajustadas por métodos analíticos (ROUQUAYROL, 2003).

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar, por meio da análise do DNA metagenômico, o estabelecimento da microbiota intestinal em RNPT, tratados ou não com a IOC, atendidos no SUS no município de Feira de Santana / BA. O hospital, no qual ocorreu a intervenção, aderiu a um protocolo de administração de colostro cru para os prematuros.

Esta investigação está ancorada no projeto de pesquisa intitulado “Colostroterapia, Nutrição, Crescimento Pondero-Estatural e Morbimortalidade de Recém-Nascidos Prematuros de Muito Baixo Peso Atendidos Pelo Sistema Único de Saúde (SUS): Estudo de Intervenção”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), sob CAAE no. 93056218.0.0000.0053, respeitando-se as Resoluções n. 466/12, n. 510/2016 e 580/18, do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

4.2 Local do Estudo

A pesquisa foi realizada na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) e Unidade Semi-Intensiva Neonatal (USIN) do Hospital Inácia Pinto dos Santos (HIPS), conhecido popularmente como Hospital da Mulher, unidade onde se deu o acompanhamento do grupo intervenção, e do Hospital Estadual da Criança (HEC), hospital onde ocorreu o seguimento do grupo controle, em Feira de Santana, Bahia.

O HEC foi inaugurado em 2010 e foi projetado para ser o maior hospital de referência do Nordeste do país, direcionado para o atendimento pediátrico de média e alta complexidade, sendo considerado um hospital de grande porte. O complexo hospitalar tem capacidade para o funcionamento de 280 leitos; dos quais 154 estão ativos e distribuídos em unidades de urgência e emergência, cirurgia, ortopedia, cardiologia, nefrologia, oncologia, terapia intensiva

pediátrica e neonatal. Dentre esses, 20 leitos são destinados a UTIN, 10 leitos na Unidade de cuidado Intermediário Canguru (UCINCA) e 18 leitos na Unidade de Cuidado Intermediário Convencional (UCINCO). Embora exista um Banco de Leite Humano (BLH) no HEC, a prescrição de uso de leite humano pasteurizado para RNs internados na UTIN é realizada mediante prescrição médica e/ou disponibilidade de estoque, não existindo um protocolo de administração da Terapia Imunológica Colostral.

O Hospital da Mulher (HIPS) configura-se como instituição mantida pela Fundação Hospitalar de Feira de Santana, com administração indireta da Rede Municipal. O HIPS atende mulheres no período gravídico e puerperal, classificadas como de risco habitual ou aquelas de risco que são admitidas em franca urgência ou emergência obstétrica, através do SUS, em atenção à demanda pactuada para a cidade e microrregião. Atualmente, a UTIN desta instituição conta com 8 leitos, Unidade de Cuidados Intensivos (UCIN) com 6 leitos, possui 8 leitos na Unidade Semi-intensiva Neonatal, e 10 leitos na Unidade Canguru (SESAB, 2021).

4.3 Amostra/Amostragem

Os participantes do estudo foram compostos pelas mães e seus respectivos RNPT que estiveram hospitalizadas nas UTIN do Hospital da Mulher e do HEC, quando aplicável.

Foram adotados como critérios de inclusão para as crianças prematuras, para o Hospital da Mulher: RNs admitidos em Unidades Neonatais, peso ao nascer $\leq 1.500\text{g}$ (não houve critério para peso mínimo, assim foram incluídos os neonatos com muito baixo peso ($\leq 1500\text{g}$) e extremo baixo peso ($< 1000\text{g}$), ≤ 36 semanas gestacionais (não houve critério para idade gestacional mínima, assim foram inclusos os prematuros extremos < 28 semanas e os prematuros moderados entre 28 a ≤ 36 semanas). Estavam em dieta zero por via oral, enteral ou em uso de Nutrição Parenteral Total (NPT). Além disso, devem estar estáveis clinicamente, com os parâmetros normais segundo critérios estabelecidos no quadro 2, em uso da IOC com protocolo do próprio hospital, iniciada em até 24 horas pós nascimento e antes do início da dieta enteral.

Quadro 2 – Critérios estabelecidos para parâmetros clínicos de normalidade em neonatos

Observações	
Padrão de temperatura	0 – Hipotermia ($< 36,4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 1 – Normotermia ($36,5 - 37,4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 2 – Hipertermia ($>37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$)
Δ Taxa respiratória (f _{mínimo} e f _{máximo} a cada 24 horas)	0 - Normal (40-60 incursões respiratórias por minuto (irpm))

	1 – Anormal (outra situação que não a normal)
Δ Pressão arterial (pamínima e pamáxima a cada 24 horas)	Diretamente correlacionada com a idade gestacional, a idade pós-natal e o peso de nascimento (ver curvas normais de pressão arterial)
Δ Frequência cardíaca (fcmínima e fcmáxima a cada 24 horas)	0 – Normal (situa-se entre 100-180 batimentos por minuto (bpm), em geral 120-160 acordado e 70-80 dormindo) 1 – Anormal (outra situação que não a normal)
Saturação	0 – Normal (outra situação que não a baixa) 1 – Baixa (< 93%)

Fonte: dados da pesquisa (2023).

Os critérios de inclusão para o grupo controle foram: RNPT admitidos em Unidades Neonatais do HEC, peso ao nascer $\leq 1.500\text{g}$ (não houve critério para peso mínimo, assim foram incluídos os neonatos com muito baixo peso ($\leq 1500\text{g}$) e extremo baixo peso ($< 1000\text{g}$)), ≤ 36 semanas gestacionais (não houve critério para idade gestacional mínima, assim foram incluídos os prematuros extremos < 28 semanas e o prematuro moderado entre 28 a ≤ 36 semanas). Estavam em dieta zero por via oral, enteral ou em uso de NPT e/ou a administração enteral de leite materno (cru ou pasteurizado), além de clinicamente estáveis.

As mães dos lactentes, tanto para o grupo de intervenção, quanto para o grupo controle, foram selecionadas seguindo os critérios de elegibilidade de entrada dos seus filhos no estudo. Dentre os critérios de exclusão: a) da mãe – histórico materno de uso de substâncias psicoativas, drogas, álcool, presença de desordem psicológica, gestação múltipla a partir de trigêmeos e filhos de mães contraindicadas para a amamentação (retrovíroses e citomegalovírus); b) do RN - uso de medicamento vasopressor $>10\text{mcg/Kg/min}$, requerimento de intervenção cirúrgica imediata, síndromes e /ou malformações congênitas, morbidades neonatais como a incidência de Persistência do Canal Arterial (PCA), sepse ou NEC.

Poucos estudos longitudinais foram conduzidos que avaliassem o efeito do aleitamento materno no microbioma intestinal do bebê prematuro na primeira semana de vida (GREGORY et al., 2016), e, na incipiência de pesquisas que permitissem a aplicação de fórmula para o cálculo do tamanho amostral da presente investigação, foi necessário a realização de um teste piloto, dessa maneira não houve cálculo estatístico para estabelecimento da amostragem.

A literatura não é clara quanto ao tamanho mínimo da amostra necessária para o teste piloto, havendo recomendação que pode variar entre 20 a 30 indivíduos, entretanto utilizou-se o parâmetro de amostra do estudo de Gregory e colaboradores (2016), que objetivou estabelecer a relação entre a colonização bacteriana por meio da amamentação de prematuros. Sendo assim, o piloto dessa pesquisa foi realizado com 20 crianças em cada grupo (total de 40 crianças nos

grupos intervenção/controle). Foram considerados nível de significância de 5% e poder do estudo de 80%.

Com base nessas informações, foi realizado, inicialmente um teste piloto no período aproximado de 40 dias. O teste piloto foi realizado após a aprovação do CEP da UEFS – BA. Neste piloto foram adotados todos os procedimentos descritos para o experimento em si.

Além de originar dados para o cálculo do tamanho amostral, esta fase da pesquisa foi realizada com o objetivo de aprimorar o método e instrumento de coleta de dados, além dos procedimentos operacionais padrões estabelecidos. Haja vista que o piloto não foi utilizado na amostra final da pesquisa.

4.3.1 Grupo de Intervenção

A intervenção ocorreu em crianças, no Hospital da Mulher por ser o único da região que está vinculado a Rede de Atenção Municipal do SUS, e, por possuir protocolo instituído de administração orofaríngea do colostro materno em RNPT internados na UTIN.

A mãe do RNPT foi abordada nas primeiras 24 horas pós-parto, esclarecida quanto aos objetivos da pesquisa e convidada a participar da mesma mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); nos casos de menor de 18 anos foram apresentados o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o responsável legal da menor e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE). Posteriormente, foi aplicado às mães um questionário para obtenção de dados sociodemográficos e biológicos.

A intervenção foi realizada pela equipe de profissionais de saúde do Hospital da Mulher (HIPS), em todos os RNPT admitidos nas Unidades Neonatais. Ao médico coube fazer a contra-indicação da IOC – quando foi necessário; o enfermeiro acompanhou e registrou a estabilidade clínica e o técnico de enfermagem fez a administração do colostro ao RN. Todas as crianças admitidas na UTIN receberam IOC, desde que não houve contra-indicação médica, uma vez que a IOC foi instituída como Protocolo Padrão do hospital. Porém, só foram elegíveis para a pesquisa àquelas que atenderam aos critérios de inclusão.

De acordo com o protocolo do Hospital, para o grupo de intervenção, foi utilizado o colostro da própria mãe e o esquema de tratamento foi constituído diariamente por 8 administrações de 0,2 ml (quatro gotas) de colostro por 10 segundos em mucosa orofaríngea, oferecidos a cada 03 horas, até o sétimo dia de vida da criança. Inicialmente, a primeira seringa contendo 0,1 ml (duas gotas) de colostro foi direcionada para o tecido mucoso oral direito e

gotejada durante os primeiros 5 segundos; e, posteriormente a mesma seringa contendo 0,1 ml (duas gotas) de colostro restante foi administrada no tecido mucoso oral esquerdo até o décimo segundo.

Durante o procedimento foram monitorados: o batimento cardíaco, temperatura, a frequência respiratória, a pressão sanguínea e a saturação do oxigênio de pulso; e, o mesmo foi imediatamente interrompido caso tivesse sido observado sinais de risco à vida do neonato que são inerentes a sua condição de vulnerabilidade (episódio de dessaturação, com saturação de oxigênio menor que 88% ou percepção de mudança dos sinais vitais; e, foi acompanhado mediante formulário de evolução clínica, nutricional e pondero-estatural).

4.3.2 Grupo Controle

O grupo controle foi formado por crianças e suas respectivas mães do HEC, por ser um Hospital pertencente a Rede de Atenção à Saúde do Estado vinculada ao SUS, e, não possuir protocolo com a IOC.

4.4 Coleta de Dados

4.4.1 Coleta de dados de prontuários

O recrutamento das crianças se deu imediatamente após o nascimento, por meio da avaliação de peso ao nascer e idade gestacional, assim como os demais critérios de elegibilidade do estudo, o consentimento de um de seus responsáveis e seu assentimento (para mães menores de 18 anos), a aplicação do questionário aos pais após a assinatura dos termos e a coleta das informações do prontuário da criança após a entrada na UTIN.

Para a coleta das variáveis do estudo foram aplicados três questionários/formulários estruturados: o primeiro foi aplicado à mãe para obter dados referentes às questões sócio demográficas, assistenciais durante o pré-natal/parto e hábitos de vida. O segundo formulário, foi preenchido baseado nas informações dos prontuários da criança: constando perguntas sobre data de nascimento, sexo, peso ao nascer, apgar no 1' e 5' minuto de vida e registro das dejeções. O terceiro formulário foi preenchido com os resultados dos exames (contidos no prontuário), no primeiro e ao sétimo dia de vida da criança. A solicitação de exames de sangue

foi realizada pela equipe médica de ambos hospitais, como parte da avaliação clínica de rotina do RN.

4.4.2 Protocolo de coleta das amostras fecais

Para a coleta de amostra das fezes dos RN's, seguiu-se um protocolo específico com finalidade de preservar as colônias bacterianas existentes e conseqüentemente a qualidade do DNA metagenômico, e, se deu no momento em que o neonato eliminasse as três amostras iniciais na sequência (1^a, 2^a 3^a dejeção), e uma dejeção a partir do 7^o dia de vida, o que corresponde a administração da 56^o seringa com colostro.

Para garantir a qualidade do material coletado e conseqüente qualidade do DNA genômico, foram instituídos cuidados desde a coleta, transporte e armazenamento de amostras fecais. Neste sentido, para que houvesse a conservação ideal, foi colocado dentro da fralda do neonato pré-termo, ao nascimento, um recorte de um tecido de campo cirúrgico (fenestrado e estéril), que recobrisse toda a parte interna, com a finalidade de evitar que o conteúdo (amostra fecal) fosse absorvido pela fralda.

Além disso, a colocação do tecido estéril evita que a parte absorvente da fralda que é impregnada com sais de bário, criasse um *viés* nos resultados, uma vez que esses são inibidores de patógenos fecais. Em todas as trocas de fralda do RN foram recolocados novos recortes de campo cirúrgico, pela equipe de técnicos, nos procedimentos de rotina, até que todas as amostras fecais fossem recuperadas.

Quando o neonato apresentava as dejeções, a fralda era cuidadosamente retirada pela equipe de técnicos de enfermagem/enfermeiros, devidamente paramentados, para que não houvesse contaminação da amostra fecal, e, posteriormente realizada a higienização de rotina no RNPT. O recorte de campo cirúrgico contendo a amostra (o qual estava posicionado dentro da fralda) foi raspado gentilmente com auxílio da espátula de ayre (estéril), e, foi passado o conteúdo diretamente para o tubo *ependorf* 1,5 ml (estéril) com fechamento hermético. Foram coletados 0,75 ml de amostra fecal, aproximadamente metade do tubo.

Os microtubos contendo o material fecal coletado foram colocados em rack plástico de armazenagem para evitar tombamentos e encaminhado imediatamente (após a coleta na fralda) para primeiro congelamento em freezer comum (-20° C), localizado na unidade hospitalar, com termômetro digital para controle de temperatura.

As amostras foram mantidas congeladas a -20°C (por não mais que 12 horas), e, em seguida foram transportadas (pelos pesquisadores da equipe) em um pacote térmico, para garantir que não fossem descongeladas em nenhum momento e levadas ao laboratório de Análises Microbiológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, onde foram armazenadas em um ultrafreezer (-80°C), com validade de permanência por até um ano. A coleta ocorreu em qualquer dia da semana (incluindo os finais de semana e feriados).

O transporte do tubo (congelado) do freezer do hospital para o freezer da universidade foi realizado em recipiente isotérmico, higienizável e impermeável, com um termômetro digital de cabo extensor fixado na caixa para controle de temperatura do material transportado, para garantia de manutenção da cadeia de frio. Para tanto, foi utilizado o gelo rígido reciclável (gelox) para transporte em baixas temperaturas, evitando assim o descongelamento da amostra em qualquer momento. A coleta ocorreu por meio de escala de trabalho dos pesquisadores e/ou no momento da ejeção do RN, não havendo, portanto, horário e nem dias da semana pré-determinados.

As informações referentes ao neonato foram registradas em uma planilha que ficavam no setor neonatal (data, hora, idade do recém-nascido (em dias) e responsável), além disso o microtubo recebeu um código referente ao RN (as marcações foram realizadas com caneta permanente no microtubo).

Considerando as normas de biossegurança, após a coleta do material fecal para os tubos *ependorf*, as fraldas foram embaladas em sacos plásticos totalmente fechados e descartadas, como lixo biológico no ambiente hospitalar, assim como todos os utensílios que entraram em contato com o material, devido ao risco infeccioso.

Ainda sobre prevenção de riscos, se algum RN apresentasse dermatite de contato, seria imediatamente excluído da pesquisa. Dentre os riscos, existe também a possibilidade de contaminação do profissional de saúde no momento da coleta pelo material fecal; sendo assim foi instituída como medida de controle na troca de fralda o uso de EPI's de rotina do hospital (touca, luvas e máscara). Todos esses cuidados foram reforçados no treinamento/capacitação que foi realizado para todos os profissionais dos respectivos setores das unidades neonatais.

Dentre a avaliação dos possíveis riscos da pesquisa, incluiu-se também a manipulação dos prontuários, danificação por meio do manuseio, e, ou dificuldade de manter sigilo das informações coletadas. Como medida de minimização, foram adotados treinamentos da equipe de coleta, e cada formulário coletado referente ao prontuário foram identificados por meio de numeração, evitando assim a divulgação dos nomes dos participantes.

4.5 Variáveis da pesquisa

As variáveis selecionadas para estudo foram denominadas: variável quase-experimental, controle da variável quase-experimental, variável de desfecho e covariáveis para a homogeneização dos grupos.

4.5.1 Variável quase-experimental (exposição)

Foi considerada variável de exposição a IOC, definida neste trabalho como a utilização do colostro com fins de suplementação imunológica, em RNPT nascidos no Hospital da Mulher.

4.5.2 Variável de controle da exposição

A variável de controle foi a não utilização da IOC em neonato em situação de dieta zero e/ou a administração enteral de leite pasteurizado do BLH, prescrita pelo neonatologista para o RNPT nascidos no HEC (onde não possui protocolo da IOC) com fins nutricionais.

4.5.3 Variável desfecho

O desfecho avaliado foi a microbiota intestinal de RNPT constituída por espécies bacterianas comensais ou não.

4.5.4 Covariáveis

Os grupos foram pareados pelas variáveis: idade gestacional e tipo de dieta. Essas são descritas na literatura como possíveis fatores de confundimento por serem moduladores da microbiota intestinal (HANSEN et al., 2014; GOULET, 2015).

As características maternas pesquisadas foram: data de nascimento, idade materna, local de residência, raça/cor, situação conjugal, escolaridade materna, trabalho materno/ocupação habitual, renda, idade gestacional, paridade, número de gestações anteriores, número de consultas pré-natal, tipo de gravidez, indução do parto, tipo de parto, assistência ao nascer. Durante a gestação as variáveis: ingestão de cafeína, uso de medicamento pela mãe e infecção. Objetivando que o estudo passasse a ter um delineamento longitudinal, foram coletadas as

informações pessoais dos participantes, para que pudessem ser contatados futuramente. As covariáveis pesquisadas podem ser verificadas no quadro 3 abaixo.

Quadro 3 - Variáveis maternas pesquisadas

Variáveis	Categorização
Data de nascimento	Coletada em dd/mm/aaaa
Idade materna	Coletada em anos
Local de residência	Urbana Rural
Raça/Cor (autorreferida)	Amarelo Branco Preto Pardo Indígena Sem declaração
Situação conjugal	Casado União estável Separado judicialmente/divorciado Solteiro Viúvo Ignorado
Escolaridade materna	Pós-graduação Superior Completo Superior Incompleto Ensino Médio Ensino Fundamental II (5ª a 8ª série) Ensino Fundamental I (1ª a 4ª série) Sem escolaridade
Trabalho materno/Ocupação habitual (DNV)	Trabalho remunerado com vínculo Trabalho remunerado sem vínculo/Autônoma Aposentada Desempregada Trabalho não remunerado Não soube informar
Renda	Renda \geq 2 salários mínimos Renda = 1 salário mínimo Renda $<$ 1 salário mínimo
Idade gestacional (semanas)	Medida em semanas
Paridade	Múltipara Primípara
Número de gestações anteriores	Medido em quantidade
Número de consultas de pré-natal	Medido em quantidade
Tipo de gravidez	Única Dupla Tripla ou mais Ignorado
Indução do parto	Sim Não
Tipo de parto	Normal Cesáreo Fórceps
Ingesta de cafeína na gestação	Não Sim
Uso de medicamento pela mãe na gestação	Não Sim
Recordatório de frequência alimentar	Café

	Chá mate Achocolatado Chocolate Refrigerante de cola
Uso de medicamentos à base de cafeína	Antialérgico Analgésico Antigripal
Mãe com infecção na gestação (Quais?)	Não Sim

Fonte: dados da pesquisa, 2023.

As variáveis dos RNs pesquisadas foram: data de nascimento, hora de nascimento, peso ao nascer, uso de medicamentos pela criança (Antibiótico, Surfactante, Corticosteróide, Diurético), escore de Apgar, sexo, temperatura média, taxa respiratória, pressão arterial, frequência cardíaca, perímetro cefálico e percentil, comprimento (medido em cm) e percentil, peso (medido em gramas), icterícia, uso e duração do mecanismo de ventilação, medidas de saturação de oxigênio arterial, dosagem de biomarcadores sanguíneos (IgA, proteína C reativa e Linfócitos) e eliminação de mecônio (primeiras fezes do bebê) e a primeira dejeção após a administração da 56ª seringa com colostro (7º dia de vida no grupo controle). Que podem ser observadas no quadro 4.

Quadro 4- Variáveis do recém-nascido pesquisadas

Variáveis	Categorização
Data de nascimento	Coletada em dd/mm/aaaa
Hora de nascimento	Coletado no registro de nascimento
Peso ao nascer	Medido em gramas
Uso de medicamento pela criança (Antibioticoterapia/Surfactante/Corticosteróide/Diurético)	Não Sim
Escore de Apgar 1' e 5'	Anotado no 1' e 5'
Vínculo mãe e filho	Estabelecido Frágil
Sexo	Feminino Masculino
Temperatura (medida em °C)	Retal (mais elevada que a oral em 1 grau) Oral Axilar (mais baixa que a oral em 1 grau)
Δ Taxa respiratória (FR mínima e FR máxima a cada 24 horas)	Normal (40-60) Incursões Respiratórias Por Minuto (irpm) Anormal (outra situação que não a normal)
Δ Pressão arterial (PA mínima e PA máxima a cada 24 horas)	Diretamente correlacionada com a idade gestacional, a idade pós-natal e o peso de nascimento (ver curvas normais de pressão arterial)
Δ Frequência cardíaca (FC mínima e FC máxima a cada 24 horas)	Normal (situa-se entre 100-180 batimentos por minuto (bpm), em geral 120-160 acordado e 70-80 dormindo) Anormal (outra situação que não a normal)
Perímetro cefálico e percentil	Medido em cm
Comprimento (medido em cm) e percentil	Ver gráfico de crescimento

Peso (medido em gramas) e percentil	Ver gráfico de crescimento
Icterícia (Colocar hora da coleta)	Medida através dos exames laboratoriais de bilirrubina (total, direta e indireta)
Uso do mecanismo de ventilação Invasiva (entubado) Não-invasiva (cpap/bipap) Oxigenoterapia (halo/hood/capacete) Catéter de oxigênio sem pressão	Não Sim
Duração do mecanismo de ventilação	Coletado em horas
Medidas de saturação de oxigênio arterial (SAO ₂) (oxímetro de pulso mínimo e máximo dentro de 24 horas/gasometria mínimo e máximo dentro de 24 horas)	Coletado em %
Dosagem de biomarcadores sanguíneos (IgA, proteína C reativa e Linfócitos)	Coletado através dos exames laboratoriais
Dejeções de amostras fecais	Coletado por meio da fralda: 1ª amostra ao nascimento (mecônio) 2ª e 3ª amostra na sequência após o mecônio 4ª amostra ao 7º dia de vida

Fonte: dados da pesquisa, 2023.

4.6 Análise dos Dados

Os dados foram duplamente digitados em dois bancos, por digitadores diferentes, e depois comparados para validação no *software* EPIDATA. Foram utilizados os seguintes pacotes estatísticos: *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 26.0) e *software R studio* (versão3.2.4).

Para a descrição das variáveis foi utilizado o SPSS versão 20.0. As variáveis categóricas foram descritas por meio da distribuição de frequências absolutas e relativas e para as variáveis numéricas, a média, mediana, mínimo, máximo e o desvio-padrão.

Foram avaliados os índices de riqueza de *Chao1*, índice de diversidade de *Shannon*, índice de dominância de *Simpson* e a diferença nos 15 gêneros bacterianos mais abundantes em todas as amostras de fezes, além da análise da beta diversidade.

Para verificar se os dados apresentavam distribuição normal, realizou-se teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Na sequência, foi utilizado o teste não paramétrico de *Wilcoxon rank sum exact test*, similar ao teste *t de Student* para duas amostras relacionadas. Adotou-se nível de significância de $p < 0,05$.

Para os cálculos de índices de alfa diversidade (*Chao1*, *Shannon*, *Simpson*) foram realizadas a análise com o *Generalized Estimating Equations* (GEE). Considerou-se os modelos com distribuições gamma ou linear e a função de ligação *identity*. A matriz de correlação foi variada entre independente, AR (1), *unstructured* e *exchangeable*. Para a escolha do melhor

modelo foi considerado o menor valor de *Quasi likelihood under Independence Criterion* (QIC). A melhor aderência foi avaliada utilizando o gráfico Q-Q plot.

Para a análise da beta diversidade, foi utilizado o *software Microbiome Analyst* (DHARIWAL et al., 2017) para observar as diferenças intra e entre os grupos em todas as amostras. Para cada variável foi realizado o teste PERMANOVA, utilizando as distâncias ponderadas e não-ponderadas (*weighted e unweighted UniFrac*). Realizou-se 999 permutações para cada variável. A significância estatística foi considerada com valor de $p < 0,05$. Foi realizada a análise de coordenadas principais (PCoA), para verificação dos dados multidimensionais em um plano bidimensional, com finalidade de avaliar as diferenças entre os grupos de comparação e estabelecer semelhanças e diferenças entre as comunidades bacterianas. A PCoA utiliza as matrizes de distâncias *UniFrac weighted e unweighted UniFrac* para visualizar as informações. Essas matrizes representam as estruturas das comunidades bacterianas e mostram como elas se comportam em diferentes condições.

4.7 Extração do DNA metagenômico e sequenciamento

A etapa de extração e sequenciamento do DNA metagenômico das fezes foi realizada com o *kit QIAamp DNA Stool Mini Kit*, segundo as normas do fabricante, no Laboratório Clínico do Hospital Universitário / Universidade de São Paulo (USP).

4.7.1 Amplificação do domínio V4 do gene 16S rRNA

Para caracterizar a microbiota fecal dos RNPT foi realizada pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano (KOZICH et al., 2013). O comprimento total de sequências iniciadoras utilizando a nomenclatura de nucleótidos IUPAC padrão, conforme protocolo padrão para esta região foram: V4 *forward primer* (5'- TCG TCG GCA GCC AGT GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GT - 3') e V4 *reverse primer* (5'- GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT - 3'). Para a amplificação das sequências alvo, foram utilizados 5 µl de DNA microbiano (10 ng/µl), em volume total de 25 µl. A reação realizou-se nas seguintes condições: ativação da enzima 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos, extensão 68°C por 45 segundos, 68°C por 2 minutos; e, finalmente a enzima foi mantida a 4°C. Complementarmente foram utilizados,

um controle negativo da reação de PCR e um controle negativo dos reagentes do kit de extração de DNA. Para verificação se o PCR amplificou o tamanho esperado após utilização dos pares de *primer* V4 no protocolo, foi utilizado 1µl do produto em eletroforese com gel de agarose à 1%.

A amplificação inicial realizou-se em duas etapas e subsequentemente todos os procedimentos foram processados de acordo com o protocolo do fabricante (*Illumina-16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*). O tamanho do fragmento alvo é de 250 pb e 412 pb após a indexação dos adaptadores. Utilizamos os adaptadores *Nextera XT* e kit de 21 reagentes para sequenciamento V2 500 ciclos. Posteriormente, houve o sequenciamento das amostras utilizando a plataforma *Illumina MiSeq®*, de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.2 Análise da microbiota por ferramentas de bioinformática

Após adquirir as sequências, as bibliotecas 16S rRNA obtidas foram analisadas através do *software QIIME v.2-2020.2* (BOLYEN et al., 2019). *Denoising* foi realizado com a ferramenta DADA2 (CALLAHAN et al., 2016). As sequências diretas foram então truncadas na posição 251 nucleotídeos, enquanto as reversas foram truncadas nos 250 nucleotídeos, a fim de descartar as posições para as quais a qualidade mediana dos nucleotídeos era inferior a Q30. As amostras com menos de 1000 sequências também foram excluídas de análises posteriores.

Atribuiu-se a taxonomia com auxílio do ASVs (*Amplicon Sequencing Variant*) através do recurso *q2-featureclassifier* (BOKULICH et al., 2018) e o classificador de taxonomia Bayes *naive classifysklearn*, comparando as ASVs obtidas contra o banco de dados de referência SILVA 132 (QUAST et al., 2013). As análises posteriores foram realizadas no *software SPSS* versão 26 e *R Studio* versão 4.0.4, usando os pacotes *phyloSeq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013), *vegan* (OKSANEN et al., 2016), *microbiome* (LAHTI; SHETTY, 2018) e *ggplot2* (HADLEY, 2016).

4.8. Aspectos éticos

Os dados e as amostras biológicas somente foram coletados após aprovação do projeto, pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana, como também mediante assinatura do TCLE dos participantes do estudo, tendo como

base a Resolução 466/12 e 510/16 do CNS do Ministério da Saúde, que trata dos aspectos éticos na pesquisa que envolve seres humanos.

Por ser uma pesquisa desenvolvida no SUS, ressalta-se que os pesquisadores se comprometeram com a resolução 580/18 do CNS (que trata das especificidades éticas das pesquisas de interesse estratégico). Este estudo foi autorizada pelos dirigentes das instituições, assegurando então que o atendimento ao usuário não foi prejudicado, independentemente de sua decisão em participar ou não (conforme está evidenciado nos TCLE). Os novos procedimentos adotados (inserção do tecido dentro das fraldas) não impactou negativamente na rotina dos profissionais e não interferiram na prestação dos cuidados essenciais de assistência à saúde ao paciente, além disso, a rotina dos profissionais também não foi alterada. Todos os preceitos administrativos e legais da instituição foram respeitados sem prejuízo das atividades funcionais.

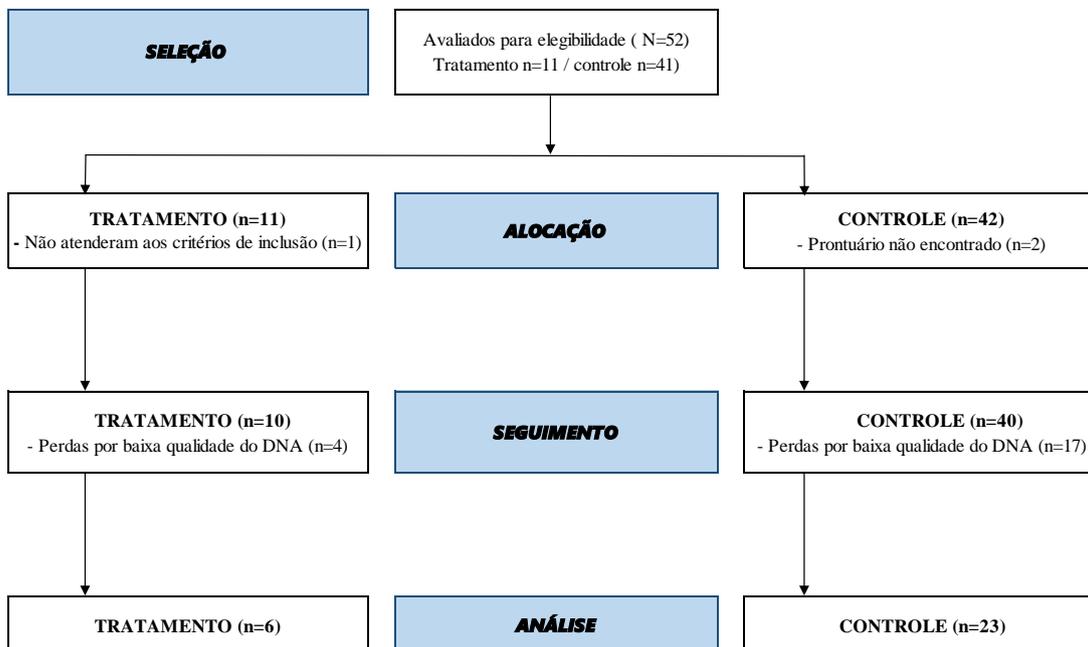
Os dados coletados não foram expostos individualmente, sendo garantido a sua total confidencialidade, sigilo e privacidade. Os procedimentos da pesquisa foram equiparados como as de atenção à saúde, a qual não prejudicaram a rotina das atividades do hospital; e, serão armazenados durante 5 anos, na sala do NUPES e depois destruídos atendendo as normas do CNS. O questionário foi acompanhado de dois TCLE devidamente assinado, simultaneamente ao seu preenchimento, pelo responsável da pesquisa e pela mãe. Vale salientar que os aspectos relacionados à fragilidade emocional que envolve a mãe de prematuro foram levados em consideração, o primeiro contato ocorreu de maneira cuidadosa e respeitosa, com a identificação da equipe e da pesquisa onde ela foi convidada a participar. Os resultados desta pesquisa serão expostos, com retorno à comunidade científica, por meio da elaboração de trabalhos para apresentação em eventos, congressos e a publicação de artigos em revistas científicas.

Esta pesquisa foi registrada na base de dados do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) (registro RBR-3mm7cs) e seguiu todas as orientações do *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT) e na *World Health Organization* (WHO) sob Número de Julgamento Universal (UTN) código U1111-1266-2295.

5 RESULTADOS

O diagrama de fluxo dos participantes da pesquisa, pode ser observado abaixo (Figura 3), além das exclusões justificadas que ocorreram em cada etapa.

Figura 3 – Fluxograma da pesquisa, 2023.



Fonte: Elaboração própria, 2023

Devido a questões éticas, não foi possível testar a hipótese principal do estudo (comparação dos resultados entre os grupos, devido os campos de coleta não apresentarem a mesma casuística). Sendo assim, a análise foi feita nos dois grupos de maneira independente, conforme apresentados abaixo sob forma de três artigos científicos: **Protocolo para coleta, acondicionamento e transporte de amostras fecais de recém-nascidos pré-termos (artigo 1)**, escrito segundo as normas da REVISTA *PLOS ONE*; **Evolução da microbiota intestinal na primeira semana de vida de recém-nascido pré-termo (artigo 2)**, apresentado conforme as normas da REVISTA *PLOS ONE*; **Efeito da imunoterapia orofaríngea de colostro na microbiota intestinal de recém-nascidos pré-termos (artigo 3)**, apresentado conforme as normas de publicação da REVISTA *NUTRIENTS*. Salienta-se que todos os manuscritos serão submetidos em periódicos internacionais reconhecidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

5.1 ARTIGO 1 - PROTOCOLO PARA COLETA, ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS FECAIS DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO

RESUMO

O microbioma intestinal do recém-nascido pode variar com a idade gestacional, a via de parto e o tipo de alimentação. Para análises fidedignas de amostras fecais é fundamental o estabelecimento das etapas: coleta, acondicionamento, transporte e armazenamentos adequados. **OBJETIVO** - Descrever o desenvolvimento de protocolo e testar um algoritmo da sequência de ações e procedimentos de coleta, acondicionamento, transporte e armazenamento de amostras fecais de RN prematuros internados em UTIN. **MÉTODO** - O protocolo foi dirigido a um ensaio clínico controlado não randomizado, conduzido em UTIN de dois hospitais - públicos, conveniados pelo Sistema Único de Saúde de uma cidade de grande porte do interior do Nordeste brasileiro. A metodologia utilizada no seu desenvolvimento seguiu as recomendações do Guia de Elaboração, do Ministério da Saúde do Brasil. **RESULTADOS** - O fluxo das ações e procedimentos foram condizentes com as evidências científicas. A sequência de etapas do processo de trabalho necessárias para implementação do protocolo proposto foi testada e resultou em uma representação gráfica de um algoritmo compatível com a realidade dos hospitais brasileiros da rede pública. **CONCLUSÃO** - O seguimento das etapas do protocolo com descrição das regras de condutas e recomendações quanto à coleta, acondicionamento, transporte e armazenamento de amostra fecal de Recém-Nascido Pré-termos (RNPT), garantiu a preservação e integridade do DNA bacteriano da amostra fecal. O detalhamento das recomendações permitirá sua reprodutibilidade e aprimoramento por profissionais e pesquisadores que tenham semelhantes objetos de estudo.

Keywords: microbiota, colostro, recém-nascido pré-termo, protocolo de ensaio clínico

Trial registration: *World Health Organization* (WHO) sob Número de Julgamento Universal (UTN) código U1111-1266-2295, e sob registro RBR-3mm7cs no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (REBEC).

INTRODUÇÃO

É crescente o interesse em estudar o microbioma, que consiste na coleção de genes abrigados nas células da microbiota¹, que podem interagir com o genoma humano. Esta interação, estabelecida desde o início da vida, influencia o processo saúde-doença, podendo a longo prazo se associar a patologias^{2,3,4}, a exemplo de: asma, obesidade e distúrbios do desenvolvimento neurológico^{2,4}. No período neonatal, destaca-se a importância clínica do

microbioma intestinal para a saúde dos recém-nascido pré-termos (RNPT) na prevenção da enterocolite necrosante^{5,6}.

O microbioma mais estudado até o momento é o do intestino. As diversidades das populações englobam bactérias, fungos, vírus, protozoários, dentre outros, e dependem de predisposição genética, estilo de vida e de exposição, que começa no momento do parto. A biodiversidade dessa comunidade microscópica cresce durante o período de aleitamento materno uma vez que ao final da adolescência, o microbioma que foi se formando na infância tende a se estabilizar. Diversos fatores podem afetar o microbioma do leite humano e consequentemente o microbioma intestinal do recém-nascido (RN), como os maternos: índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional, o modo de parto, uso de antibióticos^{8,9}, ganho de peso durante a gravidez, dieta materna, genética, saúde, diferenças demográficas ou ambientais e uso de bomba para expressão da mama⁸; e os neonatais: uso de antibióticos, tipo de alimentação^{2,10}, alimentação enteral retardada, contato físico retardado ou limitado com a mãe, permanência prolongada em cuidados intensivos neonatais¹⁰, prematuridade^{9,2,10}, infecção infantil ativa⁸ e contato com cavidade oral infantil^{8,11}. Ademais, fatores externos como diferenças nas técnicas de coleta, extração e sequenciamento do DNA podem contribuir para variações na identificação do microbioma do leite⁸ bem como do microbioma intestinal.

Sobre o tipo de alimentação, o estabelecimento da microbiota intestinal saudável do RN pode ser influenciado pela amamentação e modulação imunológica promovida por esta prática^{12,13,14,15}. Embora o leite materno tenha sido inicialmente considerado um fluido estéril e os microrganismos isolados considerados contaminantes externos, atualmente é amplamente aceita a existência de um microbioma exclusivo. A hipótese mais aceita para a origem dessas bactérias no leite materno é pela via enteromamária, que permite a transferência de bactérias não patogênicas do intestino materno via células imunológicas, dendríticas e CD18 para os linfonodos mesentéricos e por fim para a glândula mamária^{8,16,17}.

Existem evidências também de que bactérias específicas do leite materno podem ser transferidas para o intestino do RN, e que influenciam a composição geral da microbiota intestinal¹⁴, com implicações duradouras para a saúde a curto e longo prazo^{10,18,2}. O conhecimento dessa microbiota pode auxiliar na promoção da saúde do RNPT e na prevenção de desfechos clínicos desfavoráveis, evitando sequelas a médio e longo prazo.

Contudo, conhecer o microbioma intestinal não é uma tarefa simples. A coleta das amostras fecais de RNPT constitui-se um desafio, uma vez que esta população apresenta diversas peculiaridades e especificidades que limitam o seu acesso e manuseio. Ademais, o

acondicionamento correto e transporte da amostra fecal com manutenção da cadeia de frio são de suma importância para a preservação e identificação do material genético¹⁹. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo inovador e um algoritmo com representação gráfica da sequência de ações e procedimentos para coleta, acondicionamento e transporte de amostras fecais de RNPT internados em Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTIN).

Os usuários primários pretendidos são os especialistas clínicos neonatologistas, os profissionais de saúde que compõem a equipe multiprofissional de prestadores de cuidados ao RNPT e aqueles que trabalham no laboratório de análises clínicas. Este protocolo tem aplicação para hospitais públicos ou privados, de países de baixa, média e alta renda, que possuam unidades neonatais com atendimento especializado para prematuros, em consonância com as políticas públicas do Ministério da Saúde do Brasil e da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Método

O atual protocolo está vinculado a um ensaio clínico de superioridade, controlado, não randomizado, intitulado “Análise Metagenômica da Microbiota Intestinal de Prematuros em Imunoterapia Orofaríngea com Colostro Atendidos no SUS: Estudo de Intervenção”, conduzido em uma cidade de grande porte localizada no Nordeste do Brasil. A metodologia utilizada no seu desenvolvimento seguiu as recomendações do Guia de Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas, do Ministério da Saúde do Brasil²⁰.

A intervenção consistiu na utilização da Imunoterapia Orofaríngea de Colostro (IOC) mediante protocolo instituído no próprio hospital, iniciada em neonatos com até 72 horas de vida (grupo tratamento). O grupo controle foi constituído por RNPT que não utilizaram a IOC. Para maiores esclarecimentos sobre a intervenção, buscar o artigo Da Cruz Martins e colaboradores, 2020²¹.

Caracterização dos locais de estudo

A unidade hospitalar em que ocorreu a intervenção é uma maternidade pública de médio porte, vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS), credenciada como Hospital Amigo da Criança, desde 1992. Presta serviços às mulheres (durante a gravidez, trabalho de parto, parto e puerpério) e ao recém-nascido. A unidade neonatal está atualmente equipada com oito leitos na UTIN, sete leitos na Unidade Intermediária de Cuidados, e doze leitos são reservados para o Método Canguru²². Conta ainda com atendimento especializado de um Banco de Leite Humano (BLH).

A unidade hospitalar de internamento dos RNPT do grupo controle é considerada de grande porte, inaugurada em 2010, que presta serviços de maternidade, atendimento neonatal e pediátrico de média e alta complexidade. A capacidade de internamento está em 280 leitos, dos quais 154 são ativos, distribuídos em unidades de emergência, urgência e terapia intensiva pediátrica e neonatal, além de unidade ambulatorial e de apoio ao diagnóstico. A unidade neonatal possui 20 leitos de UTIN, sendo 10 leitos na Unidade de Cuidado Intermediário Canguru (UCINCA) e 18 leitos na Unidade de Cuidado Intermediário Convencional (UCINCO)²³.

População, critérios de inclusão e exclusão

A população primária presumida pelas recomendações deste protocolo foi composta por RNPT, com peso ao nascer ≤ 1.500 g, idade gestacional ≤ 36 semanas e internados em UTIN. Os critérios de inclusão foram: RNPT que iniciaram em jejum a IOC, e posteriormente estiveram em dieta exclusiva de leite materno e/ou permaneceram em jejum, e estáveis clinicamente. Os de exclusão foram: a) da mãe – histórico materno de uso de substâncias psicoativas, drogas, álcool, presença de desordem psicológica, gestação múltipla a partir de trigêmeos e filhos de mães contraindicadas para a amamentação (retrovíroses); b) do recém-nascido - uso de medicamento vasopressor $>10\text{mcg/Kg/min}$, requerimento de intervenção cirúrgica imediata, síndromes e /ou malformações congênitas, morbidades neonatais como a incidência de Persistência do Canal Arterial (PCA), sepse ou Enterocolite Necrosante (NEC).

Coleta de amostras fecais

Para a coleta de fezes foi colocado dentro da fralda do neonato pré-termo, ao nascimento, um recorte de um tecido de campo cirúrgico (do tipo fenestrado e estéril), que recobrisse toda a parte interna, com a finalidade de evitar que o conteúdo (amostra fecal) fosse absorvido de modo imediato. O tecido utilizado precisava estar dentro das especificações: estéril e fenestrado. As dimensões indicadas do recorte do tecido foram: 15 centímetros de comprimento por 5 centímetros de largura, tamanho que melhor se ajustou dentro da fralda (proporções que foram adotadas, após a realização de testes com variados tamanhos).

Além disso, a colocação do tecido estéril evita que a parte absorvente da fralda, que é impregnada com sais de bário, criasse um *viés* nos resultados, uma vez que esses são inibidores

de patógenos fecais²⁴. Em todas as trocas do RN eram recolocados novos recortes de campo cirúrgico, pela própria equipe de técnicos que assistiam os RN nos procedimentos de rotina.

Quando o neonato apresentava as dejeções, a fralda era cuidadosamente retirada pela equipe de técnicos de enfermagem/enfermeiros, devidamente paramentados, para que não houvesse contaminação da amostra fecal, e, posteriormente realizada a higienização de rotina no RNPT. Os intervalos entre as trocas aconteciam de acordo com a rotina da própria equipe (aproximadamente de 3 em 3 horas).

O recorte de campo cirúrgico contendo a amostra (o qual estava posicionado dentro da fralda fechada) foi coletado com auxílio da espátula de *ayre* (estéril), e, o conteúdo acondicionado diretamente no tubo *eppendorf* 1,5 mililitro (estéril) com fechamento hermético. Foram coletados 0,75 mililitro de amostra fecal, aproximadamente metade do tubo.

Acondicionamento e armazenamento das amostras fecais

Os microtubos contendo o material fecal coletado eram colocados em rack plástico de armazenagem para evitar tombamentos e encaminhado imediatamente (após a coleta na fralda) para primeiro congelamento em freezer comum (-20° C), localizado na unidade hospitalar, com termômetro digital de cabo extensor para controle de temperatura.

Para manter a durabilidade da qualidade do material, a amostra permanecia por no máximo 12 horas no freezer da unidade hospitalar; e, em seguida era transportada para um ultrafreezer (-80°C) localizado no Laboratório de Análises Microbiológicas da UEFS, onde o congelamento da amostra permaneceria até o processo de extração e sequenciamento do DNA bacteriano das amostras.

Transporte das amostras fecais

O transporte do tubo (congelado) do freezer do hospital para o ultrafreezer da UEFS foi realizado em recipiente isotérmico, higienizável e impermeável, com um termômetro digital de cabo extensor fixado na caixa para controle de temperatura do material transportado, mantendo assim a cadeia de frio.

Ademais, para manter o resfriamento, foi utilizado gelo rígido reciclável (gelox) para transporte em baixas temperaturas evitando assim descongelamento da amostra em algum momento. O gelox foi mantido em freezer por aproximadamente 30 horas antes da utilização para transporte.

O controle de qualidade do DNA foi baseado em delimitações empíricas e por meio de testagem na prática clínica pela ausência de padronizações específicas, e, por não haver revisões sistemáticas norteadoras previamente publicadas sobre a temática em questão.

Avaliação de potenciais riscos

Para a elaboração da presente orientação prática, inicialmente foi implantado um plano piloto que objetivou aferir potenciais riscos, viabilidade, etapas para implantação da rotina sugerida por meio do protocolo prático e vieses de pesquisa. Para tanto, foi necessário realizar o treinamento *in loco* das equipes para a correta execução do protocolo. Realizou-se reuniões com os profissionais dos setores, foram apresentados vídeos, folhetos explicativos e fluxogramas, além disso, as coletas iniciais transcorreram em acompanhamento pela equipe de pesquisadores para garantir que não houvesse dúvidas.

Durante esta etapa, a progressão sequencial das ações foi atentamente observada pela equipe de pesquisadores e o *feedback* dos profissionais foi obtido mediante perguntas abertas sobre o processo. Mesmo com as dificuldades de execução relatadas, não houve necessidade de alteração no algoritmo das ações propostas.

Ainda durante o procedimento para colocação da fralda e do recorte do campo cirúrgico, foi recomendado movimentos leves, sendo suficiente virar o RN um pouco de lado; sem erguer muito as pernas ou o quadril. E, para o fechamento teve-se o cuidado de não fazer pressão na barriga, não deixar a fralda apertada e de não deixar muito volume entre as pernas, para evitar desconforto. Por fim, é importante relatar que o procedimento de troca de fraldas deve ser rápido e o cuidador deverá se atentar para os sinais de desconforto e de perda de calor e/ou agitação pelo RNPT. Vale ressaltar que a higiene do bebê somente era realizada após a coleta das amostras para evitar possíveis contaminações.

Questões éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) sob CAAE número: 16995219.0.0000.0053 e pelo Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos, sob UTN: U1111-1248-6732.

Mães de RNPT foram convidadas a participar da pesquisa nas primeiras 24 horas após o parto, com apoio do serviço de psicologia. Durante a conversa, foram dados esclarecimentos sobre os procedimentos de coleta de dados, da importância dos cuidados intensivos e da alimentação para a recuperação do RNPT. A pesquisa foi conduzida mediante o aceite em

participar (por meio da assinatura do TCLE). Uma vez que inserido na pesquisa, foi colocado aviso na incubadora com alerta para coleta de amostras fecais.

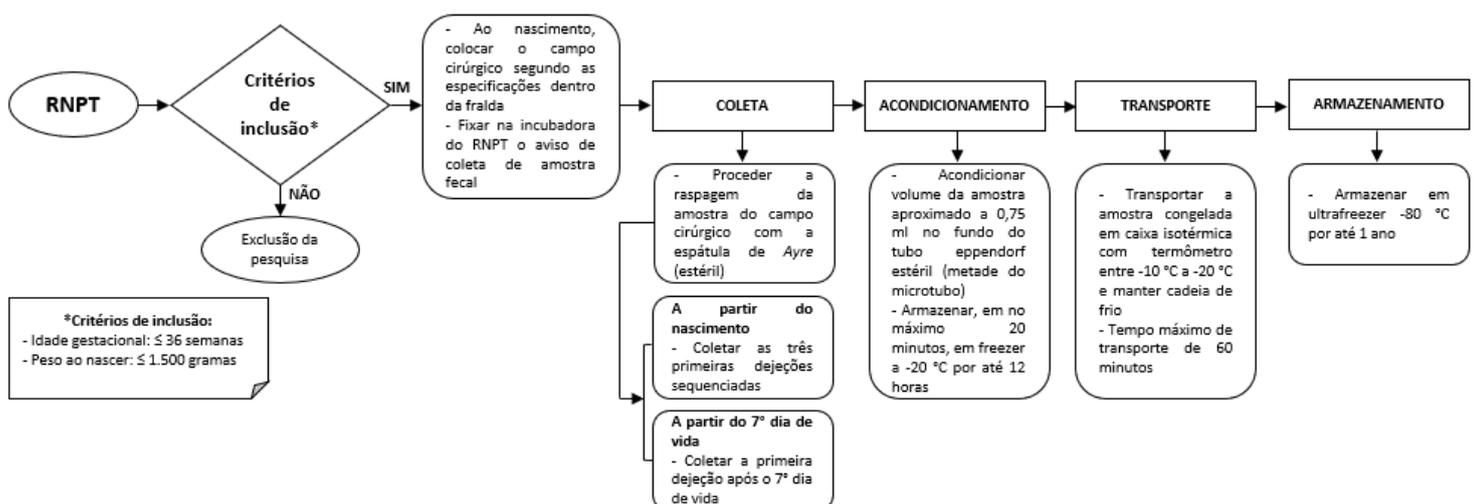
Resultados

Os resultados desta pesquisa constituem na apresentação do algoritmo com as recomendações específicas das etapas do fluxograma e na confirmação da viabilidade do método proposto a partir da manutenção da diversidade da microbiota fecal após análise metagenômica.

Algoritmo

Além da apresentação do protocolo na forma de texto, foi realizada a representação gráfica na forma de algoritmo, com definição da sequência finita do fluxo do processo de trabalho para coleta de amostras fecais, acondicionamento, transporte, armazenamento e extração do material genético (Figura 1). Este instrumento foi desenvolvido a partir dos protocolos operacionais de atendimento dos serviços de saúde, de publicações internacionais²⁵ e orientações do livro de Werneck (2009)²⁶. O aperfeiçoamento do protocolo ocorreu durante a rotina de trabalho da equipe de saúde através da prática diária na implementação dos passos.

Figura 1 – Algoritmo do protocolo de coleta de amostras fecais, acondicionamento, transporte e armazenamento para extração do material genético.



Viabilidade e diversidade da microbiota fecal

A viabilidade e garantia da diversidade da microbiota fecal foi realizada através das etapas de sequenciamento por meio da análise metagenômica. Estudos metagenômicos são comumente realizados analisando o gene 16S ribossômico RNA procariótico (16S rRNA), pois este apresenta menor variação genética entre as espécies, facilitando portando a identificação bacterianas.

Este protocolo descreve um método para sequenciar as regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA. O mesmo foi combinado com um sistema de sequenciamento de bancada, análise primária integrada e análise secundária usando o qiime2, fornecendo um fluxo de trabalho abrangente para sequenciamento de amplicon de rRNA 16S. O fluxo de trabalho foi organizado nas etapas, descritas a seguir:

Na primeira etapa, foi utilizado primers de amplicon. O protocolo inclui as sequências de pares de *primers* para a região V3 e V4 que criam um único amplicon de aproximadamente ~460 bp. O protocolo também inclui sequências de adaptadores pendentes que devem ser anexadas às sequências de pares de *primers* para compatibilidade com o índice *Illumina* e os adaptadores de sequenciamento. Na 1ª etapa foi amplificado a região V3 e V4, usando uma PCR de ciclo limitado

Na segunda etapa, são adicionados adaptadores de sequenciamento *Illumina* e códigos de barras de índice duplo ao alvo do amplicon. Usando o complemento completo dos índices Nextera XT, até 96 bibliotecas podem ser agrupadas para sequenciamento.

Na terceira etapa, foi realizada sequência no qiime2, usando leituras pareadas de 300 bp e reagentes qiime2 v3, as extremidades de cada leitura são sobrepostas para gerar leituras completas de alta qualidade da região V3 e V4 em uma única execução de 65 horas.

Na quarta e última etapa, na análise no MSR ou BaseSpace, o fluxo de trabalho *Metagenomics* foi uma opção de análise secundária incorporada ao qiime2. O *Metagenomics Workflow* realiza uma classificação taxonômica usando o banco de dados *Greengenes* mostrando a classificação em nível de gênero ou espécie em formato gráfico. Entre todas as etapas/processos descritos foram realizadas a purificação (clean up)

Para as análises de bioinformática foi utilizado o *software* QIIME (v. 1.9.1) que permite remover as sequências de barcodes e do *primer*, retirar artefatos quiméricos, efetuar o

alinhamento das sequências, construção da matriz da distância, agrupamento das Unidades Operacionais Taxonômicas (OTU) e para calcular os índices de diversidade.

Após a filtragem e exclusão das sequências quiméricas, estas foram agrupadas em OTU, baseando-se em similaridade de 97% contra o banco de dados SILVA (versão 128). Posteriormente, calculou-se os índices de alfa e beta de diversidade.

Os índices alfa e beta são estimativas de riqueza e diversidade de espécies com base na distância não ponderada UNIFRAC (filogenética) e distância de *Bray-Curtis* (não filogenética). Foi realizado teste PERMANOVA com 999 permutações para testar significância entre os grupos.

Recomendações das etapas do fluxograma

Atualmente, não existem recomendações baseadas em evidências sistematizadas na literatura, portanto recomenda-se fortemente que o presente protocolo prático seja desenvolvido para o público teste do estudo o qual foi testado o algoritmo, RNPT internados em UTIN. No quadro 1 são apresentadas as recomendações que abrangem cada etapa do fluxograma de ações do presente protocolo, no que diz respeito aos recursos bem como os materiais utilizados para o seu desenvolvimento.

Os fatores levados em consideração na formulação das recomendações ocorreram de acordo com a experiência da prática clínica do estudo base (ensaio clínico não randomizado), além de outros aspectos como a viabilidade e a aceitabilidade.

Quadro 1 – Recomendações de cada etapa do fluxograma do protocolo, Feira de Santana, 2021.

Coleta	<p>Ao nascimento - Fixar o aviso na incubadora, sinalizando para a equipe que o neonato foi incluído na pesquisa. A cada dejeção coletada deve-se marcar um “X” nesse aviso fixado na incubadora, com caneta permanente, indicando a realização das coletas.</p> <p>Definição do recorte de tecido cirúrgico - O tecido pode ser de qualquer marca, contanto que seja fenestrado e estéril. O tecido cirúrgico é vendido em diversas dimensões, no entanto, o recorte específico recomendado, deve ser confeccionado pela equipe de pesquisadores adaptado ao tamanho da fralda usada na rotina da UTIN. Para tanto, será necessário nos testes de dimensões, que os pesquisadores usem os equipamentos de proteção individual (touca, luva, máscara e avental); além de utilizar uma tesoura de metal devidamente desinfetada com álcool a 70%. Os recortes devem ser guardados em sacos plásticos do tipo <i>ZipLock</i> com fechamento hermético (desinfetados com álcool a 70%), para evitar contaminação.</p> <p>Dimensões recomendadas do campo - Recomenda-se que o tecido seja recortado nas dimensões: 15 centímetros de comprimento e 5 centímetros de largura. Embora esse protocolo faça recomendações de dimensões específicas, o recorte pode ser adaptado ao tamanho da fralda utilizada no setor.</p> <p>Cuidados ao colocar o recorte cirúrgico - Recomenda-se seguir as dimensões de recorte do tecido para evitar que fique saindo da fralda ou que seja pequeno demais, não sendo capaz de assegurar a coleta de toda amostra. Recomenda-se também que a face do</p>
---------------	--

	<p>tecido que esteja em contato com o neonato seja a atalhada (tendo em vista que o tecido possui duas faces, uma plástica e outra atalhada).</p> <p>Espátulas – Recomenda-se utilizar a espátula de <i>Ayre</i> plástica estéril, que deve ser embalada individualmente, bem como deve ser aberta somente no momento da utilização.</p> <p>Microtubos - Tubo de centrifugação <i>ependorf</i> estéril, 1,5 ml</p> <p>Rack caixa para tubos - Recomenda-se a utilização de caixa rack para armazenamento do microtubo com capacidade de 100 tubos criogênicos de 1,5 ml a 2,0 ml com tampa dobradiça.</p> <p>Tempo de coleta - Após a evacuação, a coleta deve ocorrer em no máximo 3 horas (seguindo fluxo do hospital), para não ocorrer absorção total da amostra pela fralda.</p> <p>Equipamentos de proteção individual (EPI) - Para garantir a qualidade do material coletado, deve ser preconizado a troca de fralda pelos profissionais que estiverem portando o EPI (touca, luvas, avental e máscara).</p> <p>Coleta - A fralda deve ser aberta dentro da própria incubadora. Do mesmo modo, deve-se abrir o rack contendo os microtubos e a espátula de <i>ayre</i>. Em seguida, recolher o material fecal e depositar no microtubo. O tubo deve ser fechado e higienizado (álcool a 70%) e codificado (com caneta que permita escrita permanente). O tubo deve ser encaminhado ao freezer doméstico (-20° C) em no máximo 20 minutos.</p> <p>Caixa da pesquisa – Para guarda do material da coleta de fezes, no setor neonatal foram utilizadas caixa plástica com tampa nas medidas: comprimento: 25,8 cm, largura: 17,8 cm e altura: 8,5 cm.</p>
Acondicionamento	<p>Freezer - Próximo a unidade neonatal, recomenda-se que haja um freezer (vertical ou horizontal) com capacidade de congelamento de até -20° C, para que as amostras sejam acondicionadas (por no máximo 12 horas imediatamente).</p> <p>Termômetro - A temperatura do freezer deve ser controlada com auxílio de um termômetro digital com temperatura máxima e mínima e sensor externo e alarme.</p> <p>Rack caixa para tubos - Recomenda-se que haja uma caixa <i>rack</i> para armazenamento dos microtubos dentro do freezer, para evitar que o tubo vire.</p>
Transporte	<p>Caixa térmica - O transporte do tubo (congelado) do freezer do hospital para o ultrafreezer da UEFS deve ser realizado em recipiente isotérmico, higienizado e impermeável, com um termômetro digital de cabo extensor fixado na caixa para controle de temperatura do material transportado, com manutenção da temperatura entre -10° C a -20° C. Para o transporte das amostras foram utilizadas caixas térmicas de plástico com capacidade de 5 a 6 litros, medindo 20,8 centímetros de comprimento, 21,3 centímetros de largura e 28,3 centímetros de altura.</p> <p>Gelox – Para manter o resfriamento das amostras fecais em baixas temperaturas, foi utilizado o gelo rígido reciclável (gelox) no transporte; evitando assim descongelamento da amostra em algum momento. O gelox foi mantido em freezer por aproximadamente 30 horas antes da utilização. Para o transporte das amostras foram utilizadas duas unidades do gelox, com dimensões: 400 ml, 17 centímetros de comprimento, por 10 de largura e 2,7 centímetros de altura.</p> <p>Rack caixa para tubos - Recomenda-se que haja uma caixa <i>rack</i> para armazenamento do microtubos dentro da caixa térmica, para evitar que o tubo vire. Deve-se sempre utilizar os EPIs para manipulação do tubo.</p>
Armazenamento	<p>Ultrafreezer - O congelamento permanente deve ser realizado em ultrafreezer de congelamento a -80° C. Esses cuidados são importantes para a preservação do material genético.</p> <p>Rack caixa para tubos - Recomenda-se que haja uma caixa <i>rack</i> para armazenamento do microtubos dentro do ultrafreezer, para evitar que os tubos virem. Deve-se sempre utilizar os EPIs nas manipulações do tubo <i>ependorf</i>.</p>

Discussão

Os poucos estudos até então publicados fizeram pouca menção quanto a coleta, transporte e acondicionamento de amostra de fecal, o que possibilitou o surgimento de dúvidas quanto às reais estratégias para a coleta e não contaminação do material por agentes externos.

Esses fatores se apresentaram como limitações que dificultaram a comparabilidade dos resultados; sendo necessário a definição de procedimento e critérios para coleta, acondicionamento, transporte e armazenamento de amostra fecal, de forma a garantir a qualidade do material extraído e viabilizar o sequenciamento genômico do microbioma contido nas amostras.

O presente protocolo adotou rigorosas medidas de controle, no que diz respeito a coleta, acondicionamento, transporte e armazenamento de amostras fecais. A adoção dessas técnicas de controle de qualidade é necessária para a preservação da qualidade do DNA e evitar que haja fragmentação deste, ou o crescimento excessivo de bactérias aerotolerantes²⁷ contaminantes da amostra, com prejuízo para extração do material genético e também para a análise metagenômica futura.

O cuidado com o material a ser analisado deve ocorrer desde o primeiro passo do processo. No que tange a coleta de amostras fecais com auxílio de instrumentos estéreis, dentro da própria incubadora do RNPT, com acondicionamento imediato em microtubos também esterilizados, diminuem os riscos relacionados à contaminação da amostra.

Outros pontos importantes a serem considerados nos protocolos que requerem criopreservação são o tempo e as condições de armazenamento até o congelamento, bem como o próprio processo de congelamento. Assim, na segunda etapa (acondicionamento), com objetivo de interromper os processos biológicos de degradação e de dano celular, as amostras logo que coletadas, foram congeladas em até 10 minutos em freezer doméstico (-20°C), local em que permaneceram congeladas por no máximo 12 horas, até serem transportadas para o laboratório.

No transporte das amostras fecais até o acondicionamento no ultrafreezer do laboratório foi fundamental o gerenciamento da cadeia de frio, evitando o descongelamento indesejado. Para tanto, foram transportadas em caixas de resfriamento com elementos essenciais para manter a temperatura, como pacotes de gelo e dispositivos de registros, e o termômetro digital²⁷. Outro fator relevante foi o tempo de transporte, que não ultrapassou 60 min, pois a maioria dos eventos de descongelamento ocorre durante o transporte da amostra²⁷.

Na etapa de armazenamento, as amostras fecais foram recebidas no laboratório, identificadas e imediatamente congeladas em ultrafreezer a -80°C. Os meios de criopreservação são de uso padrão devido à sua capacidade de garantir a viabilidade e a recuperação da atividade celular. Essas medidas são fundamentais nas tecnologias baseadas em sequenciamento para a determinação do microbioma. No entanto, a padronização dos métodos orienta os técnicos e

pesquisadores e possibilita conclusões mais robustas e comparáveis entre os estudos que envolvem coleta de material biológico para extração de DNA/RNA ou qualquer outro trabalho experimental que visem o estudo de microbioma^{19,28}. Reitera-se assim, as vantagens de se seguir um protocolo padrão com etapas previamente testadas²⁷.

A definição do atual protocolo, sem dúvida, contribuirá para reduzir riscos para a segurança dos pacientes, profissionais de saúde envolvidos no cuidado de RNPT e as respectivas mães, além de manter a qualidade do material coletado com integridade do DNA bacteriano em análise para a identificação das espécies presentes no trato intestinal. Além disso, as descrições sobre os procedimentos utilizados, norteiam e facilitam outros estudos instituídos para as mesmas circunstâncias, ampliando a comparabilidade dos resultados e contribuindo para consolidação da construção desse conhecimento.

A principal limitação no desenvolvimento do atual pesquisa foi a carência de estudos robustos sobre coleta, acondicionamento, transporte e armazenamento de amostras fecais, para o embasamento do protocolo. Outras limitações se referem às dificuldades durante a implementação, a exemplo de problemas relacionados à aplicação prática do protocolo, no que se refere a adaptação e integração dos profissionais às etapas do novo fluxo da prática clínica. Para contornar esse fator, foi necessária a realização de treinamento e educação continuada com produção e divulgação de vídeos explicativos, com intuito de sensibilizar a equipe de saúde. Como facilitador, cita-se a colaboração de alguns profissionais integrantes da equipe de saúde, que assumiram o papel de fíeis colaboradores em perfeita comunicação com a equipe de pesquisa, sobretudo no que diz respeito a captação das amostras fecais e garantia de sua preservação até o transporte pelos responsáveis.

Conclusões

Um protocolo com descrição minuciosa das etapas, regras de conduta e recomendações quanto à coleta, acondicionamento, transporte e armazenamento de amostras fecais poderá garantir a preservação e integridade do DNA do microbioma intestinal do RNPT, uma vez que é necessário um rigoroso controle de todas as etapas do processo para garantir a inocuidade e redução dos fatores externos que possam eventualmente contaminar a amostra: ambiente externo à incubadora, mão do manipulador, temperatura inadequada de armazenamento e de transporte que podem interferir na integridade e tipo de espécie identificada no microbioma. Ademais, a construção de um algoritmo poderá contribuir e facilitar as etapas do processo de trabalho, bem como a replicação do estudo por outros serviços de saúde.

Destaca-se nesse estudo, o pioneirismo em elaborar um protocolo de coleta de amostra fecal de RNPT MBP submetido à IOC, além de definir um algoritmo, que norteia o fluxo do processo de trabalho da equipe de saúde em hospital público do Nordeste do Brasil, que poderá ser utilizado pelos profissionais de saúde ou pesquisadores em eventuais circunstâncias que tenham como intuito manter a qualidade do material coletado e a integridade do DNA bacteriano, para identificação das espécies presentes no trato intestinal. Os resultados da pesquisa podem ser aplicados e generalizados para outros serviços de saúde, públicos ou privados.

Referências

1. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev.* 2012;70 Suppl 1(Suppl 1):S38-S44. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x
2. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews.* 2017 Dec 1;81(4).
3. Mohajeri MH, Brummer RJM, Rastall RA, Weersma RK, Harmsen HJM, Faas M, et al. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *Eur J Nutr.* 2018 May;57(Suppl 1):1-14. doi: 10.1007/s00394-018-1703-4.
4. Turrone F, Milani C, Duranti S, Lugli GA, Bernasconi S, Margolles A, et al. The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being. *Ital J Pediatr.* 2020 Feb 5;46(1):16. doi: 10.1186/s13052-020-0781-0.
5. Underwood MA. Impact of probiotics on necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.* 2017 Feb;41(1):41-51. doi: 10.1053/j.semperi.2016.09.017. Epub 2016 Nov 8.
6. Garofalo NA, Caplan MS. Oropharyngeal Mother's Milk: State of the Science and Influence on Necrotizing Enterocolitis. *Clin Perinatol.* 2019 Mar;46(1):77-88. doi: 10.1016/j.clp.2018.09.005. Epub 2018 Dec 13.
7. Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients.* 2020 Apr 9;12(4):1039. doi: 10.3390/nu12041039.
8. Asbury MR, Butcher J, Copeland JK, Unger S, Bando N, Comelli EM. et al. Mothers of Preterm Infants Have Individualized Breast Milk Microbiota that Changes Temporally Based on Maternal Characteristics. *Cell Host Microbe.* 2020 Nov 11;28(5):669-682.e4.

9. Demmelmair H, Jiménez E, Collado MC, Salminen S, McGuire MK. Maternal and Perinatal Factors Associated with the Human Milk Microbiome. *Curr Dev Nutr*. 2020 Mar 9;4(4):nzaa027. doi: 10.1093/cdn/nzaa027.
10. Williams JE, Carrothers JM, Lackey KA, Beatty NF, Brooker SL, Peterson HK, et al. Strong Multivariate Relations Exist Among Milk, Oral, and Fecal Microbiomes in Mother-Infant Dyads During the First Six Months Postpartum. *J Nutr*. 2019 Jun 1;149(6):902-914. doi: 10.1093/jn/nxy299.
11. Walker WA, Iyengar RS. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr Res*. 2015 Jan;77(1-2):220-8. doi: 10.1038/pr.2014.160. Epub 2014 Oct 13.
12. Ho NT, Li F, Lee-Sarwar KA, Tun HM, Brown BP, Pannaraj PS, et al. Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nat Commun*. 2018 Oct 9;9(1):4169. doi: 10.1038/s41467-018-06473-x.
13. Fehr K, Moossavi S, Sbihi H, Boutin RCT, Bode L, Robertson B, et al. Breastmilk Feeding Practices Are Associated with the Co-Occurrence of Bacteria in Mothers' Milk and the Infant Gut: the CHILD Cohort Study. *Cell Host Microbe*. 2020 Aug 12;28(2):285-297.e4. doi: 10.1016/j.chom.2020.06.009. Epub 2020 Jul 10.
14. Martín-Álvarez E, Diaz-Castro J, Peña-Caballero M, Serrano-López L, Moreno-Fernández J, Sánchez-Martínez B, et al. Oropharyngeal colostrum positively modulates the inflammatory response in preterm neonates. *Nutrients*. 2020 Feb;12(2):413.
15. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):1-10. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.001. Epub 2012 Sep 10.
16. Jeurink, P.v. et al. Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*, [s.l.], v. 4, n. 1, p.17-30, mar. 2013. Wageningen Academic Publishers. <http://dx.doi.org/10.3920/bm2012.0040>.
17. Gregory KE, Samuel BS, Houghteling P, Shan G, Ausubel FM, Sadreyev RI, et al. Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. *Microbiome*. 2016 Dec;4(1):1-5.
18. Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, et al. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol*. 2012 Jul 30;12:158. doi: 10.1186/1471-2180-12-158.
19. Brazil. Ministério da Saúde. Guia de elaboração: escopo para protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas do Ministério da Saúde., 2015. Acesso em 20 de jun 2022.

- Disponível em: <
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_elaboracao_protocolos_delimitacao_escopo_2ed.pdf>
20. Martins CC, Ramos MSX, Amaral MVC, Costa JSP, Cerqueira ES, Vieira TO, et al. Colostrum oropharyngeal immunotherapy for very low birth weight preterm infants: protocol of an intervention study. *BMC Pediatrics*. 2020; 20:371. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-02266-8>
 21. Brazil. Ministério da Saúde. DATASUS. Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde. Acesso em 04 fev 2022. Disponível em: <http://cnes2.datasus.gov.br/Mod_Sipac.asp?VCo_Unidade=2910802799278>
 22. Brazil. Secretaria da Saúde do Estado da Bahia. Hospital Estadual da Criança, 2021. Acesso em 10 de abril 2021. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/hospital/hec/>>
 23. Gemelli, T. Manual prático de Microbiologia clínica. Unisinos, 2020.
 24. Mandal RS, Saha S, Das S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13 (2015) 148–158.
 25. Werneck MAF, de Faria HP, Campos KFC. Protocolos de cuidado à saúde e de organização do serviço [Internet]. Ufmg. Belo Horizonte: Nescon/UFMG/ Coopmed; 2009. p. 84. Available at: <https://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/3914.pdf>.
 26. Vandeputte D, Tito RY, Vanleeuwen R, Falony G, Raes J. Practical considerations for large-scale gut microbiome studies. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 Aug 1;41(Supp_1):S154-S167. doi: 10.1093/femsre/fux027.
 27. Gorzelak MA, Gill SK, Tasnim N et al. Methods for improving human gut microbiome data by reducing variability through sample processing and storage of stool. *PLoS One* 2015;10:1–14.

5.2 ARTIGO 2 - EVOLUÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NA PRIMEIRA SEMANA DE VIDA DE RECÉM-NASCIDO-PRÉ-TERMO

RESUMO

Objetivou-se avaliar a evolução da microbiota intestinal na primeira semana de vida de recém-nascidos pré-termos, atendidos em hospital público de um município do Nordeste brasileiro. Métodos - Trata-se de um estudo observacional, longitudinal e descritivo, com 23 recém-nascidos pré-termos (RNPT). Foram coletadas 2 amostras fecais de cada neonato durante a 1ª semana de vida, para análise da microbiota fecal por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram realizadas análises de alfa diversidade (*Chao1*, *Shannon e Simpson*) e análise de coordenadas principais de beta diversidade. Resultados - A evolução da microbiota apresentou-se dinâmica e com baixa diversidade. Embora tenha sido encontrada associação estatística com gêneros *Enterobacterales*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*, houve grande dominância do gênero *Staphylococcus*, possivelmente relacionada a prevalência de nascimentos por parto cesáreo, microbiota característica do leite materno e da cavidade oral das crianças, além de outros fatores desconhecidos. Conclusão - Identificar, precocemente, a composição da microbiota intestinal de RNPT é importante por apresentarem repercussões a curto e longo prazo na qualidade de vida destes neonatos.

Palavras-chave: recém-nascidos pré-termos; microbiota; 16S rRNA

Introdução

O microbioma intestinal é um ecossistema microbiano que está envolvido em múltiplas interações com o hospedeiro e tem papel fundamental na manifestação precoce de doenças [1], a exemplo da enterocolite necrotizante [2] e em manifestações mais tardias como doenças atópicas [3,4]: asma, doença inflamatória intestinal, distúrbios metabólicos [1,5,4], diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e distúrbios neurológicos [5].

O mutualismo entre hospedeiros e sua microbiota está bem documentado, especialmente no intestino [7]. Esta interação começa antes do nascimento, no ambiente uterino, tempo em que fatores externos podem afetar a composição da microbiota materna; e, conseqüentemente a transmissão desta para o concepto, após o parto. No nascimento, vários fatores afetam a

composição da microbiota intestinal, como o tipo de parto (cesariana *versus* vaginal), uso de antibióticos (mãe, bebê ou ambos), uso de leite materno *versus* alimentação artificial, introdução da alimentação complementar e o desmame [7]. À medida que a criança cresce, a microbiota continua a se desenvolver e influenciar a saúde ao longo da vida [1], até sua estabilidade em torno de 18 a 24 meses [8].

Outro fator importante no estabelecimento da microbiota intestinal infantil é a idade gestacional ao nascer. Estudos têm demonstrado diferenças na microbiota fecal de recém-nascidos pré-termos (RNPT) e a termo [1]. Os RNPT necessitam superar sérios desafios de saúde, por terem um intestino imaturo, pois apresentam problemas imunológicos, respiratórios e neurológicos, além de exposição a antibióticos e outros tratamentos medicamentosos. Esses recém-nascidos tem geralmente internações hospitalares prolongadas, fazem uso de respirador e são alimentados artificialmente ou parenteral. Esse ambiente atípico de cuidados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) interfere negativamente no padrão natural de aquisição e desenvolvimento da microbiota intestinal [9,1].

Uma microbiota intestinal saudável é importante, uma vez que os microrganismos que habitam o intestino humano exercem diversas funções fisiológicas, como absorção de nutrientes e minerais, fermentação de fibras em ácidos graxos de cadeia curta, síntese de vitaminas, quebra de componentes tóxicos, desempenho na barreira intestinal e regulação do sistema imunológico [9]. Essas funções são fundamentais sobretudo para a saúde do prematuro.

Embora a interação microbiota-hospedeiro ocorra durante todo o período da vida, ela é notadamente importante no nascimento, quando alterações em sua composição podem ter consequências em estágios posteriores, com aumento de risco de vários distúrbios metabólicos ou imunológicos [7]. Por isso, os complexos fatores intrincados no estabelecimento da microbiota intestinal neonatal têm ganho interesse nos últimos anos. Neste sentido, o atual estudo tem como objetivo avaliar a evolução da microbiota intestinal na primeira semana de vida de recém-nascidos pré-termos, atendidos em hospital público de um município do Nordeste brasileiro.

Métodos

Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo descritivo de um grupo de RNPT, vinculado a um ensaio clínico de superioridade, controlado, não randomizado, intitulado “Análise Metagenômica da Microbiota Intestinal de Prematuros em Imunoterapia Orofaríngea com Colostro Atendidos no

SUS: Estudo de Intervenção”, conduzido em uma cidade de grande porte localizada no Nordeste do Brasil, aprovado sob CAAE número: 16995219.0.0000.0053 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e pelo Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos, sob UTN: U1111-1248-6732. Mães de RNPT foram convidadas a participar da pesquisa nas primeiras 24 horas após o parto, com apoio do serviço de psicologia.

Amostra

Foram incluídos todos os RNPT atendidos no Hospital Estadual da Criança (HEC), localizado em Feira de Santana (cidade de nível médio metropolitana situada no estado da Bahia, Brasil); cujos nascimentos ocorreram no ano de 2021 e atendiam aos critérios de elegibilidade: peso ao nascer $\leq 1.500\text{g}$, ≤ 36 semanas de idade gestacional, em dieta zero por via oral e enteral ou em uso de Nutrição Parenteral Total (NPT) e/ou a administração enteral de leite materno (pasteurizado) do Banco de Leite do hospital.

Coleta de amostras fecais

Na primeira semana de vida, foram coletadas duas amostras de cada RNPT, sendo uma dessas correspondente a primeira dejeção (mecônio) com o neonato ainda em jejum; e, a outra no 7º dia de vida. A coleta na unidade neonatal ocorreu em todos os dias da semana.

A coleta ocorreu por meio de um protocolo específico com finalidade de preservar espécies bacterianas existentes, bem como a qualidade do DNA metagenômico. Neste sentido, logo após o nascimento foi colocado dentro da fralda do neonato, recorte de tecido de campo cirúrgico (fenestrado e estéril), com a finalidade de evitar que o conteúdo fecal fosse absorvido pela fralda. Assim que o neonato eliminasse as dejeções, a fralda era cuidadosamente retirada por um técnico de enfermagem/enfermeiro, devidamente paramentado, para que não houvesse contaminação da amostra, com auxílio da espátula de *ayre* (estéril) foi acondicionada em tubo *ependorf* 1,5 ml (estéril) com fechamento hermético e que recebeu um código referente aos respectivos RN.

As amostras fecais foram mantidas congeladas a -20°C (por no máximo 12 horas) e transportadas, por um membro da equipe de pesquisa, respeitando a preservação da rede de frio, até a armazenagem em ultrafreezer (-80°C), no laboratório de microbiologia da UEFS, por no máximo 1 ano. Informações adicionais sobre a coleta das amostras fecais estão disponíveis em um manuscrito ainda não publicado.

As informações referentes ao neonato foram registradas em uma planilha específica para este fim, que ficava no setor neonatal, com anotação do responsável pelo procedimento de coleta. Durante a primeira semana de vida, além dos cuidados convencionais, todas as crianças receberam dieta por sonda orogástrica com leite materno doado (banco de leite humano da própria unidade).

Variáveis

As variáveis maternas pesquisadas foram: idade materna (<18/≥18 anos), raça/cor autorreferida (branco/não-branca), situação conjugal (com companheiro/sem companheiro), trabalho materno (remunerado/não remunerado), local de residência (urbana/rural), paridade (primípara/multípara), número de consulta pré-natal (<6/≥6), tipo de parto (cesárea/vaginal), diabetes gestacional (não/sim), hipertensão gestacional (não/sim), tabagismo (não/sim), infecção por coronavírus (não/sim), infecção urinária (não/sim), doença renal crônica (não/sim) e sífilis materna (não/sim). As variáveis referentes ao prematuro foram: idade gestacional (<28 semanas/≥28 semanas), sexo (feminino/masculino), peso ao nascer (gramas e extremo baixo peso/muito baixo peso), uso de antibióticos (sim/não), tipo de oxigenoterapia (não-invasiva/invasiva), óbito (não/sim), causa de óbito, tempo para iniciar a dieta enteral (< 24 horas/≥24 horas), tempo de nutrição parenteral (dias), peso no sétimo dia de vida (gramas), exposição a infecções TORCHS (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes simples, Sífilis) (não/sim) e Doença da Membrana Hialina (DMH) (não/sim).

Extração de DNA

O DNA total das amostras de fezes coletadas foi extraído com o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), segundo as normas do fabricante. O sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspendido em 1000µL de buffer Tris EDTA (10mM Tris-HCl [pH 7,5], 1mM EDTA [pH 7,6]). A suspensão foi então centrifugada a 15.700g por 15 min. As amostras foram então lisadas em 200µL de buffer TELS (lisozima 20mg/ml: 1M Tris-HCl [pH 7,5], 0,5M EDTA [pH 8,0], 20% sucrose), e então foram incubadas por 60 minutos à 37°C. Os próximos passos seguiram as instruções do fabricante.

Após extração, as amostras de fezes foram armazenadas a -80°C até a próxima etapa de quantificação do DNA total pelo equipamento *Qubit Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Sequenciamento das amostras

Amplificação do domínio V4 do gene 16S rRNA

A caracterização da microbiota fecal dos recém-nascidos foi realizada pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, que foi selecionado a partir do trabalho realizado por Kozich e colaboradores [10]. O comprimento total de sequências iniciadoras utilizando a nomenclatura de nucleótidos IUPAC padrão, para seguir o protocolo para esta região foram: V4 *forward primer* (5'- TCG TCG GCA GCC AGT GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GT - 3') e V4 *reverse primer* (5'- GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT - 3'). Para a amplificação das sequências alvo, foram utilizados 5µl de DNA microbiano (10ng/µl), em volume total de 25µl. A reação foi realizada nas seguintes condições: ativação da enzima 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos, extensão 68°C por 45 segundos, 68°C por 2 minutos; e, finalmente a enzima foi mantida a 4°C. Adicionalmente, um controle negativo da reação de PCR e um controle negativo dos reagentes do kit de extração de DNA foram utilizados. Para verificar se o PCR amplificou o tamanho esperado após utilizar os pares de *primer* V4 no protocolo, foi utilizado 1µl do produto em eletroforese com gel de agarose à 1%.

A amplificação inicial foi realizada em duas etapas e posteriormente todos os procedimentos foram executados seguindo o protocolo do fabricante (*Illumina-16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*). O tamanho do fragmento alvo é de 250pb e 412pb após a indexação dos adaptadores. Utilizamos os adaptadores Nextera XT e kit de 21 reagentes para sequenciamento V2 500 ciclos. Posteriormente, as amostras foram sequenciadas utilizando a plataforma *Illumina MiSeq*® de acordo com as instruções do fabricante.

Análise da microbiota por ferramentas de bioinformática

Após a obtenção das sequências, as bibliotecas 16S rRNA obtidas foram analisadas através do *software* QIIME v.2-2020.2 [11]. *Denoising* foi realizado com a ferramenta DADA2 [12]. As sequências diretas foram então truncadas na posição 251 nucleotídeos, enquanto as reversas foram truncadas nos 250 nucleotídeos, a fim de descartar as posições para as quais a qualidade mediana dos nucleotídeos era inferior a Q30. Amostras com menos de 1000 sequências também foram excluídas de análises posteriores.

A taxonomia foi atribuída utilizando ASVs (*Amplicon Sequencing Variant*) através do recurso *q2-featureclassifier* [13] e o classificador de taxonomia Bayes *naive classifysklearn*,

comparando as ASVs obtidas contra o banco de dados de referência SILVA 132 [14]. As análises subsequentes foram realizadas no *software SPSS* versão 26 e *R Studio* versão 4.0.4, usando os pacotes *phyloSeq* [15], *vegan* [16], *microbiome* [17] e *ggplot2* [18].

Análise estatística

As análises foram realizadas no *software SPSS* versão 26 e o ambiente de programação *R Studio*. Avaliou-se os índices de riqueza de *Chao1*, índice de diversidade de *Shannon*, índice de dominância de *Simpson* e a diferença nos 15 gêneros bacterianos mais abundantes em todas as amostras de fezes, além da análise da beta diversidade. Todas as análises avaliaram o efeito do tempo na microbiota intestinal e compara os diferentes períodos de tempo.

Apresentou-se as medidas descritivas como média e desvio padrão para as variáveis numéricas e frequências absolutas e relativas para as variáveis categóricas. Para verificar as variações no tempo, primeiro avaliou-se a adesão à normalidade por meio do teste *Shapiro-Wilk*. Na sequência, utilizou-se o teste não paramétrico de *Wilcoxon rank sum exact test*, que é similar ao teste *t de Student* para duas amostras relacionadas. Adotou-se nível de significância de $p < 0,05$.

Os cálculos para os índices de alfa diversidade (*Chao1*, *Shannon*, *Simpson*) foram realizados por meio da análise com o *Generalized Estimating Equations* (GEE). Os modelos foram avaliados considerando as distribuições gamma ou linear e a função de ligação *identity*. A matriz de correlação foi variada entre independente, AR, *unstructured e exchangeable*. Para a escolha do melhor modelo, considerou-se o menor valor de *Quasi likelihood under Independence Criterion* (QIC). Também foi avaliada a melhor aderência dos resíduos, utilizando o gráfico Q-Q plot.

Na análise de beta diversidade, o *software Microbiome Analyst* foi utilizado [19] para observar as diferenças intra e entre os grupos em todas as amostras. O teste PERMANOVA foi realizado para cada variável, utilizando as distâncias weighted e unweighted UniFrac. Foram realizadas 999 permutações para cada variável. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Realizou-se a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), que é uma representação gráfica que permite a análise de dados multidimensionais em um plano bidimensional. Essa técnica avalia as diferenças entre os grupos de comparação e estabelece semelhanças e diferenças entre as comunidades bacterianas. A PCoA utiliza as matrizes de distâncias UniFrac

ponderada ou não para visualizar as informações. Essas matrizes representam as estruturas das comunidades bacterianas e mostram como elas se comportam em diferentes condições.

Deposição de dados

Os dados da sequência foram depositados no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob o *BioProject* ID PRJNA762545.

Resultados

Foram coletadas 80 amostras de fezes de 40 RNPT para análise da microbiota intestinal. Após a análise bioinformática, 34 amostras foram excluídas (17 crianças) por apresentarem baixa contagem de leituras do DNA (<1000 leituras). Destas, 46 amostras de 23 neonatos foram analisadas e sequenciadas. As características descritivas das mães e de RNPT do estudo encontram-se nas tabelas 1 e 2. As características maternas estão apresentadas na tabela 1. A idade média da mãe foi de $28,8 \pm 9,3$ anos, a maioria referiu-se como não-branca, situação conjugal com companheiro estável, realizaram menos que seis consultas pré-natais, tipo de parto cesáreo e residiam na área urbana. Quanto às comorbidades/infecções relatadas foram: Diabetes *Mellitus* (DM), Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), sífilis materna, infecção urinária, Doença Renal Crônica (DRC) e infecção por coronavírus (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística descritiva de mães de recém-nascidos pré-termos na primeira semana de vida, 2023.

Variáveis	N (%)
Idade materna	23
≥ 18 anos	21 (91,3)
< 18 anos	2 (8,7)
Raça/cor autorreferida	23
Branca	1 (4,3)
Não branca	22 (95,7)
Situação conjugal	20
Com companheiro	11 (55)
Sem companheiro	9 (45)
Local de residência	23
Urbana	18 (78,3)
Rural	5 (21,7)
Paridade	18

Múltipara	9 (50)
Primípara	9 (50)
Número de consultas pré-natal	16
≥6 consultas	4 (25)
<6 consultas	12 (75)
Tipo de parto	23
Vaginal	11 (47,8)
Cesáreo	12 (52,2)
Diabetes gestacional	23
Não	21 (91,3)
Sim	2 (8,7)
Hipertensão gestacional	23
Não	17 (74)
Sim	6 (26)
Tabagista	23
Não	22 (91,3)
Sim	1 (4,4)
Infecção por coronavírus	23
Não	22 (95,6)
Sim	1 (4,4)
Infecção urinária	23
Não	21 (91,3)
Sim	2 (8,7)
Doença renal crônica	23
Não	22 (95,6)
Sim	1 (4,4)
Sífilis materna	23
Não	22 (95,6)
Sim	1 (4,4)

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

As características dos neonatos estão descritas na tabela 2. A média de peso ao nascer foi de $1055,2 \pm 224,2$ gramas, sendo 52,2% classificados como de Muito Baixo Peso (MBP); o peso médio no sétimo dia de vida foi de $1010,9 \pm 208,7$ gramas. A maioria tinha idade gestacional ≥ 28 semanas, com média $29,09 \pm 2,6$ semanas, fizeram uso de antibióticos (87%) e uso de oxigenoterapia invasiva por ventilação mecânica (60,9%). Quanto à nutrição todos os

recém-nascidos receberam dieta por sonda orogástrica com leite humano de banco de leite da própria unidade hospitalar. O tempo médio para início da dieta enteral foi $1,66 \pm 1,45$ dias e o tempo médio de nutrição parenteral foi de $6,04 \pm 1,63$ dias. As principais morbidades informadas nos prontuários foram: doença da membrana hialina e exposição à sífilis. Três foram a óbito por infecção (pneumonia e septicemia).

Tabela 2. Estatística descritiva de recém-nascidos pré-termos na primeira semana de vida, 2023.

Variáveis	Média ± Desvio Padrão	N (%)
Sexo do recém-nascido		23
Feminino	-	12 (52,2)
Masculino	-	11 (47,8)
Idade gestacional		23
≥ 28 semanas	-	13 (56,6)
<28 semanas	-	10 (43,5)
Idade gestacional (semanas)	29,09 ± 2,6	-
Peso ao nascer (gramas)	1055,2 ± 224,2	-
Peso ao nascer		23
≤ 1500 > 1000 gramas (MBP)*	-	12 (52,2)
< 1000 gramas (EBP)*	-	11 (47,8)
Uso de antibióticos		23
Não	-	3 (13)
Sim	-	20 (87)
Tipo de oxigenioterapia		23
Não invasiva	-	9 (39,1)
Invasiva	-	14 (60,9)
Óbito		23
Não	-	20 (87)
Sim	-	3 (13)
Exposição a TORCHS**		23
Não	-	21 (91,3)
Sim	-	2 (8,7)
Doença da Membrana Hialina (DMH)		23
Não	-	19 (82,7)
Sim	-	4 (17,3)

Tempo para iniciar a dieta enteral (dias)	1,66 ± 1,45	-
Tempo de nutrição parenteral (dias)	6,04 ± 1,63	-
Peso no dia 7 (gramas)	1010,9 ± 208,7	-

*MBP = muito baixo peso; EBP= extremo baixo peso.

**TORCHS: toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes simples, sífilis

Alfa diversidade

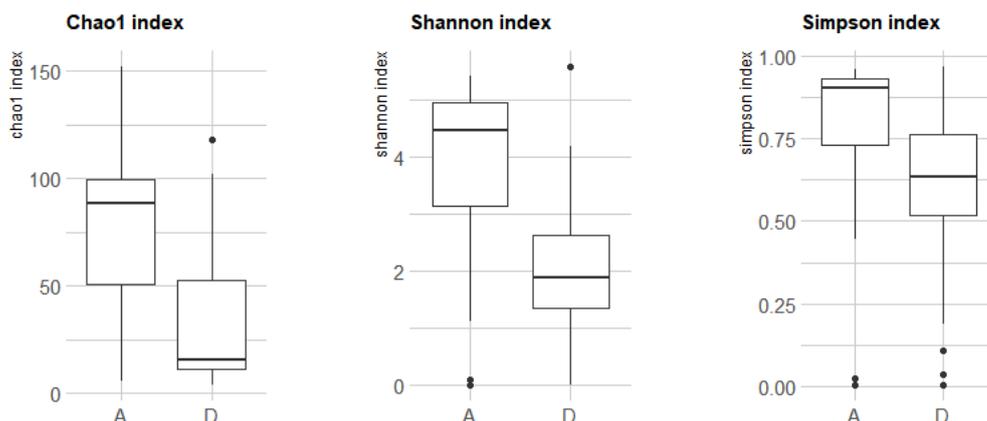
Os índices de alfa diversidade (*Chao1*, *Shannon* e *Simpson*) em relação ao tempo (T0 - primeira amostra coletada / T1 - amostra coletada ao 7º dia de vida) foram calculados para estimar a riqueza de espécies nas amostras. As vantagens dos índices de diversidade é a possibilidade de concentrar numa mesma medida, duas métricas da comunidade (riqueza e equabilidade).

O cálculo do Índice de *Shannon*, um dos parâmetros que permite avaliar a diversidade biológica e possui como métricas a riqueza (números de espécies) e a equabilidade (uniformidade entre as abundâncias relativas das espécies presentes na comunidade amostrada). Os resultados dos índices de alfa diversidade (*Chao1*, *Shannon* e *Simpson*) em relação ao tempo (T0 - primeira amostra coletada / T1 - amostra coletada ao 7º dia de vida) estão na Figura 1.

O índice de riqueza de espécies raras e equalidade de *Chao1* demonstrou diminuição de médias de T0 para T1, com significância estatística ao longo do tempo na primeira semana de vida ($p=0,006$), ao nível de significância de 5%. O índice de diversidade de *Shannon* demonstra uma redução significativa da microbiota, quando comparado T0 (primeira amostra coletada) com a T1 (amostra coletada ao 7º dia de vida) (4,46 vs. 1,88; $p < 0,001$) (Figura 1). Já o índice de diversidade de *Simpson* varia de 0 a 1 e mede a probabilidade de dois indivíduos retirados ao acaso da comunidade pertencerem a mesma espécie, 0 (zero) representa diversidade infinita e 1 nenhuma diversidade. Os resultados indicam diferenças estatisticamente significantes quanto ao índice de *Simpson* em T0 quando comparado com T1 (0,90 vs. 0,63; $p = 0,001$) (Figura 1).

As análises das amostras entre a primeira coleta e a última coleta (já iniciada a dieta enteral) demonstraram que embora tivesse sido encontrado em todos os testes diversidade biológica, estes apresentavam tendência de diminuição da diversidade alfa (*Shannon* 4,46 vs 1,88; *Chao1* 76,7 vs 36,9; *Simpson* 0,90 vs 0,63).

Figura 1. Índices de Diversidade *Chao 1*, *Shannon* e *Simpson* na primeira semana de vida de Recém-Nascidos Pré-termos.



A. Semana T0 – amostra mecônio

D. Semana T1- amostra coletada ao 7º dia de vida

Chao1 index-*p-value*¹ 0.006

Shannon index - *p-value*¹ <0.001

Simpson index - *p-value*¹ 0.001

¹ Wilcoxon rank sum exact test; Wilcoxon rank sum test

Beta diversidade

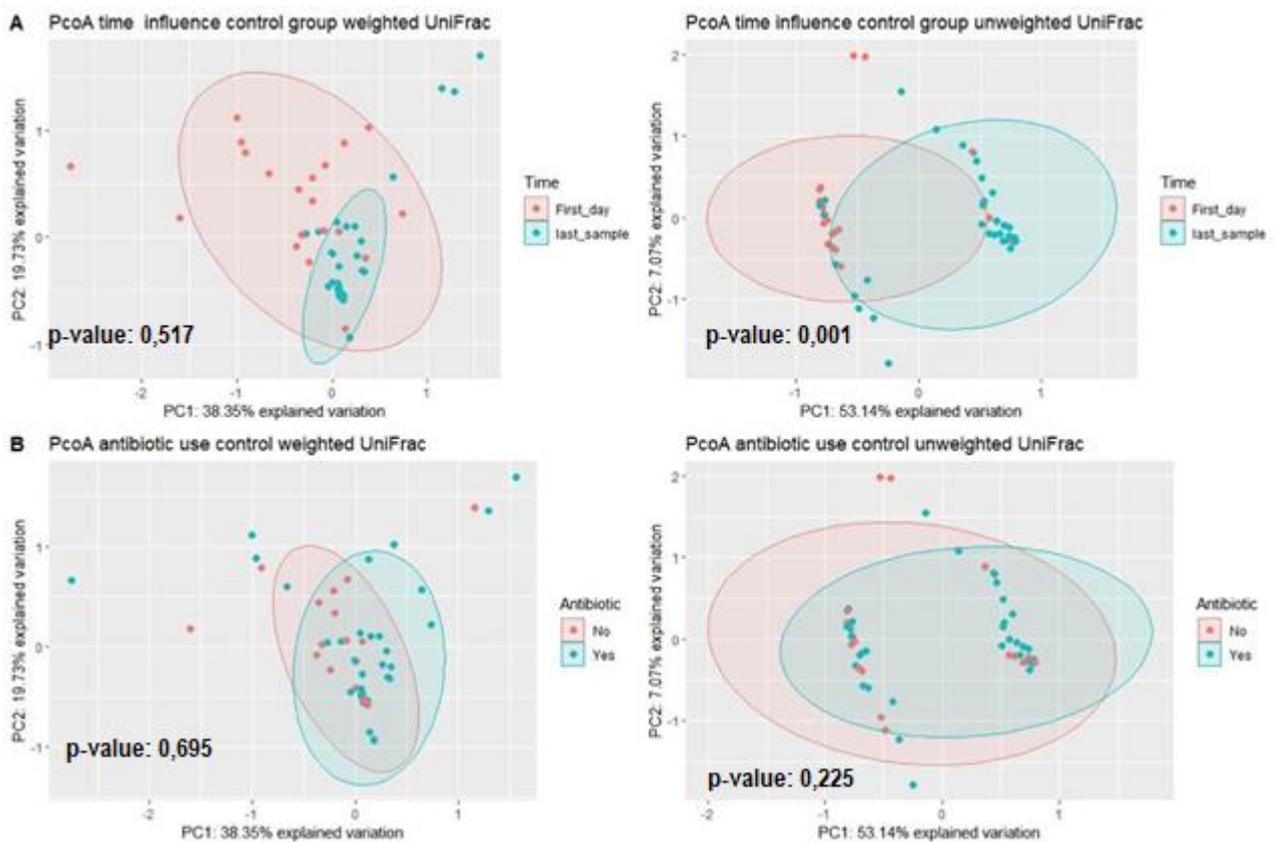
As diferenças com relação a beta diversidade, podem ser observadas a partir de um gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), que é baseado nas matrizes de distância Unifrac ponderada e não ponderada. Esses gráficos representam o comportamento das estruturas das comunidades em diferentes condições. Na análise de beta diversidade, cada ponto representado no plano cartesiano representa as informações de cada participante do estudo.

A análise ponderada (Figura 2 - painéis da esquerda) leva em conta a quantidade de espécies observadas na distribuição espacial das amostras, e permite avaliar a estrutura bacteriana referente às bactérias mais abundantes. A presença de diferenças entre os grupos pode ser conduzida pelas bactérias mais abundantes. Na análise não ponderada (Figura 2 - painéis à direita), representa a estrutura bacteriana como um todo, levando em consideração todas as bactérias presentes, independentemente de sua abundância (demonstra a presença ou ausência de espécies na distribuição espacial das amostras).

A análise de coordenadas levou em consideração dois grupos, o primeiro pelo tempo de coleta entre as amostras (T0 e T1) e pelo uso de antibiótico profilático (sim e não). Observou-se uma sobreposição na estrutura da comunidade bacteriana, entretanto não houve significância

estatística na análise ponderada entre T0 e T1 ($F=0,77$; $P=0,51$), nem quanto ao uso de antibiótico ($F=0,54$; $P=0,69$). Já na análise não ponderada observou-se significância somente quanto ao tempo entre as amostras ($F=8,92$; $P=0,001$) o mesmo não foi verificado quanto ao uso de antibiótico ($F=1,33$; $P=0,22$).

Figura 2. Análise de coordenadas principais beta diversidade, comparações ao longo da primeira semana T0 e T1, e quanto ao uso de antibiótico, 2023.



T0 – amostra mecônio

T1- amostra coletada ao 7º dia de vida

Abundância relativa dos gêneros

Foi realizada a análise estatística e distribuição dos 15 gêneros bacterianos mais abundantes nas amostras de fezes em T0 e T1, descritos na Tabela e Figura 3. A abundância relativa quanto aos gêneros bacterianos mais prevalentes nas amostras, destaca-se a dominância de três gêneros. Em T0 foram: *g_Staphylococcus* (22,57%), *g_Streptococcus* (9,18%), *g_Enterobacterales* (8,10%). Em T1 foram: *g_Staphylococcus* (45,59%), *g_Bacteroides* (10,90%), *g_Ralstonia* (8,57%) e *g_Enterobacterales* (6,85%).

Após análise estatística, a análise de composição e variações taxonômicas, evidenciou significância estatística ($p < 0,05$) em T0 quando comparado a T1 quanto aos gêneros *g_Enterobacterales* ($p = 0,041$), *g_Streptococcus* ($p = 0,019$), *g_Bacteroides* ($p = 0,022$), *g_Clostridium_sensu_stricto_1* ($p = 0,038$), *g_Enterococcus* ($p = 0,010$), *g_Bifidobacterium* ($p < 0,001$), *Others* ($p < 0,001$). Não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes nas abundâncias relativas dos outros oito gêneros testados (Tabela 3).

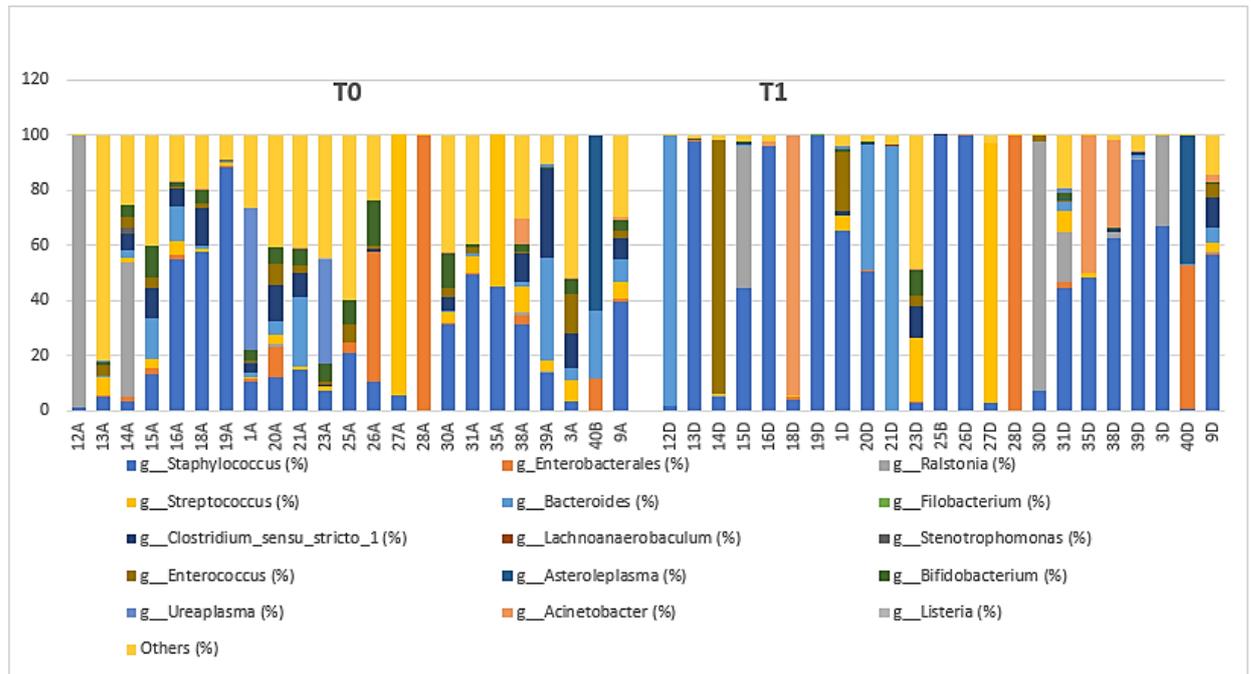
Tabela 3. Composição e Variações Taxonômicas de amostras ao nível de gênero e suas abundâncias relativas ao longo do tempo.

Gênero	Semana		p-value ²
	T0 ¹ (%)	T1 ¹ (%)	
<i>g_Staphylococcus</i>	22,57	45,59	0,11
<i>g_Enterobacterales</i>	8,10	6,85	0,041
<i>g_Ralstonia</i>	6,5	8,57	0,7
<i>g_Streptococcus</i>	9,18	5,59	0,019
<i>g_Bacteroides</i>	6,18	10,90	0,022
<i>g_Filobacterium</i>	0,0047	0,0026	0,9
<i>g_Clostridium_sensu_stricto_1</i>	5,77	1,21	0,038
<i>g_Lachnoanaerobaculum</i>	0,0026	0,0040	0,5
<i>g_Stenotrophomona</i>	0,103	0,0035	0,2
<i>g_Enterococcus</i>	2,54	5,46	0,010
<i>g_Asteroleplasma</i>	2,77	2,05	0,7
<i>g_Bifidobacterium</i>	4,16	0,62	<0,001
<i>g_Ureaplasma</i>	3,98	0,10	0,3
<i>g_Acinetobacter</i>	0,55	7,87	0,6
<i>g_Listeria</i>	0,0056	0,000	0,081
<i>Others</i>	27,46	4,77	<0,001

¹ Semana T0 – amostra mecônio / Semana T1- amostra coletada ao 7º dia de vida;

²p-value $p < 0,05$

Figura 3. Abundância Relativa quanto ao gênero bacteriano na amostra de fezes de recém-nascidos pré-terms ao longo do tempo.



T0 – 1ª amostra em jejum - mecônio

T1 – Amostra ao 7º dia de vida

Discussão

O atual estudo buscou descrever o desenvolvimento e a diversidade da microbiota intestinal em duas ocasiões diferentes do início da vida: nascimento, alicerçada na análise do mecônio, e no sétimo dia de vida, mediante análises do perfil microbiano baseadas no gene 16S rRNA em nível taxonômico de 46 amostras fecais oriundas de 23 RNPT internados em UTIN de uma cidade do Nordeste brasileiro.

Os Índices de *Chao 1*, *Shannon* e *Simpson* foram utilizados para estimar os padrões de riqueza e diversidade da comunidade microbiana da microbiota intestinal de crianças prematuras. As amostras fecais coletadas, entre o T0 (jejum/mecônio) e o T1 (sétimo de vida) apresentaram diversidade biológica em todos os testes estatísticos, entretanto, evidenciou-se uma tendência de diminuição da diversidade alfa. Essa característica de baixa diversidade alfa

da microbiota intestinal foi observada em outros estudos, além de ser considerada um marcador de disbiose [20,21,22].

Quanto a beta diversidade, observamos diferenças significantes na análise não ponderada entre as amostras (T0/T1). No mecônio encontramos abundância relativa quanto aos gêneros: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacterales*. Enquanto que os identificados no sétimo dia de vida foram: *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Ralstonia* e *Enterobacterales*. Entretanto, quando analisadas as variações taxonômicas nos dois momentos de coletas, evidenciou-se significância estatística quanto aos gêneros *Enterobacterales*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*.

A diversidade da microbiota intestinal nos dois momentos é esperada [23,22], uma vez que a microbiota do mecônio reflete principalmente os fatores pré-natais e neonatais. Infecções maternas prévias, como as observadas neste estudo: sífilis, infecção urinária, infecção por coronavírus e exposição às TORCHS, podem ter influenciado o perfil de colonização dos neonatos.

Por sua vez, a microbiota intestinal no 7º dia reflete à exposição dos recém-nascidos ao ambiente extrauterino. Em recém-nascidos muito prematuros, a microbiota intestinal é caracterizada por baixa diversidade alta variabilidade interindividual [22] que pode ser atribuída às variadas condições, como parto cesariano, exposição prolongada ao ambiente e práticas de unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN), que envolve: isolamento em incubadoras, uso de oxigênio, intubação, extubação, uso de antibióticos de amplo espectro [22]. Além disso, a própria prematuridade e o tipo de alimentação influenciam a dinâmica do estabelecimento bacteriano intestinal [1].

Em neonatos saudáveis, as bactérias anaeróbias facultativas, como *Enterococcus*, são as primeiras bactérias a colonizarem o trato gastrointestinal, devido ao alto teor de oxigênio. Essas bactérias são comumente encontradas no trato gastrointestinal, porém já foram relacionadas a contaminação do ambiente hospitalar, oferecendo riscos à saúde do neonato [24].

De modo semelhante, estudo conduzido na Indonésia, que utilizou o sequenciamento metagenômico para caracterizar o microbioma intestinal do início da vida de neonatos pré-terms demonstrou diversidade e complexidade decrescente do microbioma, quando se comparou amostras fecais no mecônio, no 4º e 7º vida de vida. No nível de gênero, o mais abundante no mecônio foi *Enterobacteriaceae*, no 4º dia houve dominância por *Staphylococcus* e no 7º dia predominância de *Clostridiales* [25].

Observou-se elevação na prevalência de *Bacteroides* ao longo do tempo (T0/T1). O incremento desse gênero no final da primeira semana de vida do RNPT, pode refletir o tipo de parto, que geralmente é um dos principais fatores determinantes da colonização inicial, uma vez que os *Bacteroides* caracterizam o microbioma vaginal normal [26,6]. O parto por via vaginal foi observado em quase metade das mães dos RNPT avaliados.

As amostras de mecônio que foram avaliadas foram oriundas de RNPT que estavam em dieta zero. Enquanto que as amostras fecais do 7º dia, sofreram influência do tipo de alimentação e do tempo de início da dieta enteral, via sonda orogástrica, com leite humano ordenhado de banco de leite humano (BLH); alimentação preconizada para RNPT, na ausência do leite da própria mãe, ou quando a produção é insuficiente. O uso do leite humano pasteurizado auxilia na tolerância alimentar e na saúde intestinal, apesar de apresentar impacto diferente na microbiota intestinal do bebê, quando comparado ao leite cru da própria mãe. Entretanto, ambos apresentam influência marcante na microbiota fecal quando comparados com a microbiota daqueles que usam fórmula [27].

As diferenças na composição microbiana intestinal entre bebês amamentados e alimentados com fórmula estão bem documentadas, com níveis aumentados de bifidobactérias presentes nos alimentados com leite humano [1]. Neste sentido, considerando que todos os RNPT do atual estudo estavam consumindo exclusivamente leite humano no 7º dia, esperava-se que esta microbiota apresentasse maior riqueza de *Bifidobacterium*, uma vez que o leite humano é fonte de espécies comensais como esta, que metaboliza oligossacarídeos e pode alterar a composição microbiana do intestino, promovendo o desenvolvimento do sistema imunológico. No entanto, encontramos diminuição na média de prevalência em (T1).

A literatura evidencia que o RNPT exhibe colonização intestinal retardada com espécies anaeróbicas comensais, como *Bifidobacterium* [1,28,22,29] ou *Bacteroides*, onde, em vez disso, suas fezes contêm níveis significativamente mais altos de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Enterobacterales* [1]. Outro fator que precisa ser considerado em nossa coorte é a precocidade da coleta das amostras fecais que pode não ter permitido que o gênero *Bifidobacterium* atingisse estado de dominância que possibilitasse a sua evidência, pois a diversidade alfa da microbiota intestinal em RNPT aumenta à medida que os neonatos pré-termos envelhecem [30]. De modo semelhante, estudo conduzido na Indonésia observou baixa prevalência de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que foi atribuída à dieta materna, pobre em laticínios [25].

Alguns neonatos da pesquisa apresentaram algumas infecções como a septicemia, muitos fatores podem estar relacionados, porém pode-se especular para uma possível relação

entre cepas de gêneros considerados patogênicos, como *Enterobacterales*, nas amostras analisadas, mesmo tendo ocorrido redução na prevalência entre os tempos T0 e T1. Essas bactérias fazem parte do grupo de bactérias coliformes, as quais podem causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, ou em situação de internamento em hospital [1].

Embora não tenha havido significância estatística quanto ao gênero *Staphylococcus*, neste ensaio, nota-se uma elevada prevalência na abundância relativa em ambos os grupos (T0 e T1), corroborando com outros estudos que apontaram a dominância desse gênero no mecônio de RNPT [31], sobretudo nos nascimentos por cesariana [32]. A elevada abundância dessas bactérias pode ter contribuído para ocorrência de sepse neonatal [33]. A elevação de *Staphylococcus*, também foi evidenciada em outro estudo, podendo ser justificada pela transferência bacteriana do leite humano para o RNPT, como também pela deglutição de bactérias presentes na cavidade oral que não foram aderidas a mucosa, e participam da colonização intestinal [34].

Ademais, observamos maior prevalência do gênero *Clostridium sensu stricto 1* nas amostras de mecônio quando comparada ao 7º dia. O gênero *Clostridium sensu stricto 1* inclui mais de 20 espécies sendo algumas delas com potencial patogênico e outras com características comensais [35]. Sabe-se que RNPT nascido por cesariana, tipo de parto que prevaleceu no atual estudo, apresentam complexidade reduzida da microbiota intestinal e são mais frequentemente colonizados pelo gênero *Clostridium sensu stricto 1* e *Clostridium difficile*, microrganismos ambientais da pele materna, da equipe do hospital ou do ambiente hospitalar, diferentemente daqueles que nascem por parto vaginal, que por entrarem em contato com a microbiota vaginal e fecal materna, resultam na colonização do intestino por microrganismos associados à vagina, como *Bifidobacterium* e *Bacteroides* [1].

É possível que fatores, a exemplo da alimentação com leite humano, tenham contribuído para correção desta sinalização de disbiose intestinal identificada nas amostras de mecônio. Estudo de coorte conduzido com 1249 díades mães-bebês trouxe evidências de que o leite materno pode transferir bactérias para o intestino infantil e influenciar o desenvolvimento da microbiota intestinal, em uma extensão semelhante a outros modificadores do microbioma infantil, como o modo de nascimento [13].

Os pontos fortes do atual estudo incluem o seu pioneirismo em investigar a evolução da microbiota intestinal na primeira semana de vida de recém-nascidos pré-terms, atendidos em um hospital público de um município do Nordeste brasileiro. Além da cuidadosa técnica para

coleta de amostras fecais a fim de evitar contaminação e permitir a avaliação do gene 16S rRNA pela análise metagenômica. No entanto, possui algumas limitações, como o fato dos participantes terem sido selecionados por uma amostra de conveniência, pelo pequeno tamanho amostral e perda de acompanhamento de algumas amostras fecais devido à baixa contagem de leituras do DNA. Esses fatores podem ter impactado no poder estatístico do estudo, de maneira a inviabilizar que estes sejam generalizados para todos os RNPT ou nascidos a termo.

Conclusões

Este estudo avaliou o desenvolvimento e a diversidade da microbiota intestinal de RNPT em duas ocasiões diferentes do início da vida, ao nascimento e ao sétimo dia de vida, mediante análises do perfil microbiano baseadas no gene 16S rRNA.

Os neonatos durante a primeira coleta de amostra fecal estavam em dieta zero e ao 7º dia de vida todas estavam sendo alimentadas via sonda orogástrica, com leite humano ordenhado de BLH. Notamos que a evolução da microbiota intestinal dos neonatos foi dinâmica e com baixa diversidade com variações dos gêneros: *Enterobacterales*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*. Nos dois momentos ocorreu dominância do gênero *Staphylococcus*.

Esses resultados refletem os achados da microbiota intestinal de um grupo de RNPT internados em UTIN de uma cidade do Nordeste brasileiro. Sugere-se a realização de estudos com maior tempo de observação e com amostras maiores para estabelecer possíveis relações causais.

Referências Bibliográficas

1. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J. et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(4): e00036.
2. Pammi M, Cope J, Tarr PI, Warner BB, Morrow AL, Mai V. et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome.* 2017, 9;5(1):31: e00036-17.
3. Chong-Neto HJ, Pastorino AC, Melo ACCDB, Medeiros D, Kuschnir FC, Alonso MLO, et al. A microbiota intestinal e sua interface com o sistema imunológico. *Arq Asma Alerg Imunol.* 2019;3(4):406-420.

4. Turrone F, Milani C, Duranti S, Lugli GA, Bernasconi S, Margolles A, *et al.* The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being. *Ital J Pediatr* 2020, 46, 16.
5. Stiemsma LT, Michels KB. The Role of the Microbiome in the Developmental Origins of Health and Disease. *Pediatrics*. 2018;141(4):e20172437.
6. Sarkar A, Yoo JY, Valeria Ozorio Dutra S, Morgan KH, Groer M. The Association between Early-Life Gut Microbiota and Long-Term Health and Diseases. *J Clin Med*. 2021, 25;10(3):459.
7. Perez-Cano FJ. Dietary Modulation of the Immune Function: Direct and Microbiota-Dependent Effect. *Nutrients*. 2022;7;14 (9): 1957.
8. Martín-Peláez S, Cano-Ibáñez N, Pinto-Gallardo M, Amezcua-Prieto C. The Impact of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics during Pregnancy or Lactation on the Intestinal Microbiota of Children Born by Cesarean Section: A Systematic Review. *Nutrients*. 2022 Jan 14;14(2):341.
9. Hartz LE, Bradshaw W, Brandon DH. Potential NICU Environmental Influences on the Neonate's Microbiome: A Systematic Review. *Adv Neonatal Care*. 2015 Oct;15(5):324-35.
10. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013,7(17) :5112-20.
11. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 2019,37, 852–857.
12. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016 Jul;13(7):581-3.
13. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R. *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. 2018, 6: 90.
14. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D590-6.
15. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*. 2013; 8 (4):e61217.

16. Oksanen, J. Vegan: Community Ecology Package, 2016. Disponível em:<<https://github.com/vegandevs/vegan/issues%0Ahttps://github.com/vegandevs/vegan/issues%0Ahttps://github.com/vegandevs/vegan/issues>>
17. Lahti L, Shetty S. Introduction to the microbiome R package. Disponível em: <<http://bioconductor.statistik.tudortmund.de/packages/3.6/bioc/vignettes/microbiome/inst/doc/vignette.html>>.
18. Hadley W. ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis. 2nd editio ed. [s.l.] Springer, 2016.
19. Dhariwal A. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic acids research*. 2017; 45 (W1): W180–W188.
20. Underwood MA, Sohn K. The Microbiota of the Extremely Preterm Infant. *Clin Perinatol*. 2017;44(2):407-427.
21. Sohn K, Underwood MA. Prenatal and postnatal administration of prebiotics and probiotics. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2017 Oct;22(5):284-289.
22. Rozé JC, Ancel PY, Marchand-Martin L, Rousseau C, Montassier E, Monot C, L. et al. EPIFLORE Study Group. Assessment of Neonatal Intensive Care Unit Practices and Preterm Newborn Gut Microbiota and 2-Year Neurodevelopmental Outcomes. *JAMA Netw Open*. 2020 Sep 1;3(9):e2018119.
23. Brewer MR, Maffei D, Cerise J, Ahn S, DeVoti J, Codipilly C. et al. Determinants of the lung microbiome in intubated premature infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2021 out;34(19):3220-3226.
24. Mora M, Mahnert A, Koskinen K, Pausan MR, Oberauner-Wappis L, Krause R. et al. Microorganisms in Confined Habitats: Microbial Monitoring and Control of Intensive Care Units, Operating Rooms, Cleanrooms and the International Space Station. *Front Microbiol*. 2016 Oct 13;7:1573.
25. Amandito R, Malik A, Rohsiswatmo R. Metagenomic profiles of the early life microbiome of Indonesian inpatient neonates and their influence on clinical characteristics. *Sci Rep*. 2022 Jun 7;12(1):9413.
26. Vandenplas Y, Carnielli VP, Ksiazek J, Luna MS, Migacheva N, Mosselmans JM. Et al. Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition*. 2020 Oct;78:110812.
27. Granger CL, Embleton ND, Palmer JM. et al. Maternal breastmilk, infant gut microbiome and the impact on preterm infant health. *Acta Paediatrica*. 2021;110:450–457.

28. Asbury MR, Butcher J, Copeland JK, Unger S, Bando N, Comelli EM. et al. Mothers of Preterm Infants Have Individualized Breast Milk Microbiota that Changes Temporally Based on Maternal Characteristics. *Cell Host Microbe*. 2020 Nov 11;28(5):669-682.e4.
29. Khan A, Mi H, Gao F, Hu Q, Gu X, Ma F, Qu L, Li S, Dai Y, Hao H. Dynamic changes of the gut microbial colonization in preterm infants with different time points after birth. *Front Microbiol*. 2023 Feb 17;14: 1078426.
30. Toubon G, Butel MJ, Rozé JC, Lepage P, Delannoy J, Ancel PY. Et al. EPIFLORE Study Group. Very Preterm Children Gut Microbiota Comparison at the Neonatal Period of 1 Month and 3.5 Years of Life. *Front Microbiol*. 2022 Jul 22;13:919317.
31. Moles L, Gómez M, Jiménez E, Fernández L, Bustos G, Chaves F. et al. Preterm infant gut colonization in the neonatal ICU and complete restoration 2 years later. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Oct;21(10):936.e1-10.
32. Chang HY, Chiang Chiau JS, Chang JH, Hsu CH, Lin CY, Ko MH, Lee HC. Characteristics of Gut Microbiota in Small for Gestational Age Infants with Very Low Birth Weight. *Nutrients*. 2022 Dec 4;14(23):5158.
33. R. Feferbaum, L. Moreira, A. Matuhara, C. Taddei, U. Tannuri. Surgical newborns and the intestinal microbiome colonization: Dysbiotic relationship. 2018; 37 (1): S275.
34. Biagi E, Aceti A, Quercia S, Beghetti I, Rampelli S, Turrone S. et al. Microbial community dynamics in mother's milk and infant's mouth and gut in moderately preterm infants. *Front. Microbiol*. 2018;9: 2512.
35. Bermingham EN, Maclean P, Thomas DG, Cave NJ, Young W. Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. *PeerJ*. 2017 Mar 2;5:e3019

5.3 ARTIGO 3 - EFEITO DA IMUNOTERAPIA OROFARÍNGEA DE COLOSTRO NA MICROBIOTA INTESTINAL DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMOS

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da administração da Imunoterapia Orofaríngea de Colostro (IOC) no desenvolvimento da microbiota intestinal de recém-nascido pré-termo (RNPT), atendidos em hospital público de um município do Nordeste brasileiro. Métodos - Trata-se de um estudo observacional, longitudinal e descritivo, que acompanhou seis RNPT submetidos a IOC em um hospital público. Foram coletadas 2 amostras fecais de cada neonato durante a 1ª semana de vida, para análise da microbiota fecal por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram realizadas análises de alfa diversidade (*Chao1*, *Shannon e Simpson*) e análise de coordenadas principais de beta diversidade. Resultados - Embora não tenha havido dominância de gêneros específicos pode-se destacar a maior prevalência de *Bacteroides*, *Streptococcus e Listeria* na primeira amostra (mecônio) e *Staphylococcus*, *Enterococcus e Bacteroides* na segunda amostra (7º dia de vida). Conclusão – Não foi observado efeito significativo da IOC sobre a evolução na colonização de gêneros bacterianos comensais na primeira semana de vida de RNPT. A microbiota inicialmente foi pouco diversa, com tendência à elevação (baseado nas análises de diversidade alfa e beta), o que pode representar um bom prognóstico, mostrando o quão dinâmico é esse ambiente no início da vida.

Palavras-chave: imunoterapia; colostro; recém-nascidos pré-termos; microbiota; 16S rRNA

Introdução

A microbiota intestinal é fundamental para a vida humana devido as múltiplas interações mutualísticas entre o hospedeiro e sua microbiota¹. Ao longo da vida, a complexa formação da microbiota intestinal sofre influência de determinantes endógenos e exógenos. Ao nascimento um dos determinantes externos que influencia a colonização microbiana do intestino é o tipo de alimentação do recém-nascido².

O leite materno é um dos principais fatores na definição e no desenvolvimento da microbiota intestinal por conter em sua composição substratos prebióticos, com ênfase para os

os oligossacarídeos (também conhecidos como HMO's) responsáveis pela modulação imunitária e da microbiota intestinal^{3,4}. O leite humano também pode ser fonte de microrganismos, sendo os gêneros bacterianos mais frequentemente identificados: *Streptococcus*, *Staphylococcus* seguidos por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacteria*, *Enterococcus* e família *Enterobacteriaceae*⁵. Estudo de coorte conduzido com 1.249 díades mães-bebê evidenciou que bactérias presentes no leite materno (*Streptococcus spp.* e *Veillonella*) podem ser transferidas para o intestino da criança e contribuir para o desenvolvimento da microbiota intestinal, com impacto semelhante a outros modificadores do microbioma infantil, como o modo de nascimento⁶.

No entanto, no caso de recém-nascidos pré-termo (RNPT), sobretudo os de extremo baixo peso a dieta enteral é postergada em decorrência de características próprias da prematuridade, como imaturidade do aparelho digestivo e instabilidade clínica⁷. Recentemente, para esses recém-nascidos impossibilitados de serem alimentados por via enteral, a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro (IOC) tem sido recomendada como uma estratégia para proporcionar os benefícios imunológicos do colostro; secreção láctea produzida nos primeiros cinco dias pós-parto e quando comparada ao leite maduro apresenta em sua composição menor quantidade de gordura, de lactose e grande riqueza de componentes imunológicos como: lactoferrina, IgA secretora, fatores de crescimento, citocinas, dentre outros^{8,9}. Essa característica chama a atenção para que a função primária do colostro pode não ser a nutricional e sim trófica e imunológica⁸. O colostro das mães dos RNPT apresenta maiores quantidades de fatores imunobiológicos em comparação com o leite de recém-nascidos a termo^{10,11}. Esses componentes estão ausentes no leite de fórmula e diminuem no leite humano pasteurizado de Banco de Leite Humano (BLH), daí a importância desta intervenção ser realizada com leite cru da própria mãe¹¹.

A IOC consiste na administração de gotas de colostro da própria mãe, na mucosa orofaríngea direita e esquerda do RNPT com o intuito de promover a absorção de componentes imunobiológicos do leite, e assim, provocar um efeito sistêmico que favorece o sistema imunológico e gastrointestinal^{12,13}. A IOC demonstrou ser uma intervenção viável, potencialmente benéfica e bem tolerada pelos RNPT, que também pode contribuir para reduzir o tempo que os Recém-Nascidos (RN) de muito baixo peso levam para atingir a nutrição enteral plena, quando comparados com àqueles não fizeram esta terapia^{12,14}.

Poucos estudos abordaram as características da microbiota intestinal dos prematuros que utilizaram a IOC, sobretudo na primeira semana de vida¹⁵. Além disso, já foi documentado que

a variação da comunidade bacteriana do leite pode influenciar a estrutura do microbioma intestinal da criança¹⁶.

Ademais, o microbioma do leite humano molda diretamente o microbioma intestinal do RN, o que permite a instalação de microbiota saudável e limita o crescimento de bactérias patogênicas⁴.

Os indícios asseguram traçar estratégias inovadoras na área da saúde, sustentados na evidência científica que a microbiota comensal permite repercussões positivas na saúde do RNPT a curto e longo prazo⁴. Nesta perspectiva, o objetivo do atual estudo foi de avaliar o efeito da administração da IOC no desenvolvimento da microbiota intestinal de recém-nascido pré-termo, atendidos em hospital público de um município do Nordeste brasileiro.

Métodos

Caracterização do estudo

O estudo consiste em uma descrição de um grupo de RNPT e suas respectivas mães que voluntariamente aceitaram participar da pesquisa. Esta pesquisa está vinculada a um ensaio clínico de superioridade, controlado, não randomizado, intitulado “Análise Metagenômica da Microbiota Intestinal de Prematuros em Imunoterapia Orofaríngea com Colostro Atendidos no SUS: Estudo de Intervenção”, realizado em uma cidade de grande porte localizada no Nordeste do Brasil, sob aprovação CAAE: 16995219.0.0000.0053 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e pelo Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos, sob UTN: U1111-1248-6732.

Amostra

Foram incluídos todos os RNPT e suas respectivas mães, atendidos no Hospital Inácia Pinto dos Santos (HIPS); cujos nascimentos ocorreram durante o ano de 2022 e atendiam aos critérios de inclusão: peso ao nascer $\leq 1.500\text{g}$, ≤ 36 semanas gestacionais, com dieta zero, por via enteral ou parenteral, e estáveis clinicamente nas últimas três horas antes de iniciar a IOC. Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da coleta dos dados.

Intervenção

A IOC foi conduzida pela equipe de profissionais de saúde da unidade neonatal. Se caracterizou na administração de 0,2 ml (quatro gotas) de colostro da própria mãe, nas mucosas orofaríngeas direita e esquerda do RNPT, no tempo de 10 segundos, oferecidos a cada 03 horas, totalizando 8 administrações diárias, até o sétimo dia de vida do neonato. A intervenção seguiu protocolo padrão, recentemente publicado, que poderá ser consultado para informações adicionais¹².

Coleta de amostras fecais

Ao nascimento, foram coletadas duas amostras de cada RNPT internados na unidade neonatal, sendo uma dessas correspondente a primeira dejeção em jejum denominada de T0 (mecônio); e, a segunda amostra no 7º dia de vida, após a finalização da IOC planejada para cada neonato (denominada de T1).

A coleta ocorreu em todos os dias da semana, por meio de um protocolo específico de coleta de amostra fecal, com a finalidade de preservar as colônias bacterianas existentes. Para tanto, ao nascimento foi colocado dentro da fralda do RNPT, um recorte de tecido de campo cirúrgico (fenestrado e estéril), que teve como objetivo evitar que o conteúdo fecal fosse absorvido pela fralda. Logo que o recém-nascido pré-termo apresentasse as dejeções, a fralda era retirada por um profissional de saúde da instituição, previamente treinado. A amostra foi retirada na fralda com auxílio da espátula de *ayre* (estéril) e acondicionada em tubo *eppendorf* 1,5 ml (estéril) com fechamento hermético, que foi codificada para cada neonato.

As amostras fecais foram acondicionadas, pelos pesquisadores, congeladas a -20° C (por no máximo 12 horas) na própria unidade hospitalar e transportadas, com preservação da rede de frio, até a armazenagem em ultrafreezer (-80°C), no laboratório de microbiologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. As informações adicionais sobre a coleta das amostras fecais estão disponíveis em um manuscrito ainda não publicado. Todas as informações da pesquisa referentes ao RNPT foram registradas em uma planilha.

Variáveis

As variáveis maternas pesquisadas foram: idade materna (média e desvio padrão), raça/cor autorreferida (branco/não-branca), situação conjugal (com companheiro/sem companheiro), local de residência (urbana/rural), paridade (primípara/múltipara), número de consulta pré-natal

(<6/≥6), tipo de parto (cesárea/vaginal), diabetes gestacional (não/sim), infecção urinária (não/sim), vulvovaginite (não/sim). As variáveis referentes ao prematuro foram: idade gestacional (média ou <28 semanas/>=28 semanas), sexo (feminino/masculino), peso ao nascer em gramas (média e desvio padrão ou classificado em extremo baixo peso (≤1000g)/muito baixo peso (> 1000g a ≤ 1500g), apgar 1° e 5° minuto (média), tipo de oxigenoterapia (não-invasiva/invasiva), Síndrome de Desconforto Respiratório (SDR) (não/sim), Sífilis Congênita (SC) (não/sim), óbito (não/sim), causa de óbito (morbidade), tempo para iniciar a dieta enteral (média em dia), tempo de nutrição parenteral (média em dia), peso no sétimo dia de vida (gramas).

Extração de DNA

A extração do DNA total das amostras de fezes, foi realizado com o *kit QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com as normas do fabricante. Foi descartado o sobrenadante, e ressuspendido o pellet em 1000 µL de *buffer* Tris EDTA (10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 1 mM EDTA [pH 7,6]). Esta suspensão foi centrifugada a 15.700 g por 15 min. As amostras foram lisadas em 200 µL de *buffer* TELS (lisozima 20mg/ml: 1M Tris-HCl [pH 7,5], 0,5 M EDTA [pH 8,0], 20% sucrose), e em seguida incubadas por 60 minutos à 37°C. Todos os passos seguintes seguiram as instruções do fabricante.

As amostras de fezes, após extração, foram armazenadas a -80°C até a etapa de quantificação do DNA total pelo equipamento *Qubit Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Sequenciamento das amostras

Amplificação do domínio V4 do gene 16S rRNA

Utilizou-se a amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, para caracterização da microbiota fecal dos recém-nascidos¹⁷. Seguindo o protocolo, comprimento total de sequências iniciadoras utilizando a nomenclatura de nucleótidos IUPAC padrão, utilizado para esta região foram: V4 *forward primer* (5' - TCG TCG GCA GCC AGT GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GT - 3') e V4 *reverse primer* (5' - GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT - 3'). Para a amplificação das sequências alvo, utilizou-se 5µl de DNA microbiano (10ng/µl), em volume total de 25µl. Realizou-se a reação nas determinadas

condições: ativação da enzima 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos, extensão 68°C por 45 segundos, 68°C por 2 minutos; e, finalmente a enzima foi mantida a 4°C. Em adição, foram utilizados, um controle negativo da reação de PCR e um controle negativo dos reagentes do kit de extração de DNA. Utilizou-se 1µl do produto em eletroforese com gel de agarose à 1%, para verificação se o PCR amplificou o tamanho esperado após utilizar os pares de *primer* V4 no protocolo.

Inicialmente, a amplificação aconteceu em duas etapas e, na sequência, os demais procedimentos foram efetuados seguindo o protocolo do fabricante (*Illumina-16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*). O tamanho do fragmento alvo é de 250pb e 412pb após a indexação dos adaptadores. Utilizou-se os adaptadores Nextera XT e kit de 21 reagentes para sequenciamento V2 500 ciclos. Subsequentemente, as amostras foram sequenciadas utilizando a plataforma *Illumina MiSeq*®, de acordo com as instruções do fabricante.

Análise da microbiota por ferramentas de bioinformática

Objetivando obter as sequências, as bibliotecas 16S rRNA obtidas foram analisadas por meio do *software* QIIME v.2-2020.2¹⁸. Utilizou-se o *Denoising* com a ferramenta DADA2¹⁹. As sequências diretas foram então truncadas na posição 251 nucleotídeos, e as reversas nos 250 nucleotídeos, com finalidade de descartar as posições para as quais a qualidade mediana dos nucleotídeos era inferior a Q30. As amostras com menos de 1000 sequências foram excluídas de análises posteriores.

Foi atribuída a taxonomia utilizando ASVs (*Amplicon Sequencing Variant*) por meio do recurso *q2-featureclassifier*²⁰ e o classificador de taxonomia Bayes *naive classifysklearn*, comparando as ASVs obtidas contra o banco de dados de referência SILVA 132²¹. As análises posteriores foram realizadas no *software* SPSS versão 26 e R *Studio* versão 4.0.4, usando os pacotes *phyloSeq*²², *vegan*²³, *microbiome*²⁴ e *ggplot2*²⁵.

Análise estatística

Foram utilizados o *software* SPSS versão 26 e o ambiente de programação R *Studio*, para a realização das análises. Foram avaliados os índices de riqueza de *Chao1*, índice de diversidade de *Shannon*, índice de dominância de *Simpson* e a diferença nos 15 gêneros bacterianos mais abundantes nas amostras fecais, ademais a análise da beta diversidade. Dessa forma, em todas as análises foi avaliado o efeito do tempo na microbiota intestinal e comparados os diferentes períodos de tempo.

As medidas descritivas foram apresentadas como média e desvio padrão para as variáveis numéricas e frequências absolutas e relativas para as variáveis categóricas. Para verificação de variação temporal, inicialmente avaliou-se a adesão à normalidade pelo teste *Shapiro-Wilk*. Em seguida, utilizamos o teste não paramétrico de *Wilcoxon rank sum exact test*, que é similar ao teste *t de Student* para duas amostras relacionadas. Adotamos um nível de significância de $p < 0,05$.

Os índices de alfa diversidade (*Chao1*, *Shannon*, *Simpson*), foram calculados por meio da análise com o *Generalized Estimating Equations* (GEE). Avaliou-se os modelos considerando as distribuições gamma ou linear e a função de ligação *identity*. A matriz de correlação foi variada entre independente, AR (1), *unstructured* e *exchangeable*. Para seleção do melhor modelo, foi considerado o menor valor de *Quasi likelihood under Independence Criterion* (QIC). Também foi avaliada a melhor aderência dos resíduos, utilizando o gráfico Q-Q plot.

Para a análise da beta diversidade, utilizamos o *software Microbiome Analyst*²⁶ com objetivo de observar as diferenças intra e entre os grupos nas amostras. Foi realizado o teste PERMANOVA para cada variável, utilizando as distâncias *weighted e unweighted UniFrac*. Foram realizadas 999 permutações para cada variável e a significância estatística foi dada com valor de $p < 0,05$.

A análise de coordenadas principais (PCoA) foi utilizada como técnica para avaliar as diferenças entre os grupos de comparação, por meio da análise de dados multidimensionais. A PCoA, permite a visualização das matrizes de distância *UniFrac*, que representam as estruturas das comunidades bacterianas e mostram o comportamento em diferentes cenários.

Deposição de dados

Os dados da sequência serão depositados no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob o BioProject ID PRJNA762545.

Resultados

Dados descritivos

A microbiota intestinal foi investigada por análise de bioinformática com 20 amostras de fezes de 10 RNPT. Em seguida, foram excluídas 8 amostras (4 crianças) pela perda do par de comparação ou por apresentarem baixa contagem de leituras (<1.000 leituras), o que afetaria a qualidade das análises. Por fim, 12 amostras de 6 neonatos foram analisadas e sequenciadas.

A Tabela 1 apresenta as características descritivas das mães que participaram do estudo. A idade média das mães foi de $21,6 \pm 4,9$ anos, sendo a maioria não-branca e residente em área urbana. Mais da metade das mães não tinham um companheiro estável, eram primíparas, realizaram menos de seis consultas pré-natais e tiveram parto vaginal.

Tabela 1. Características de mães de recém-nascidos pré-termos em uso de Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.

Variáveis	Média ± Desvio Padrão	N (%)
Idade materna	21,6 ± 4,9	-
Raça/cor autorreferida	-	6
Branca	-	1 (16,7)
Não branca	-	5 (83,3)
Situação conjugal	-	6
Com companheiro	-	2 (33,3)
Sem companheiro	-	4 (66,7)
Local de residência	-	6
Urbano	-	6 (100)
Rural	-	0 (0)
Paridade	-	6
Multípara	-	2 (33,3)
Primípara	-	4 (66,7)
Número de consultas pré-natal	-	6
≥6 consultas	-	1 (16,7)
<6 consultas	-	5 (83,3)
Tipo de parto	-	6
Vaginal	-	5 (83,3)
Cesáreo	-	1 (16,7)
Diabetes gestacional	-	6
Não	-	5 (83,3)
Sim	-	1 (16,7)
Vulvovaginite	-	6
Não	-	3 (50)
Sim	-	3 (50)
Infecção urinária	-	6

Não	-	5 (83,3)
Sim	-	1 (16,7)

Fonte: Elaboração Própria (2023).

Quanto às características dos RNPT, observamos que todos eram do sexo masculino, com média de idade gestacional de $27,3 \pm 2,1$ semanas, média de peso ao nascer de $965,3 \pm 288,8$ gramas - sendo que 83,3% encontravam-se na faixa de Extremo Baixo Peso (EBP). A média do Apgar no 1º minuto foi de $5,6 \pm 2,8$ e no 5º minuto $7,83 \pm 1,47$. Ao sétimo dia de vida, o peso médio foi de $974,8 \pm 311,3$ gramas. A média de tempo para início da dieta enteral foi de $2,6 \pm 1,6$ dias; e, de $5,3 \pm 2,2$ dias para tempo médio de uso da nutrição parenteral.

Todos os RNPT, na primeira semana de vida, estavam em uso de antibióticos (desse modo essa variável não foi controlada), todos fizeram uso de IOC e receberam dieta por sonda orogástrica com leite materno. A oxigenoterapia invasiva (ventilação mecânica) foi utilizada em 83,3% dos casos. Foram registrados 4 óbitos, tendo como causa sepse tardia (3 RNPT) e hemorragia pulmonar (1 RNPT) (Tabela 2).

Tabela 2. Características de recém-nascidos pré-termos em uso de Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.

Variáveis	Média ± Desvio Padrão	N (%)
Sexo do recém-nascido		6
Feminino	-	0 (0)
Masculino	-	6 (100)
Idade gestacional		6
>= 28 semanas	-	3 (50)
<28 semanas	-	3 (50)
Idade gestacional (semanas)	$27,3 \pm 2,1$	-
Peso ao nascer (gramas)	$965,3 \pm 288,8$	-
Peso ao nascer	-	6
Muito baixo peso	-	1 (16,7)
Extremo baixo peso	-	5 (83,3)
Apgar 1º minuto	$5,6 \pm 2,8$	-
Apgar 5º minuto	$7,83 \pm 1,47$	-
Tipo de oxigenoterapia		6
Não invasiva	-	1 (16,7)

Invasiva	-	5 (83,3)
Óbito		6
Não	-	2 (33,3)
Sim	-	4 (66,7)
Síndrome de desconforto respiratório		6
Não	-	4 (33,3)
Sim	-	2 (66,7)
Sífilis congênita		6
Não	-	5 (83,3)
Sim	-	1 (16,7)
Tempo para iniciar a dieta enteral (dias)	2,6 ± 1,6	-
Tempo de nutrição parenteral (dias)	5,3 ± 2,2	-
Peso no dia 7 (gramas)	974,8 ± 311,3	-

Fonte: Elaboração Própria (2023).

Alfa diversidade

Nas análises de distribuição do teste de normalidade de *Shapiro-Wilk normality* para Índices de Diversidade *Chao1*, *Shannon* e *Simpson* evidenciaram que as amostras possuem distribuição normal, exceto para o teste *Chao1* ($p = 0,02$) (Tabela 3).

Na análise de diversidade biológica (número de espécies) e a equabilidade (uniformidade entre as abundâncias relativas das espécies), houve significância estatística ao longo do tempo, em T0 quando comparado a T1 (nível de significância de 5%), quanto ao Índice de Shannon (0,70 vs. 1,58; $p < 0,02$) e Simpson (0,18 vs. 0,54; $p < 0,04$); mas, as diferenças não foram estatisticamente significantes em *Chao1* (15,5 vs. 17,0; $p < 0,91$), ver Tabela 3 e Figura 1.

Tabela 3. Índices de Diversidade *Chao1*, *Shannon* e *Simpson* na primeira semana de vida de Recém-Nascidos Pré-termos que realizaram a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.

Variáveis	Tempo		<i>p-value</i> ¹	<i>p-value</i> ²
	T0 ¹	T1 ¹		
<i>Shannon index</i>	0,70 (0,09-1,39)	1,58 (0,94-2,04)	0,028	0,7234
<i>Simpson index</i>	0,18 (0,03-0,53)	0,54 (0,31-0,61)	0,046	0,1212
<i>Chao1 index</i>	15,5 (9,27-48,2)	17,0 (9,5-22,77)	0,916	0,02339

T0 – amostra mecônio

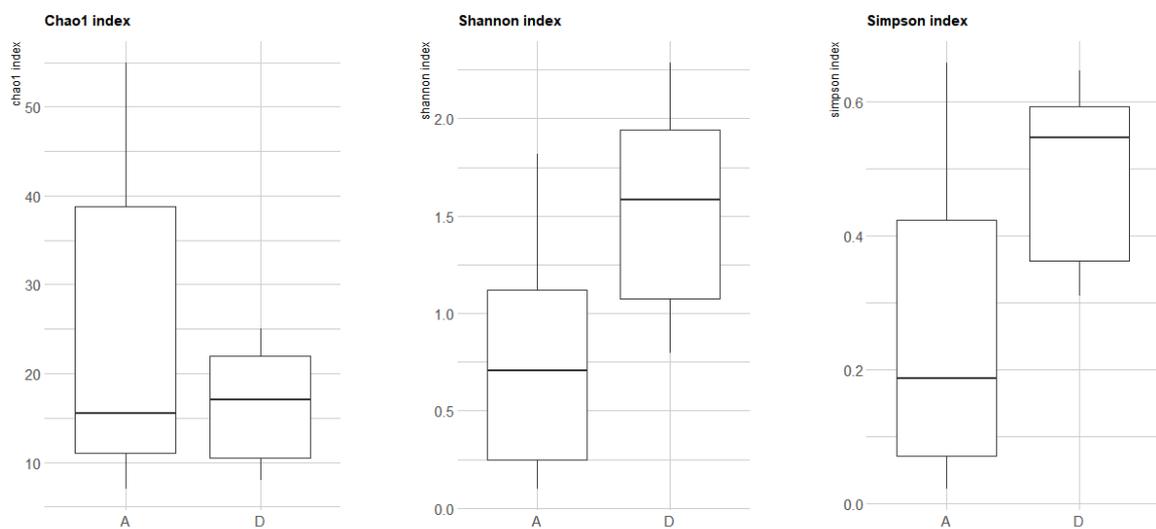
T1- amostra coletada ao 7º dia de vida

1 *Wilcoxon test*

2 *Shapiro-Wilk normality test*

As amostras entre o T0 (jejum/mecônio) e o T1 (sétimo de vida/iniciada dieta enteral) demonstraram que houve diversidade biológica em todos os testes, exceto em Chao1, entretanto observamos uma tendência de aumento da diversidade alfa para os testes *Shannon* (0,70 vs 1,58) e *Simpson* (0,18 vs 0,54).

Figura 1. Índices de Diversidade *Chao 1*, *Shannon* e *Simpson* na primeira semana de vida de Recém-Nascidos Pré-termos que realizaram a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.



A. T0 – amostra mecônio

D. T1- amostra coletada ao 7º dia de vida

*Chao1 index-p-value*¹ 0.916

*Shannon index - p-value*¹ 0.028

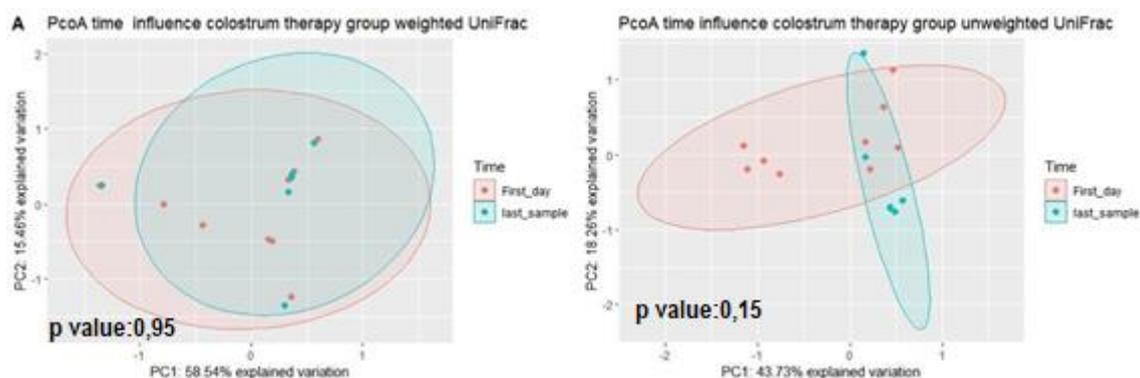
*Simpson index - p-value*¹ 0.046

¹ *Wilcoxon rank sum exact test; Wilcoxon rank sum test*

Beta diversidade

A análise de coordenadas levou em consideração o tempo de coleta entre as amostras (T0 e T1); e observamos uma sobreposição na estrutura da comunidade bacteriana, porém sem significância estatística, tanto na análise ponderada (F=0,20; P=0,95) quanto na não ponderada (F=1,59; P=0,15) (Figura 2).

Figura 2. Análise de coordenadas principais beta diversidade, comparações ao longo da primeira semana, de Recém-Nascidos Pré-termos que realizaram a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.



T0 – amostra do primeiro dia (mecônio)
 T1- última amostra (coletada ao 7º dia de vida)
 P value <0,05.

Abundância relativa

Quanto a abundância relativa, foi realizada a análise estatística e distribuição dos 15 gêneros bacterianos mais abundantes nas amostras de fezes em T0 e T1, descritos na Tabela 4 e Figura 3. Neste íterim, notamos a dominância de sete gêneros, dentre eles em T0: *g_Bacteroides* (16,75%), *g_Listeria* (16,49%) *g_Streptococcus* (16,48%), *g_Staphylococcus* (15,89%), *g_Lachnoanaerobaculum* (15,45%) e *g_Filobacterium* (14,95%); e, em T1: *g_Enterococcus* (24,01%), *g_Staphylococcus* (22,07%), *g_Bacteroides* (16,16%), *g_Streptococcus* (13,93%) e *g_Lachnoanaerobaculum* (10,43%). Na análise de composição e variações taxonômicas, não houve significância estatística (p<0,05).

Tabela 4. Composição e Variações Taxonômicas de amostras ao nível de gênero e suas abundâncias relativas ao longo do tempo em recém-nascido pré-termos que fizeram uso de Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.

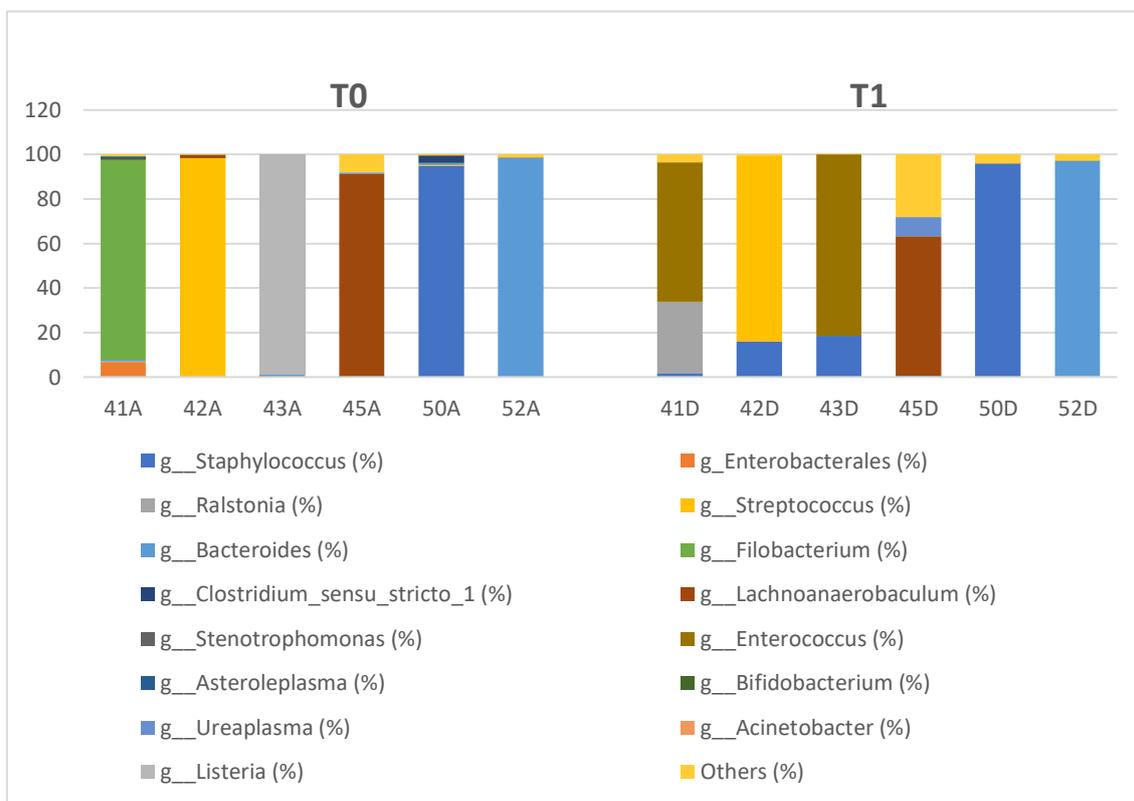
Gênero	Semana		p-value ²
	T0 ¹ (%)	T1 ¹ (%)	
<i>g_Staphylococcus</i>	15,89	22,07	0.13
<i>g_Enterobacterales</i>	1,16	0,034	0.7
<i>g_Ralstonia</i>	0,008	5,34	>0.9

Gênero	Semana		p-value ²
	T0 ¹ (%)	T1 ¹ (%)	
<i>g_Streptococcus</i>	16,48	13,93	0.6
<i>g_Bacteroides</i>	16,75	16,16	0.087
<i>g_Filobacterium</i>	14,95	0	0.2
<i>g_Clostridium_sensu_stricto_1</i>	0,568	0,050	0.4
<i>g_Lachnoanaerobaculum</i>	15,45	10,43	0.3
<i>g_Stenotrophomona</i>	0,0003	0,022	>0.9
<i>g_Enterococcus</i>	0,086	24,01	0.7
<i>g_Asteroleplasma</i>	0,22	0	0.4
<i>g_Bifidobacterium</i>	0,001	0	0.4
<i>g_Ureaplasma</i>	0,130	1,423	>0.9
<i>g_Acinetobacter</i>	0,0009	0	0.4
<i>g_Listeria</i>	16,49	0	0.4
Others	1,77	6,48	0.3

¹ Semana T0 – amostra mecônio - Semana T1- amostra coletada ao 7º dia de vida

²p-value p<0,05

Figura 3. Abundância Relativa quanto ao gênero bacteriano na amostra de fezes de Recém-Nascidos Pré-termos que fizeram a Imunoterapia Orofaríngea de Colostro, 2023.



Discussão

O estudo atual fornece *insights* sobre o desenvolvimento e diversidade da microbiota intestinal em neonatos em duas fases distintas do início da vida: no momento do nascimento, analisando o mecônio, e no sétimo dia de vida. As análises realizadas forneceram informações taxonômicas detalhadas sobre a composição da microbiota intestinal desses neonatos.

Nas amostras analisadas, observamos abundância de sete gêneros (distribuídos em T0 e T1), sem dominância de um gênero específico. Embora tenha sido não identificado diferença significativa na diversidade beta; notamos tendência de aumento na diversidade alfa, sinalizando para um prognóstico positivo, uma vez que uma elevada diversidade é encontrada em microbioma equilibrado e saudável²⁷.

A abundância e diversidade que compõem os padrões de colonização da microbiota intestinal em RNPT diferem muito dos recém-nascidos a termo devido à diversos fatores, como: corioamnionite materna, idade gestacional, tipo de parto, tipo de alimentação, exposição a antibióticos e fator ambiente na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN)^{28,27}. Ademais, sabe-se que os primeiros microrganismos a colonizarem o trato gastrointestinal são anaeróbios facultativos (por exemplo, *Escherichia*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*

e *Veillonella*) e por volta de 1 a 2 semanas serão substituídas pelos anaeróbios obrigatórios (*Bacteroides* e *Clostridia*)^{28,27}.

Neste estudo, os anaeróbios facultativos *Streptococcus* diminuíram ao longo do tempo e *Enterococcus* e *Staphylococcus* aumentaram entre T0 e T1. Quanto aos anaeróbios obrigatórios, *Bacteroides* manteve-se estável e *Clostridia* diminuíram entre T0 e T1. Em geral, destacamos a prevalência na amostra do mecônio de *Bacteroides*, *Listeria* e *Streptococcus*; e, na amostra coletada ao 7º dia de vida de *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Bacteroides*.

O gênero *Bacteroides* apresentou a maior prevalência em T0 e se manteve estável com o passar dos dias (T1). Está relatado na literatura que as bactérias deste gênero podem exercer atividades benéficas, como: atividade imunomoduladora, proteção contra inflamação, promoção da glicosilação do epitélio intestinal e secreção de hidrosilases de glicosídeos²⁹. Ademais, *Bacteroides* secretam uma gama diversificada de glicosidases ao competir pelo uso de carboidratos complexos²⁹.

Os *Bacteroides* e *Bifidobacterium* competem pelos oligossacarídeos do leite humano (HMO), fato que possivelmente justifique a prevalência maior do primeiro com relação ao segundo nas amostras fecais do nosso estudo²⁹; uma vez que, *Bifidobacterium* optam por usar HMO de cadeia curta, enquanto *Bacteroides* preferem oligossacarídeos maiores²⁹. Assim, a composição dos níveis/tipos de HMO disponível no leite, pode prever a abundância relativa de alguns gêneros bacterianos presentes em amostras fecais²⁹.

Outras possibilidades que determinam a baixa prevalência *Bifidobacterium* são: alimentação exclusiva com leite humano³⁰, uso de antibiótico^{3,31} e retardo no início da dieta enteral³. Está documentado na literatura que RNPT amamentados exclusivamente com LH apresentam uma microbiota intestinal com baixa abundância de *Bifidobacterium*, e que a riqueza bacteriana diminui ao longo do tempo³⁰. Estudos evidenciam, que os neonatos apresentam uma colonização intestinal com espécies anaeróbicas comensais, como *Bifidobacterium* ou *Bacteroides*, retardada em relação aos recém-nascidos a termo, sendo encontrada mais comumente em suas fezes níveis mais elevados de microrganismos patogênicos, como *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Enterobacterales*^{3,31}.

Além disto, no nosso estudo, todas as crianças estavam em uso de antibiótico desde o nascimento e o tempo médio de início da dieta enteral via sonda orogástrica foi de dois dias e meio. Esse fato pode ter influenciado no processo de colonização e estabelecimento de uma microbiota específica comensal. O jejum prolongado pode ser explicado, pela gravidade das crianças, na análise geral, a exemplo da média do apgar no 1º minuto de vida inferior a 7,

embora tenha ocorrido uma recuperação no 5º minuto de vida. Levando a crer que as condições de nascimento e as medidas implementadas na sala de parto podem interferir diretamente nas condições clínicas e evolução dos RNPT, podendo retardar a introdução e progressão da dieta enteral³².

Bactérias do gênero *Streptococcus* são Gram-positivas e anaeróbias facultativas, podem causar doenças em humanos, mas a grande maioria das espécies são inofensivas. No estudo em questão, as cepas apresentaram declínio da prevalência entre os tempos investigados T0 (16,48%) e T1 (13,93%), o que corrobora com a ideia de colonizadores iniciais^{28,27}; no entanto, dentre os RNPT que vieram a óbito por sepse, todos apresentaram *Streptococcus* seja no mecônio ou nas fezes ao sétimo dia; e, o neonato com hemorragia pulmonar houve altas prevalências destas cepas em ambos os tempos (98,2% e 83,5%). Estudos de revisão afirmam que a presença de *Streptococcus* do grupo B (GBS) durante o processo de nascimento esteve associado a enterocolite necrotizante e sepse neonatal tardia^{28,27}.

Quanto ao gênero *Staphylococcus* (bactérias Gram-positivas e anaeróbias facultativas) verificamos um aumento na prevalência entre T0 (15,89%) e T1 (22,07%). A predominância destas cepas ao 7º dia de vida no nosso estudo, também foi relatada por Seki et al (2022), os quais associam os maiores níveis de *Staphylococcus* a quantidade de energia liberada da dieta por via parenteral³². Vale ressaltar que, dos neonatos que tiveram sepse neonatal tardia, dois apresentaram aumento na prevalência destas cepas entre os tempos estudados. Fato que corrobora com relatos da literatura ao afirmar que bactérias comensais da pele ou intestinos, incluindo *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* ou *Candida* spp., são tipicamente causadores do sepse neonatal tardia³³.

O microbioma intestinal é composto principalmente por *Enterobacteriaceae* de baixa densidade, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre outros³⁴. Nas amostras fecais verificou-se que após a administração do protocolo da IOC (T1–7º dia), o aumento do gênero *Staphylococcus*. Este resultado corrobora com estudos que apontam a transferência bacteriana do leite materno para o RNPT, pois este foi o gênero mais abundante observado nas amostras, dessa maneira a microbiota oral desempenha um papel importante na colonização da microbiota intestinal dos neonatos, pois é passagem obrigatória para o Leite Humano (LH) chegar ao trato gastrointestinal^{35,15}. Além disso, a cavidade oral do neonato está em constante exposição ao ambiente e juntamente com a produção de saliva pode facilitar que gêneros como *Streptococcus* presente neste local e que não se aderem a superfície oral, sejam engolidas e participem da colonização intestinal^{15,36,37}.

Percebemos que bactérias do gênero *Enterococcus* aumentaram com o decorrer do tempo; fato também evidenciado em outro estudo, no qual a abundância e dominância deste gênero foi associada ao tratamento com antibiótico por até duas semanas após a suspensão do medicamento. Este mesmo estudo, chama a atenção para a possibilidade de conversão dos *Enterococcus* de comensais intestinais a patógenos nosocomiais, por apresentar resistência a múltiplas drogas e outros determinantes de virulência, representando um risco a saúde já debilitada destes neonatos³⁸.

Outros gêneros foram identificados nas amostras como *Lachnoanaerobaculum*, *Listeria* e *Filobacterium* que podem ter a presença explicada por contaminação cruzada no ambiente hospitalar, apesar de não termos realizados testes de contaminação da microbiota ambiental. As espécies desses gêneros podem se relacionar a infecção hospitalar da contaminação do recém-nascido durante o parto^{39,40}.

As bactérias do gênero *Lachnoanaerobaculum* são Gram-positivas, anaeróbias obrigatórias e em nosso estudo apresentaram comportamento decrescente de multiplicação no decorrer do tempo. Essas bactérias podem ser isoladas de cavidade oral, intestino delgado, sangue e líquido amniótico de humanos; e, estudo de Hedberg et al (2012) isolou a cepa a partir de biopsia intestinal pertencente a criança com doença celíaca⁴¹. Destacamos que o RNPT que apresentou 91% de prevalência do gênero citado no mecônio e 63% nas fezes ao sétimo dia de vida veio a óbito por sepse; o que chama a atenção para o risco da presença deste gênero em microbiota intestinal de prematuros.

O gênero *Listeria* é anaeróbio facultativo e causador da listeriose, doença que afeta principalmente gestantes, crianças e idosos. Em gestantes a sua ocorrência está associada a aborto espontâneo e trabalho de parto prematuro espontâneo^{42,43}; a sua transmissão para recém-nascidos é considerada vertical, e está associada a maiores taxas de prematuridade, natimortalidade^{42,43} e infecções neonatais congênitas⁴³. Em nosso estudo, o gênero esteve presente no mecônio e ausente nas fezes ao sétimo dia de vida; em um dos neonatos, a prevalência de *Listeria* chegou a 99% no mecônio, provavelmente em consequência de infecção urinária apresentada pela gestante; e, o RNPT veio a óbito por sepse, associada infecção congênita, enterocolite necrotizante e síndrome do desconforto respiratório (Grau IV). Este neonato, também apresentou a prevalência de 81% de *Enterococcus* nas fezes ao sétimo dia de vida.

As *Filobacterium* são bactérias Gram-negativas, que apresentam crescimento em condições microaeróbias; e, induzem doenças respiratórias crônicas em roedores⁴⁴. No nosso

estudo, o crescimento apresentou declínio entre as amostras de fezes pesquisadas (T0 e T1), chegando a aproximadamente 15% no mecônio e ausência no sétimo dia de vida, fato que corrobora com a literatura, uma vez que bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas se apresentam em um primeiro momento na microbiota intestinal e posteriormente são substituídas por bactérias anaeróbias, devido ao consumo deste gás pelas cepas colonizadoras iniciais²⁷. Um dos neonatos, apresentou prevalência de aproximadamente 90% de *Filobacterium* no mecônio, com histórico de infecção congênita neonatal e mãe com infecção por vulvovaginite na gestação. Na amostra de fezes ao sétimo dia de vida deste, as maiores prevalências foram devido aos gêneros *Enterococcus* (63%) e *Ralstonia* (32%).

O gênero *Ralstonia* é um bacilo Gram-negativo, com quatro espécies patogênicas (*Ralstonia picketti*, *Ralstonia Solanacearum*, *Ralstonia insidiosa* e *Ralstonia mannitolilytica*) associadas a infecções em hospedeiros imunocomprometidos⁴⁵. Diante, do apresentado chamamos a atenção de profissionais de saúde para a realização de cultura de vigilância em amostras fecais de forma a detectar precocemente microrganismos patogênicos presentes na microbiota do trato gastrointestinal de RNPT que possivelmente venham a desenvolver morbidades que comprometam ainda mais o estado clínico do neonato; e, para o uso adequado de antibióticos no período neonatal. A disbiose microbiana em prematuros pode promover consequências de curto e longo prazo, como: transtornos metabólicos e neurológicos, alergias, doenças infecciosas, intestinais, cardiovasculares e broncopulmonar¹.

Nesta pesquisa, metade das mães apresentaram infecção vaginal e urinária e a maioria tiveram um parto vaginal, fato que pode ter contribuído para uma possível colonização disbiótica de seus bebês. Durante o parto, o neonato entra em contato com bactérias específicas de cada tipo de entrega (vaginal ou cesárea), o que permite que bactérias aeróbicas, colonizem rapidamente o intestino².

A composição da microbiota intestinal em neonatos é essencial para estimular o sistema imunológico e para a integridade da barreira intestinal². No entanto, nosso conhecimento sobre a montagem inicial do microbioma intestinal em neonatos humanos é limitado, e o progresso científico neste campo interdisciplinar é prejudicado devido à individualidade na composição desta. Nosso estudo aborda os processos ecológicos que resultam na individualidade observada de microrganismos no trato gastrointestinal entre prematuros extremos e nascidos a termo.

Considerando a importância do tipo de alimentação com leite materno para a nutrição do RNPT, práticas como a IOC auxiliam no desenvolvimento da imunidade e na colonização dessa população. Tendo em vista que a maior parte dos neonatos desta investigação eram

prematuros de EBP, e na impossibilidade de ser iniciada a alimentação precocemente, a IOC pode ser iniciada anterior a dieta enteral, e, em teoria antecipar o efeito protetor como terapia imunológica reduzindo a morbi-mortalidade desses RNPT⁷. Estudos apontam que a IOC pode ser utilizada como uma terapia imune para os RNPT, especialmente, o de EBP e Muito Baixo Peso (MBP), devido aos efeitos imune-estimuladores sistêmicos que protegem contra possíveis infecções⁷.

Destaca-se como pontos fortes do atual estudo: pesquisa original que seguiu um protocolo específico e cuidadoso de coleta de amostras fecais, em série, de RNPT com nascimento em hospital público no Nordeste brasileiro, que permitiu comparar os perfis da microbiota intestinal. No entanto, possui algumas limitações, como uma amostra de conveniência, pequeno tamanho amostral e perda de acompanhamento de algumas amostras fecais (devido à baixa contagem de leituras).

Conclusão

Não foi observado efeito significativo da IOC sobre a evolução dos gêneros bacterianos comensais na primeira semana de vida dos RNPT.

Inicialmente a microbiota apresentou baixa diversidade, com tendência à elevação, o que pode representar um bom prognóstico. Embora não tenha havido dominância de gêneros específicos pode-se destacar a maior prevalência de *Bacteroides*, *Streptococcus* e *Listeria* na primeira amostra e *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Bacteroides* na segunda amostra.

Não houve significância estatística para as análises de abundâncias relativas quanto aos gêneros, podendo ser justificado por: a) fatores pré-nascimento: infecções e comorbidades maternas importantes, aliadas ao precário acompanhamento de pré-natal; b) pós-nascimento: retardo de início da dieta enteral, todos os neonatos estarem em utilização de antibiótico, prematuridade extrema (idade gestacional) de EBP; c) fatores ambientais: provável contaminação ambiental cruzada; e, d) fatores ainda desconhecidos.

Esses resultados refletem os achados da microbiota intestinal de um grupo de RNPT que realizaram o protocolo da IOC, internados em UTIN de uma cidade do Nordeste brasileiro; achados que não podem ser generalizados para outros RNPT ou nascidos a termo oriundos de outras populações. Por fim, sugere-se a realização de estudos com maior tempo de observação e com amostras maiores, para que se possa estabelecer possíveis relações causais.

Referências

1. Ahearn-Ford S, Berrington JE, Stewart CJ. Development of the gut microbiome in early life. *Exp Physiol*. 2022 May;107(5):415-421.
2. Wernroth ML, Peura S, Hedman AM, Hetty S, Vicenzi S, Kennedy B, Fall K, Svennblad B, Andolf E, Pershagen G, Theorell-Haglöw J, Nguyen D, Sayols-Baixeras S, Dekkers KF, Bertilsson S, Almqvist C, Dicksved J, Fall T. Development of gut microbiota during the first 2 years of life. *Sci Rep*. 2022 May 31;12(1):9080.
3. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2017 Dec 1;81(4).
4. Kijner S, Kolodny O, Yassour M. Human milk oligosaccharides and the infant gut microbiome from an eco-evolutionary perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2022 Aug;68:102156.
5. Plaza-Díaz J, Fontana L, Gil A. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients*. 2018 Aug 8;10(8):1038
6. Fehr K, Moossavi S, Sbihi H, Boutin RCT, Bode L, Robertson B, et al. Breastmilk Feeding Practices Are Associated with the Co-Occurrence of Bacteria in Mothers' Milk and the Infant Gut: the CHILD Cohort Study. *Cell Host Microbe*. 2020 Aug 12;28(2):285-297.e4.
7. Rodriguez NA; Vento M; Claud EC; Wang CE; Caplan MS Oropharyngeal administration of mother's colostrum, health outcomes of premature infants: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, London. 2015; 16: 453.
8. Parigi SM, Eldh M, Larssen P, Gabrielsson S, Villablanca EJ. Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. *Front Immunol*. 2015 Aug 19;6:415.
9. Chen C, Liao J, Xia Y, Liu X, Jones R, Haran J, McCormick B, Sampson TR, Alam A, Ye K. Gut microbiota regulate Alzheimer's disease pathologies and cognitive disorders via PUFA-associated neuroinflammation. *Gut*. 2022 Nov;71(11):2233-2252.
10. Gidrewicz D.A., Fenton T.R. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatrics*. 2014;14:216
11. Gila-Diaz A, Arribas SM, Algara A, Martín-Cabrejas MA, López de Pablo ÁL, Sáenz de Pipaón M, Ramiro-Cortijo D. A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity. *Nutrients*. 2019 Jun 10;11(6):1307.

12. Da Cruz Martins C, de Santana Xavier Ramos M, Viana Cardoso Amaral M, Santos Passos Costa J, Souza Cerqueira E, de Oliveira Vieira T, da Cruz SS, Oliveira Vieira G. Colostrum oropharyngeal immunotherapy for very low birth weight preterm infants: protocol of an intervention study. *BMC Pediatr.* 2020 Aug 7;20(1):371
13. Garofalo NA, Caplan MS. Oropharyngeal Mother's Milk: State of the Science and Influence on Necrotizing Enterocolitis. *Clin Perinatol.* 2019 Mar;46(1):77-88. doi: 10.1016/j.clp.2018.09.005. Epub 2018 Dec 13.
14. Xavier Ramos MS, Martins CDC, Souza ES, Vieira GO, Gomes-Filho IS, Figueiredo ACMG, Pereira MG, Cruz SSD. Oropharyngeal colostrum immunotherapy and nutrition in preterm newborns: meta-analysis. *Rev Saude Publica.* 2021 Dec 17;55:59.
15. Cortez RV, Fernandes A, Sparvoli LG, Padilha M, Feferbaum R, Neto CM, Taddei CR. Impact of Oropharyngeal Administration of Colostrum in Preterm Newborns' Oral Microbiome. *Nutrients.* 2021 Nov 24;13(12):4224.
16. Martín-Álvarez E, Diaz-Castro J, Peña-Caballero M, Serrano-López L, Moreno-Fernández J, Sánchez-Martínez B, et al. Oropharyngeal colostrum positively modulates the inflammatory response in preterm neonates. *Nutrients.* 2020 Feb;12(2):413.
17. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* 2013;7(17):5112-20.
18. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 2019,37, 852–857.
19. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016 Jul;13(7):581-3.
20. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome.* 2018, 6: 90.
21. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D590-6.

22. Mcmurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*. 2013; 8 (4):e61217.
23. Oksanen, J. *Vegan: Community Ecology Package*, 2016. Disponível em:<<https://github.com/vegandevs/vegan/issues%0Ahttps://github.com/vegandevs/vegan/issues%0Ahttps://github.com/vegandevs/vegan/issues>>
24. Lahti L, Shetty S. Introduction to the microbiome R package. Disponível em: <<http://bioconductor.statistik.tudortmund.de/packages/3.6/bioc/vignettes/microbiome/inst/doc/vignette.html>>.
25. Hadley W. *ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis*. 2nd editio ed. [s.l.] Springer, 2016.
26. Dhariwal A. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic acids research*. 2017; 45 (W1): W180–W188.
27. Lee JK, Hern Tan LT, Ramadas A, Ab Mutalib NS, Lee LH. Exploring the Role of Gut Bacteria in Health and Disease in Preterm Neonates. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Sep 23;17(19):6963.
28. Chong-Neto HJ; Pastorino AC; Melo ACCDB; Medeiros D; Kuschnir FC; Alonso MLO. et al. A microbiota intestinal e sua interface com o sistema imunológico. *Arq. Asma, Alerg. Imunol*. 2019; 3(4): 406-420
29. Chang HY, Chiang Chiau JS, Chang JH, Hsu CH, Lin CY, Ko MH, et al. Characteristics of Gut Microbiota in Small for Gestational Age Infants with Very Low Birth Weight. *Nutrients*. 2022 Dec 4;14(23):5158.
30. Asbury MR, Butcher J, Copeland JK, Unger S, Bando N, Comelli EM. et al. Mothers of Preterm Infants Have Individualized Breast Milk Microbiota that Changes Temporally Based on Maternal Characteristics. *Cell Host Microbe*. 2020; 28(5):669-682.e4.
31. Zwitterink RD, Renes IB, van Lingen RA, van Zoeren-Grobben D, Konstanti P, Norbruis OF, et al. Association between duration of intravenous antibiotic administration and early-life microbiota development in late-preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37:475-83.
32. Seki D, Schauburger C, Hausmann B, Berger A, Wisgrill L, Berry D. Individuality of the Extremely Premature Infant Gut Microbiota Is Driven by Ecological Drift. *mSystems*. 2022 Jun 28;7(3):e0016322.

33. Dong, Y.; Speer, C.P. Late-onset neonatal sepsis: Recent developments. *Arch. Dis. Child.-Fetal Neonatal Ed.* 2015, 100, F257–F263.
34. Brewer MR, Maffei D, Cerise J, Ahn S, DeVoti J, Codipilly C. et al. Determinants of the lung microbiome in intubated premature infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 2021 out;34(19):3220-3226.
35. Biagi E, Aceti A, Quercia S, Beghetti I, Rampelli S, Turrone S. et al. Microbial community dynamics in mother's milk and infant's mouth and gut in moderately preterm infants. *Front. Microbiol.* 2018;9: 2512.
36. Ding T., Schloss P.D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature.* 2014;509:357–360. doi: 10.1038/nature13178.
37. Ruiz L., Bacigalupe R., García-Carral C., Boix-Amoros A., Argüello H., Silva C.B., de los Angeles Checa M., Mira A., Rodríguez J.M. Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth. *Sci. Rep.* 2019;9:8435.
38. Zwittink RD, Renes IB, van Lingen RA, van Zoeren-Grobbe D, Konstanti P, Norbruis OF, et al. Association between duration of intravenous antibiotic administration and early-life microbiota development in late-preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 Mar;37(3):475-483
39. Shi C, Lv D, Zhou K, Jin T, Wang G, Wang B, et al. Clinical and Laboratory Characteristics of Patients infected by *Listeria monocytogenes* at a Tertiary Hospital in Hefei City, China. *Infect Drug Resist.* 2021 Oct 25;14:4409-4419.
40. Yoko Ida, Takahiro Okuyama, Koji Araki, Kumiko Sekiguchi, Takashi Watanabe, Hiroaki Ohnishi, First description of *Lachnoanaerobaculum orale* as a possible cause of human bacteremia. *Anaerobe.* 2022; 73: 102506.
41. Hedberg ME, Moore ERB, Svensson-Stadler L, Hörstedt P, Baranov V, Hernell O, et al. *Lachnoanaerobaculum* gen. nov., a new genus in the Lachnospiraceae: characterization of *Lachnoanaerobaculum umeaense* gen. nov., sp. nov., isolated from the human small intestine, and *Lachnoanaerobaculum orale* sp. nov., isolated from saliva, and reclassification of *Eubacterium saburreum* (Prevot 1966) Holdeman and Moore 1970 as *Lachnoanaerobaculum saburreum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012 Nov;62(Pt 11):2685-2690

42. Craig A, Federspiel J, Wein L, Thompson J, Dotters-Katz S. Maternal and obstetric outcomes of listeria pregnancy: insights from a national cohort. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2022 Dec;35(25):10010-10016.
43. Khsim IEF, Mohanaraj-Anton A, Horte IB, Lamont RF, Khan KS, Jørgensen JS. Et al. Listeriose na gravidez: Uma revisão abrangente da exposição materna, tratamento e complicações neonatais. *BJOG.*2022; 129 (9): 1427-1433.
44. Ike F, Sakamoto M, Ohkuma M, Kajita A, Matsushita S, Kokubo T. *Filobacterium rodentium* gen. nov., sp. nov., a member of Filobacteriaceae fam. nov. within the phylum Bacteroidetes; includes a microaerobic filamentous bacterium isolated from specimens from diseased rodent respiratory tracts. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(1):150-157.
45. Sharma D, Sharma P, Soni P, Gupta B. *Ralstonia picketti* sepsis neonatal: relato de caso. *Notas BMC Res.* 2017;10(1):28.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é um estudo inovador, sendo o único trabalho nacional que discutiu a evolução da microbiota intestinal de RNPT de MBP e EBP, com extrema relevância na área clínica. Essa tese teve como objetivo principal avaliar, por meio da análise do DNA metagenômico, o estabelecimento da microbiota intestinal em RNPT, tratados ou não com a IOC em hospitais de Feira de Santana – BA. Por questões éticas, a hipótese principal do estudo não foi testada, entretanto os dados foram analisados intragrupos independentemente.

Para alcançar os objetivos propostos, foi elaborado um protocolo de coleta de amostra fecal de RNPT MBP, além da definição de um algoritmo, que norteou o fluxo do processo de trabalho da equipe de saúde. Por meio deste protocolo foi possível manter a qualidade do material coletado e a integridade do DNA bacteriano, para identificação das espécies bacterianas da microbiota intestinal dos neonatos investigados.

Na análise do grupo controle, o qual o objetivo foi avaliar o desenvolvimento e a diversidade da microbiota intestinal de RNPT no início da vida (mecônio) e ao sétimo dia de vida, mediante análises do perfil microbiano baseadas no gene 16S rRNA, verificou-se que a evolução da microbiota dos neonatos foi dinâmica, com baixa diversidade. Os gêneros observados foram: *Enterobacterales*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*. Em ambas as amostras houve prevalência do gênero *Staphylococcus*. Após as análises de abundância relativa, houve significância estatística quando foi comparada a primeira amostra com a última quanto aos gêneros: *Enterobacterales*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*.

No grupo de intervenção, o qual teve como finalidade verificar o efeito da IOC sob a colonização intestinal dos RNPT, os resultados evidenciaram que não foi observado efeito significativo sobre a evolução dos gêneros bacterianos comensais na primeira semana de vida dos neonatos. A microbiota apresentou baixa diversidade, entretanto com tendência à elevação, sinalizando um prognóstico positivo. Destacou-se prevalência na primeira amostra dos gêneros microbianos: *Bacteroides*, *Streptococcus* e *Listeria*; e na última amostra de: *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Bacteroides*. Não houve significância estatística para as análises de abundâncias relativas quanto aos gêneros das amostras deste grupo.

Como pontos fortes destaca-se: a) Pesquisa original e bem projetada; b) o ineditismo na construção e testagem de um protocolo de coleta de amostras fecais, reforçando que a

padronização de todas as etapas possibilita conclusões mais robustas e comparáveis entre os estudos; e c) o pioneirismo em investigar a evolução da microbiota intestinal na primeira semana de vida de RNPT, tratados ou não com o protocolo da IOC, atendidos em um hospital público de um município do Nordeste brasileiro.

Todavia, esta investigação possui algumas limitações como: a impossibilidade de comparação dos resultados entre os grupos, o método de seleção dos participantes por conveniência, o pequeno tamanho amostral e questões logísticas (tempo de coleta curto na unidade de intervenção, baixo número de leitos na UTI neonatal do HIPS, o que implica diretamente na velocidade de acesso da população do estudo). Todos esses fatores, de alguma maneira, podem ter impactado no poder estatístico do estudo, não sendo possível a generalização dos resultados para RNPT ou a termo de outras populações.

Em síntese, espera-se que o protocolo da IOC em neonatos pré-termos internados em UTIN dos hospitais públicas e privados, sejam amplamente implantados objetivando a promoção e desenvolvimento de uma microbiota saudável, além de todos os benefícios nutricionais e imunomoduladores que o leite materno possui, fortalecendo o estímulo precoce do aleitamento materno em consonância com as recomendações do Ministério da Saúde.

Por fim, os achados desta pesquisa refletem resultados da evolução da microbiota intestinal de RNPT internados em UTIN de uma cidade do Nordeste brasileiro, sugerindo-se a realização de estudos com maior tempo de observação e com amostras maiores para melhores elucidções.

REFERÊNCIAS

AGAARD, K.; MA, J.; ANTONY, K.M. et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science translation medicine**, v. 6, n. 237, 2014.

ROCHA, A. S.; FALCÃO, I. R.; TEIXEIRA, C. S. S. et al. Determinantes do nascimento prematuro: proposta de um modelo teórico hierarquizado. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 27, n. 8, 2022.

ALMEIDA FILHO, N. Modelos de determinação social das doenças crônicas não-transmissíveis. **Ciência e Saúde coletiva**, v. 9, n. 4, p. 865-884, 2004

ALMEIDA FILHO, N., *et al.*, orgs. **Teoria epidemiológica hoje: fundamentos, interfaces, tendências [online]**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1998. 256 p. Epidemiológica series, nº2.

ALMEIDA, T.S.O. de; LINS, R.P.; CAMELO, A. de L.; MELLO, D.C.C.L de. Investigação sobre os fatores de risco da prematuridade: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 17, n. 3, p. 301-308, 2013.

AL-QARAGHOULI, M.; FANG, Y.M.V. Effect of fetal sex on maternal and obstetric outcomes. **Front Pediatr**, v. 5, p. 144, 2017.

AMORIM, M.M.R.; LIMA, L.A.; LOPES, C.V. et al. Fatores de risco para a gravidez na adolescência em uma maternidade-escola da Paraíba: estudo caso-controlado. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 31, n. 8, p. 404-410, 2009.

ARBOLEYA, S.; SÁNCHEZ, B.; MILANI, C. et al. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. **J Pediatr**, v. 166, n. 3, p. 538-544, 2015.

ASTOLFI, P.; DE PASQUALE, A.; ZONTA, L.A. Paternal age and preterm birth in Italy, 1990 to 1998. **Epidemiology**, v. 17, p. 218-221, 2006.

AZAD, K.; MATHEWS, J. Azad K, Mathews J. Preventing newborn deaths due to prematurity. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 36, p. 131-144, 2016.

BARATA, R. B.: 'Causalidade e epidemiologia'. **História, Ciências, Saúde—Manguinhos**, IV, n. 1, p. 31-49, 1997.

BIAGI, E.; QUERCIA, S.; ACETI, A. et al. The Bacterial Ecosystem of Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut. **Front Microbiol**, v. 8, 2017.

BLASER, MJ. The theory of disappearing microbiota and the epidemics of chronic diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 8, 2017.

BOKULICH, N. A.; KAEHLER, B.D.; RIDEOUT, J.R. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2018.

BOLYEN, E.; RIDEOUT, J.R.; DILLON, M.R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 2019.

BORDAGE G. Conceptual frameworks to illuminate and magnify. **Med Educ**. V. 43, p. 312-9, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Atenção Humanizada ao Recém-nascido de Baixo Peso: Manual Técnico Método Canguru**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Atenção Humanizada ao recém-nascido: Método Canguru: manual técnico**. 3. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 340 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde**. Brasília, 2022.

BREITWIESER, F.P.; LU, J.; SALZBERG, S.L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. **Brief Bioinform**, v. 20, n. 4, p. 1125-1136, 2019.

BRUGÈRE, J. F. et al. Tools for stools: the challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 9, n. 4, 2009.

BUSS, P. M; PELLEGRINI FILHO, A. A saúde e seus determinantes sociais. **Physis**, v. 17, n. 1, Abr. 2007.

CAI, C.; VANDERMEER, B.; KHURANA R. et al. The impact of occupational shift work and working hours during pregnancy on health outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 221, n. 6, p. 563-576, 2019.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CARLINO, F.C.; LAMÔNICA, D.A.C; ALVARENGA, K.F. Avaliação da função auditiva receptiva, expressiva e visual em crianças prematuras. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica**, v. 22, n. 1, p. 19-24, 20200

CHEN, G.; GUO, Y., ABRAMSON, M.J. et al. Exposure to low concentrations of air pollutants and adverse birth outcomes in Brisbane, Australia, 2003-2013. **Sci Total Environ**, v. 622, n. 623, p. 721-726, 2018.

CHO, I.; BLASER, M.J. The Human Microbiome: at the interface of health and disease. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 4, 2012.

COLLADO, M. C. et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-13, 2016.

DAHL, C. et al. Preterm Infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure. **International Journal of Epidemiology**, v. 47, n. 5, p. 1658–1669, 2018.

DEVI, S. G. et al. A Rapid and Economical Method for Efficient DNA Extraction from Diverse Soils Suitable for Metagenomic Applications. **PLoS One**, v. 10, n. 7, 2015.

DOMINGUES, R.M.S.M.; VIELLAS, E.F.; DIAS, M.A.B. et al. Adequação da assistência pré-natal segundo as características maternas no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 37, n. 3, p. 140-147, 2015.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **nature reviews microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20-32, 2015.

DONOVAN, S. M.; COMSTOCK, S. S. Human Milk Oligosaccharides Influence Neonatal Mucosal and Systemic Immunity. **Ann Nutr Metab**, v. 69, n. 2, 42-51, 2016.

DVORAK, B. et al. Comparison of Epidermal Growth Factor and Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor for Prevention of Experimental Necrotizing Enterocolitis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 47, p. 11-18, 2008.

FELICE, T.D.; RIBEIRO, J.A.A.B.; ISHIZUKA, R.O.R.; GODOY, G.J. Motor development in nine-month-old preterm infants. **Med Reabil.**, v. 29, n. 1, p.19-22, 2010.

FERNÁNDEZ, L. et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacol Res**, v. 69, n. 1, p. 1-10, 2013.

FERRARO, A. A. et al. Cesarean Delivery and Hypertension in Early Adulthood. **American Journal of Epidemiology**, v. 188, n. 7, p. 1296-1303, 2019.

FORSGREN, M. et al. Late preterm birth has direct and indirect effects on infant gut microbiota development during the first six months of life. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 106, n. 7, p. 1103-1109, 2017.

FREITAS, J. et al. Maternal, fetal and neonatal consequences associated with the use of crack cocaine during the gestational period: a systematic review and meta-analysis. **Arch Gynecol Obstet**, v. 298, n. 3, p. 487-503, 2018.

FROST, B. L. et al. Maternal breast milk transforming growth factor-beta and feeding intolerance in preterm infants. **Pediatrics research**, v. 76, n. 4, p. 386-393, 2014.

GAROFALO, N.A.; CAPLAN, M.S. Oropharyngeal Mother's Milk: State of the Science and Influence on Necrotizing Enterocolitis. **Clin Perinatol**, v. 46, n. 1, p. 77-88, 2019.

GOULET, O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. **Nutr Rev**, v. 73, n. 1, 2015.

GRANGER, C.L., EMBLETON N.D., PALMER J.M. et al. Maternal breastmilk, infant gut microbiome and the impact on preterm infant health. **Acta Paediatrica**, v. 110, p. 450-457, 2021.

GREGORY, K. E. et al., Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. **Microbiome**, v. 4, n. 1, 2016.

GROER, M. W. et al. The very low birth weight infant microbiome and childhood health. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 105, n. 4, p. 252-64, 2015.

GUARALDI, F.; SALVATORI, G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 94, 2012.

GUILHERME, J. O.; MATTAR, M. J. G.; BATISTA, T. M. C. **Colostroterapia: uma proposta coerente de suplementação imunológica em recém-nascidos de muito baixo peso.** In: V Congresso Brasileiro de Bancos de Leite Humano e I Congresso Ibero-americano de Bancos de Leite Humano. Set, 2010. Brasília. Anais do Congresso. P 70-71.

HADLEY, W. **ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis**. 2nd editio ed. [s.l.] Springer, 2016.

HANSEN et al., Delivery Shapes Gut Colonization Pattern and Modulates Regulatory Immunity in Mice. **J Immunol**, v. 193, n. 3, 2014.

HARVILLE, E.W.; RABITO, F.A. Housing conditions and birth outcomes: The National Child Development Study. **Environ Res** 2018; 161:153-157.

HENTGES, C.R. et al. Serum levels of caffeine in umbilical cord and apnea of prematurity. **J Pediatr.**, v. 86, n. 2, p. 137-142, 2010.

HENTGES, C.R.; GUEDES, R.R.; SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S. Serum levels of caffeine in umbilical cord and apnea of prematurity. **Journal Pediatrics**, v. 86, n. 2, p. 137-142, 2010.

HO, T.T. et al. Dichotomous development of the gut microbiome in preterm infants. **Microbiome**, v. 6. n. 1, 2018.

HURLEY, W.L.; THEIL, P.K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients.**, v. 3, 2011.

IRAPORDA, C. et al. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. **Immunobiology**, v. 220, n. 10, p. 1161-9, 2015.

JANDHYALA, S. M. Role of the normal gut microbiota. **World J Gastroenterol.**, v. 21, n. 29, p. 8787–8803, 2015.

JOHANSSONS, S. et al. Risk of high blood pressure among Young men increases with the degree of immaturity at birth. **Journal of American Heart Association**. V. 112, p. 3430-6, 2005.

JOHNSON, T. J. et al. Cost Savings of Human Milk as a Strategy to Reduce the Incidence of Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants. **Neonatology**, v. 107, n. 4, p. 271–276, 2015.

JOST, T. et al. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. **Nutr Rev**, v. 73, n. 7, p. 426-437, 2015.

KEATS, E.C; HAIDER, B.A.; TAM, E. et al. Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 3, n. 3, 2019.

KELKAY, B.; OMER, A.; TEFERI, Y. et al. Factors associated with singleton preterm birth in Shire Suhul general hospital, Northern Ethiopia, 2018. **J pregnancy**, v. 2019, p. 4629, 2019.

KHAN, A.; MI, H.; GAO, F. et al. Dynamic changes of the gut microbial colonization in preterm infants with different time points after birth. **Front Microbiol.** v. 17, p. 14, 2023.

KIJNER S, KOLODNY O, YASSOUR M. Human milk oligosaccharides and the infant gut microbiome from an eco-evolutionary perspective. **Curr Opin Microbiol.**, v. 68, 2022.

KOZICH, J. J. et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112–5120, 2013.

LAHTI, L.; SHETTY, S. **Introduction to the microbiome R package**. 2012-2019. Disponível em:

<<http://bioconductor.statistik.tudortmund.de/packages/3.6/bioc/vignettes/microbiome/inst/doc/vignette.html>>.

LIMA, S.D.; CARVALHO, M.L.D.; Vasconcelos AGG. Proposta de modelo hierarquizado aplicado à investigação de fatores de risco de óbito infantil neonatal. **Cad Saude Publica**, v. 24, n. 8, p. 1910-1916, 2008.

LUDFORD, I.; SCHEIL, W.; TUCKER, G. et al. Pregnancy outcomes for nulliparous women of advanced maternal age in South Australia, 1998-2008. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 52, n. 3, p. 235-241, 2012.

MALACOVA, E.; REGAN, A.; NASSAR, N. et al. Risk of stillbirth, preterm delivery, and fetal growth restriction following exposure in a previous birth: systematic review and meta-analysis. **BJOG**, v. 125, n. 2, p. 183-192, 2018.

MANDAL, R. S.; SAHA, S.; DAS, S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 13, n. 3, 2015.

MANDE, S.S.; MOHAMMED, M.H.; GHOSH, T.S. Classificação de sequências metagenômicas: métodos e desafios. **Breve Bioinform**, v. 13, p. 669-681, 2012.

MARTÍN-ÁLVAREZ, E.; DIAZ-CASTRO, J.; PEÑA-CABALLERO, M., et al. Oropharyngeal Colostrum Positively Modulates the Inflammatory Response in Preterm Neonates. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 413, 2020.

DA CRUZ MARTINS, C.; XAVIER RAMOS, M.S.; AMARAL, M.V.C. et al. Colostrum oropharyngeal immunotherapy for very low birth weight preterm infants: protocol of an intervention study. **BMC Pediatrics**, v. 20, p. 371, 2020.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MERKLINGER-GRUCHALA, A.; KAPISZEWSKA, M. The effect of prenatal stress, proxied by marital and paternity status, on the risk of preterm birth. **Int J Environ Res Public Health**, v. 16, n. 2, p. 273, 2019.

MILANI, C.; DURANTI, S.; BOTTACINI, F. et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 8, n. 81, 2017.

MOREIRA, L.N. **Evolução da colonização da microbiota fecal de recém-nascidos prematuros submetidos à colostroterapia**. 2019. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

MURPHY, D.J. Epidemiology and environmental factors in preterm labour. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.**v. 21, n. 5, p. 773-789, 2007.

MURPHY, K. et al. The Composition of Human Milk and Infant Faecal Microbiota Over the First Three Months of Life: A Pilot Study. **Sci Rep.**, v. 7, 2017.

NOLAN, L.S. et al. Review of the Immunomodulating Components of Maternal Breast Milk and Protection Against Necrotizing Enterocolitis. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 14, 2020.

NOLAN, L.S. et al. The Role of Human Milk Oligosaccharides and Probiotics on the Neonatal Microbiome and Risk of Necrotizing Enterocolitis: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 3052, 2020.

NOVAK, F.R.; et al. Coloostro humano: fonte natural de probióticos? **Jornal de Pediatria.**, v. 77, n. 7, p. 265-70, 2001.

OKSANEN, J. et al. **Vegan: Community Ecology Package, 2016.** Disponível em:<<https://github.com/vegandevs/vegan/issues%0Ahttps://github.com/vegandevs/vegan/issues%0Ahttps://github.com/vegandevs/vegan/issues>>

PANNARAJ, P. S. et al. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. **JAMA Pediatr**, v. 171, n. 7, p. 647-654, 2017.

PARIGI, S.M.; ELDH, M.; LARSEN, P. et al. Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. **Front Immunol.**, v. 6, p. 415, 2015.

PATEL, A. L. et al. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. **Journal of Perinatology**, v. 33, n. 7, p. 514-519, 2013.

PATEL, A.B.; SHAIKH, S. Efficacy of breast milk gastric lavage in preterm neonates. **Indian Pediatrics.**, p. 44199-203, 2007.

PEREZ-CANO, F.J. Dietary Modulation of the Immune Function: Direct and Microbiota-Dependent Effect. **Nutrients**. V. 14, n. 9, p. 1957, 2022.

PIMENTEL, J.; ANSARI, U.; OMER, K. et al. Factors associated with short birth interval in low- and middle-income countries: a systematic review. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 20, n. 1, p. 156, 2020.

PLAZA-DÍAZ, J.; FONTANA, L.; GIL, A. Human milk oligosaccharides and immune system development. **Nutrients**, v. 10, n. 8, 2018.

POALELUNGI, C.V.; PLES, L.; HUDITA, D. et al. Risk factors and clinical follow-up of patients with preterm births in a tertiary referral maternity unit in Bucharest, Romania. **J Pak Med Assoc**, v. 68, n. 4, p. 559-564, 2018.

PUTTINI, R. F.; PEREIRA JÚNIOR, A; OLIVEIRA, L. R. Modelos explicativos em Saúde Coletiva: abordagem biopsicossocial e auto-organização. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 753-767, 2010.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D590, 2013.

RAJANI, P.S.; SEPPO, A.E.; JÄRVINEN, K.M. Immunologically Active Components in Human Milk and Development of Atopic Disease, With Emphasis on Food Allergy, in the Pediatric Population. **Front. Pediatr.**, v. 6, p. 218, 2018.

RAUTAVA, S. et al. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 9, 2012.

RAY C. et al. Human Milk Oligosaccharides: The Journey Ahead. **Int J Pediatr**, v. 2019, 2019.

RIBEIRO, K.D.S. et al. Evaluation of retinol levels in human colostrum in two samples collected at na intervalo f 24 hours. **Jornal de Pediatria**.v. 83, n. 4, p. 377-80, 2007.

RODRIGUES, M.C.C.; MELLO, R.R.; SILVA, K.S. et al. Desenvolvimento cognitivo de prematuros à idade escolar: proposta de modelo hierarquizado para investigação dos fatores de risco. **Cad Saude Publica**, v. 27, p. 1154-1164, 2011.

RODRIGUEZ, N.A. et al. Oropharyngeal administration of colostrum to extremely low birth weight infants: theoretical perspectives. **J Perinatol.**, v. 29, p. 1-7, 2009.

RODRIGUEZ, N.A.; VENTO, M.; CLAUD, E.C. et al. Oropharyngeal administration of mother's colostrum, health outcomes of premature infants: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, London. 2015; 16: 453.

ROMERO, R.; DEY, S.K.; FISHER, S.J. Preterm labor: one syndrome, many causes. **Science**, v. 345, n. 6198, p. 760-765, 2014.

ROUQUAYROL, MA; FILHO, NA. **Epidemiologia & Saúde**. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

ROZÉ, J.C.; ANCEL, P.Y.; MARCHAND-MARTIN, L. et al. Assessment of Neonatal Intensive Care Unit Practices and Preterm Newborn Gut Microbiota and 2-Year Neurodevelopmental Outcomes. **JAMA Netw Open.**, v. 3, n. 9, p.e2018119, 2020.

SADOVSKY, A.D.I.; MASCARELLO, K.C.; MIRANDA, A.E. et al. The associations that income, education, and ethnicity have with birthweight and prematurity: how close are they? **Rev Panam Salud Publica**, v. 42, p. e92-e, 2018.

SARRETA, F.O. **Educação permanente em saúde para os trabalhadores do SUS** [online]. São Paulo: Editora UNESP, 2009.

SCHOLTENS, P.A.M.J. The early settlers: intestinal microbiology in early life. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 3, p. 425-47, 2012.

SEIGEL, J. K. et al. Early administration of oropharyngeal colostrum to extremely low birth weight infants. **Breastfeeding Medicine**, v. 8, n. 6, 2013.

SIM, K.; POWELL, E.; CORNWELL, E. et al. Development of the gut microbiota during early life in premature and term infants. **Gut Pathog**, v. 15, n. 1, p. 3, 2023.

SOBRAL, A; FREITAS, CM. Modelo de Organização de Indicadores para Operacionalização dos Determinantes Socioambientais da Saúde. **Saúde Soc. São Paulo**, v.19, n.1, p.35-47, 2010.

SUNDERAM, S.; KISSIN, D.M.; CRAWFORD, S.B. et al. Assisted reproductive technology surveillance - United States, 2014. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 66, n. 6, p. 1, 2017.

TISSIER, H. **“Recherches sur la Flore Intestinale des Nourrissons (état Normal et Pathologique)**. Paris: Universidade de Paris, 1900.

TUDEHOPE, D. I. Human milk and the nutritional needs of preterm infants. **J Pediatr**. V. 162, n. 3, 2013.

UNDERWOOD, M.A. Human milk for the premature infant. **Pediatr Clin North Am**, v. 60, n. 1, 2013.

VENANCIO, S.I.; de ALMEIDA, H. Método Mãe Canguru: aplicação no Brasil, evidências científicas e impacto sobre o aleitamento materno. **J Pediatr (Rio J)**., v. 80, n. 5, p. S173-S180, 2004.

VICTORA, C.; BARROS, F.; MATIJASEVICH, A.; SILVEIRA, M. **Pesquisa para estimar a prevalência de nascimentos pré-termo no Brasil e explorar possíveis causas**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 2013. 18p.

VOGEL, J. P. et al. The global epidemiology of preterm birth. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 52, p. 3-12, 2018.

WALKER, A. Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients. **The Journal of pediatrics**, v. 156, n. 2 Suppl, p. S3-7, 2010.

WANG, M. et al. fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. **Journal of pediatrics Gastroenterology and nutrition**, v. 60, n. 6, p. 825-833, 2015.

WERNROTH, M.L.; PEURA, S.; HEDMAN, A.M. et al. Development of gut microbiota during the first 2 years of life. **Sci Rep**, v. 12, n. 1, p. 9080, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Preterm birth**. 2014. Acesso em: 15 set 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Preterm birth**. Geneva: World Health Organization; 2014. Acesso em: 15 set 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preterm birth** [Internet]. 2022. Acesso em 05 de maio de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>

ZHU, J.L.; MADSEN, K.M.; VESTERGAARD, M. et al. Paternal age and preterm birth. **Epidemiology**, v. 16, p. 259-262, 2005.

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Reconhecida pela Portaria Ministerial nº 874.86 de 19/12/86
Recredenciada pelo Decreto Estadual nº 9.271 de 14/12/2004

Feira de Santana, 29 de janeiro de 2019

CARTA DE ANUÊNCIA

Pelos presentes, Jessica Santos Passos Costa, brasileira – ES, portadora do CPF: 031.009.615-44, Graciete Oliveira Vieira, brasileira – BA, portadora CPF: 130928125-49, Heli Vieira Brandão, brasileira – BA, portadora CPF: 359.011.445-20, Gilmar Mercês de Jesus, brasileiro – BA, portador do CPF: 005.543.875-06, Tatiana de Oliveira Vieira, brasileira – BA, portadora CPF: 97436712500, Raquel Guimarães Benevides, brasileira – BA, portadora CPF: 00392337312, Helio Mitoshi Kamida, portador do CPF: 788.099.599-49, Camilla da Cruz Martins, portadora CPF: 00132817551, Mara Viana Cardoso, portadora CPF: 031205565-05, Ellayne Souza Cerqueira, brasileira- BA, portadora do CPF: 02646094507, Michelle de Santana Xavier Ramos, brasileira – BA, portadora CPF: 93623194549 e Matheus Batista dos Santos, brasileiro – BA, portador do CPF: 052467145-19, declaramos que participaremos de todas as etapas do projeto de pesquisa intitulado **“ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”** e nos comprometemos a observar as Normas da Resolução CNS 466/12, em Pesquisa com Seres Humanos.

Jessica Santos Passos Costa
Jessica Santos Passos Costa
Dranda. Ma. Saúde Coletiva UEFS

Heli Vieira Brandão
Heli Vieira Brandão
Profa. Dra. Adjunta UEFS

Tatiana de Oliveira Vieira
Tatiana de Oliveira Vieira
Profa. Dra. Adjunta UEFS

Helio Mitoshi Kamida
Helio Mitoshi Kamida
Prof. Dr. Titular UEFS

Mara Viana Cardoso
Mara Viana Cardoso
Ma. nda Saúde Coletiva UEFS

Michelle de Santana Xavier Ramos
Michelle de Santana Xavier Ramos
Dranda. Ma. Saúde Coletiva UEFS

Graciete Oliveira Vieira
Graciete Oliveira Vieira
Profa. Dra. Plena UEFS

Gilmar Mercês de Jesus
Gilmar Mercês de Jesus
Prof. Dr. Assistente UEFS

Raquel Benevides
Raquel Guimarães Benevides
Profa. Dra. Adjunta UEFS

Camilla da Cruz Martins
Camilla da Cruz Martins
Dranda. Ma. Saúde Coletiva UEFS

Ellayne Souza Cerqueira
Ellayne Souza Cerqueira
Esp. Nutr. Hospital HGCA

Matheus Batista dos Santos
Matheus Batista dos Santos
Dranda Ma. Biotecnologia UEFS

ANEXO B

Feira de Santana, 29 de janeiro de 2019

OF: 10/19

De: Charline Portugal
Diretora do Complexo Materno Infantil

Para: Dra. Raquel Guimarães Benevides
Professora Adjunta da Universidade de Estadual de Feira de Santana

Prezada Senhora,

Informo que autorizo a coleta de dados para o projeto intitulado **“ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”**, nesta unidade hospitalar tão logo seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana (CEP/UEFS) e inscrito no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC).

Na oportunidade nos colocamos a disposição para esclarecer eventuais dúvidas e aproveitamos o ensejo para renovar protestos de relevada estima e consideração.

Atenciosamente,



Charline Portugal
Diretora do Complexo Materno Infantil

ANEXO C

Feira de Santana, 08 de março de 2019

À Sra. ~~Charline Portugal~~
Diretora do Complexo Materno Infantil

Prezada senhora, encaminho o projeto intitulado “ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO” realizado pelos discentes do Doutorado do Programa de Pós Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana (PPGSC/UEFS) e pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Extensão em Saúde (NUPES/UEFS), Jessica Santos Passos Costa, Camilla da Cruz Martins, Mara Viana Cardoso, ~~Ellayra~~ Souza Cerqueira, Michelle de Santana Xavier Ramos, sob minha coordenação, para a Vossa apreciação e requerimento de autorização para realização deste projeto de pesquisa nesta instituição.

Trata-se de um ensaio clínico não-randomizado que busca avaliar o impacto da Terapia Imunológica Colostral na colonização de espécies bacteriana intestinais de prematuros com muito baixo peso, atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A pesquisa será realizada através de aplicação de inquérito à mãe e acompanhamento do prematuro de muito baixo peso na Unidade Neonatal, depois de aceite do sujeito da pesquisa e respectiva assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Ressalto que o referido projeto atende à normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, nova Resolução em substituição à 196/96, e está sendo encaminhado para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana. Portanto a coleta somente será iniciada mediante a autorização do mesmo.

Atenciosamente,



Profa. Dra. Raquel Guimarães Benevides

Professora Adjunta da Universidade Estadual de Feira de Santana

ANEXO D

Carta de aprovação de projeto – CNPQ

CNPq - Resultado do julgamento - [427466/2018-0] - Chamada MCTIC/CNPq N° 28/2018 - Universal/Faixa A - Até R\$ 30.000,00

----- Mensagem encaminhada -----

De: **Cnpq** <atendimento@cnpq.br>

Data: quarta-feira, 12 de dezembro de 2018

Assunto: CNPq - Resultado do julgamento - [427466/2018-0] - Chamada MCTIC/CNPq N° 28/2018 - Universal/Faixa A - Até R\$ 30.000,00

Para: helivb.fsa@gmail.com

Cc: ggsau@cnpq.br

Processo: 427466/2018-0

Chamada: Chamada MCTIC/CNPq N° 28/2018 - Universal/Faixa A - Até R\$ 30.000,00

Senhor(a) Heli Vieira Brandão,

Comunicamos que a Diretoria do CNPq aprovou a concessão de auxílio, conforme discriminado abaixo:

Custeio: R\$ 30.000,00

Para a implementação do benefício, é necessário preencher o Termo de Aceitação que se encontra disponível no endereço

<http://efomento.cnpq.br/efomento/termo?token=h4N86807P911068254089925347877>

e enviá-lo eletronicamente, clicando no botão "Enviar ao CNPq".

Os pareceres relativos a sua proposta poderão ser consultados na Plataforma Carlos Chagas (<http://carloschagas.cnpq.br/>).

Reiteramos que, caso a implementação não ocorra no prazo de 90 dias a partir de 06/12/2018 11:27:22, quando enviada a primeira notificação eletrônica do resultado do julgamento, a concessão será cancelada.

ANEXO E



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Reconhecida pela Portaria Ministerial nº 874.86 de 19/12/86
Recredenciada pelo Decreto Estadual nº 9.271 de 14/12/2004

Feira de Santana, 01 de abril de 2019

DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Eu, Hélio Mitsushi Kamida, inscrito sob CPF: 788.099.599-49, Prof. Dr. Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana – BA (UEFS), Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) e Diretor do Departamento de Ciências Biológicas (DCBIO) da UEFS, declaro estar ciente da parceria, para fins de direito, com a execução do projeto “ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM TRATAMENTO COM COLOSTROTERAPIA ATENDIDOS PELO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”. O LAPEM ficará responsável pelo recebimento das amostras fecais, armazenamento e análises da qualidade do DNA bacteriano. Nos comprometemos a observar as Normas da Resolução CNS 466/12, 580/18 e 510/16, em Pesquisa com Seres Humanos.

A handwritten signature in blue ink that reads "Hélio Mitsushi Kamida".

Hélio Mitsushi Kamida
Prof. Dr. Titular UEFS

ANEXO F

Protocolo de treinamento HIPS

Feira de Santana, 01 de abril de 2019

CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, Juliana Rigaud, coordenadora da equipe de enfermagem do Hospital Inácia Pinto (HIPS), Gostaria de declarar, em nome da equipe de enfermagem, que participaremos da etapa de coleta de amostra fecal (na ausência do pesquisador responsável) do projeto de pesquisa intitulado **"ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO"**, mediante realização de treinamento desses protocolos, tendo em vista que este é um procedimento fora da rotina da equipe do hospital. Nos comprometemos a observar as Normas da Resolução CNS 466/12, 580/18 e 510/16, em Pesquisa com Seres Humanos.



Juliana Rigaud

Coordenadora da Equipe de Enfermagem do Hospital Inácia Pinto (HIPS)

ANEXO G

Protocolo de treinamento HEC



Feira de Santana, 30 de abril de 2019

CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, **Livia Leite da Silva Macedo**, gerente operacional do Hospital Estadual da Criança (HEC), gostaria de declarar, em nome da equipe de enfermagem que participaremos da etapa de coleta de amostra fecal (na ausência do pesquisador responsável) do projeto de pesquisa intitulado **“ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”**, mediante realização de treinamento desses protocolos, tendo em vista que este é um procedimento fora da rotina da equipe do hospital. Nos comprometemos a observar as Normas da Resolução CNS 466/12, 580/18 e 510/16, em Pesquisa com Seres Humanos.

LÍVIA LEITE DA SILVA MACEDO
GERENTE OPERACIONAL

04.05.2019

ANEXO H

Declaração de colostroterapia HIPS

Feira de Santana, 01 de abril de 2019.

DECLARAÇÃO

Eu, Charline Portugal, Diretora do Complexo Materno Infantil do Hospital Inácia Pinto (HIPS), declaro que neste hospital possui o protocolo de administração de Colostroterapia Orofaringea em Recém-Nascidos de Extremo Baixo Peso internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN).

Atenciosamente,


Charline Portugal
Diretora do Complexo Materno Infantil
Hospital Inácia Pinto
Feira de Santana - BA
CEP: 45.000-000

ANEXO I

Declaração de não colostroterapia HEC



Feira de Santana, 23 de abril de 2019

DECLARAÇÃO

Eu Drº Bruno Manoel Emídio de Assis, Diretor de Assistência à saúde do Hospital Estadual da Criança (HEC), sob gestão da Liga Álvaro Bahia contra mortalidade infantil, declaro que neste hospital não possui o protocolo instituído de administração de Colostroterapia Orofaringea em Recém-Nascidos de Extremo Baixo Peso.

Atenciosamente,

HOSPITAL ESTADUAL DA CRIANÇA
CNPJ. 15.170.723/0005-30
Av. Eduardo Froes da Mota, S/N
Dr. Bruno Manoel Emídio de Assis
Diretor de Assistência à Saúde
Liga Álvaro Bahia Contra a Mortalidade Infantil
Drº Bruno Manoel Emídio de Assis
Diretor de Assistência à Saúde – HEC/LABCM I

ANEXO J

Declaração de prescrição de uso de leite materno - HEC



Feira de Santana, 23 de abril de 2019

DECLARAÇÃO

Eu Drº Bruno Manoel Emídio de Assis, Diretor de Assistência à saúde do Hospital Estadual da Criança (HEC), sob gestão da Liga Álvaro Bahia contra mortalidade infantil, declaro que neste hospital embora exista um banco de leite humano (BLH), a prescrição de uso de leite materno pasteurizado para recém-nascidos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) é realizada mediante prescrição médica e/ou disponibilidade de estoque no BLH.

Atenciosamente,


HOSPITAL ESTADUAL DA CRIANÇA
CNPJ. 15.170.723/0005-30
Av. Eduardo Froes da Mota, S/N
Dr. Bruno Manoel Emídio de Assis
Diretor de Assistência à Saúde
Liga Álvaro Bahia - Hospital de Referência
Drº Bruno Manoel Emídio de Assis
Diretor de Assistência à Saúde – HEC/ABCMI

ANEXO K

Solicitação de exames HIPS

Feira de Santana, 01 de abril de 2019

DECLARAÇÃO

Eu, Charline Portugal, Diretora do Complexo Materno Infantil do Hospital Inácia Pinto (HIPS), declaro que neste hospital realiza-se a solicitação de exames de sangue de IgA e da Proteína C Reativa (PCR), pela equipe médica, como parte da avaliação clínica do recém-nascido na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Esses exames serão realizados no 1º e 7º dia de vida do prematuro de extremo baixo peso, conforme preconizado para realização do projeto **“ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”**

Atenciosamente,


Charline Portugal
Diretora do Complexo Materno Infantil
COREN - 56479

ANEXO L

Solicitação de exames HEC



Feira de Santana, 23 de abril de 2019

DECLARAÇÃO

Eu Dr^o Bruno Manoel Emídio de Assis, Diretor de Assistência à saúde do Hospital Estadual da Criança (HEC), sob gestão da Liga Álvaro Bahia contra mortalidade infantil, declaro que neste hospital realiza-se a solicitação de exames de sangue de IgA e da Proteína C Reativa (PCR), pela equipe médica, como parte da avaliação clínica do recém-nascido na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Esses exames serão realizados no 1º e 7º dia de vida do prematuro de extremo baixo peso, conforme preconizado para realização do projeto **“ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”**

Atenciosamente,


HOSPITAL ESTADUAL DA CRIANÇA
CNPJ. 15.170.723/0005-30
Av. Eduardo Froes da Mota, S/N
Dr. Bruno Manoel Emídio de Assis
Diretor de Assistência à Saúde
Liga Álvaro Bahia Contra a Mortalidade Infantil
Dr^o Bruno Manoel Emídio de Assis
Diretor de Assistência à Saúde – HEC/LABCM

ANEXO M

Feira de Santana, 01 de abril de 2019

Ilmo. Sr.

Priscila Soares

Coordenadora da Educação Permanente da Secretaria de Saúde

Prezada senhora, encaminho o projeto intitulado “ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO” realizado pelos discentes do Doutorado do Programa de Pós Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana (PPGSC/UEFS) e pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Extensão em Saúde (NUPES/UEFS), Jessica Santos Passos Costa, Camilla da Cruz Martins, Mara Viana Cardoso, Ellayne Souza Cerqueira, Michelle de Santana Xavier Ramos, sob minha coordenação, para a Vossa apreciação e requerimento de autorização para realização deste projeto de pesquisa nesta instituição.

Trata-se de um ensaio clínico não-randomizado que busca avaliar o impacto da Terapia Imunológica Colostral na colonização de espécies bacteriana intestinais de prematuros com muito baixo peso, atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A pesquisa será realizada através de aplicação de inquérito à mãe e acompanhamento do prematuro de muito baixo peso na Unidade Neonatal, depois de aceite do sujeito da pesquisa e respectiva assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Ressalto que o referido projeto atende à normas da Resolução 466/12, 580/18 e 510/16 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, nova Resoluções em substituição à 196/96, e está sendo encaminhado para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana. Portanto a coleta somente será iniciada mediante a autorização do mesmo.

Atenciosamente,



Profa. Dra^a Raquel Guimarães Benevides

Professora Adjunta da Universidade Estadual de Feira de Santana

ANEXO N



Feira de Santana, 08 de março de 2019.

À Profa. Dra. Raquel Guimarães Benevides

Coordenadora do projeto de pesquisa – Universidade Estadual de Feira de Santana

Eu, Dr^o Bruno Manoel Emídio de Assis, Diretor de assistência à saúde, do Hospital Estadual da Criança, sob gestão da Liga Álvaro Bahia contra mortalidade infantil, declaro que recebi o projeto de pesquisa "ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO" da Doutoranda Jessica Santos Passos Costa, sob a orientação da Profa. Dra. Graciete Oliveira Vieira.

Autorizo a execução da pesquisa nesta Instituição mediante a apresentação do documento de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. Ressalto que a versão do projeto aceito pelo Comitê de Ética deve ser enviada a essa diretoria para devido arquivamento.

Lembro que os pesquisadores devem se comprometer a seguir as normas e rotinas do Serviço e zelar pelo sigilo ético. A coleta, quando autorizada, deverá ser realizada a partir do contato do Núcleo de Educação com Coordenação do setor, para agendamento da coleta de dados. Caso necessário, a qualquer momento poderemos revogar esta autorização, se comprovada atividades que causem algum prejuízo a esta instituição ou que comprometa os princípios éticos. Ressalto que uma vez concluída a atividade da pesquisa deverá ser encaminhado ao Núcleo de Educação – HEC/LABCMi Gestão Hospitalar, uma cópia do relatório final com os resultados obtidos.

Atenciosamente,

HOSPITAL ESTADUAL DA CRIANÇA
Bruno Manoel Emídio de Assis
Diretor de Assistência Médica
CUM 23542
Dr^o Bruno Manoel Emídio de Assis
Diretor de Assistência à Saúde - HEC/LABCMi

Hospital Estadual da Criança
Av. Eduardo Fróes da Mata, nº 02 – Bairro: 35ª Batalhão de Infantaria
Feira de Santana – BA Cep: 44024-000
Tel (75) 3602-0464

ANEXO O

Feira de Santana, 08 de março de 2019

DECLARAÇÃO 01

Declaro, para fins de direito, que na condição de pesquisadora responsável pelo projeto **“ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM IMUNOTERAPIA COM COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”** não iniciarei a coleta de dados até a aprovação do mesmo pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana (CEP/UEFS) e comprometo-me a atender a Resolução 466/12, 580/18 e 510/16, em todas as fases desta pesquisa.



Doutoranda e Mestre em Saúde Coletiva pela Universidade de Estadual de Feira de Santana



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOUTORADO EM SAÚDE COLETIVA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (INTERVENÇÃO)
PARA MÃE - (Apêndice A)**

A Sra. está sendo convidada a participar de um estudo realizado pela doutoranda Jessica Santos Passos Costa e coordenado por Dr^a Graciete Oliveira Vieira, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com título: “ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PRÉ-TERMOS EM IMUNOTERAPIA DE COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”. Iremos relacionar o tipo de alimentação que o bebê recebe, o primeiro leite materno, a colostroterapia, que é uma prática realizada neste hospital, com o tipo de bactérias que moram no intestino do seu bebê, e que podem ser benéficas para desenvolver a saúde do seu filho. Seu bebê já está em uso dessa terapia por ter peso inferior a 1500 gramas e ter nascido prematuro com menos de 32 semanas. Os benefícios para os bebês que fazem uso dessa terapia envolvem a redução de doenças, a melhora da composição da flora intestinal, acelerar o crescimento e desenvolvimento, como também, reduzir tempo de internamento e diminuir o risco de morte, porém não podemos garantir que esses benefícios ocorram com seu filho. Esta pesquisa possui como objetivo avaliar a associação, por meio da análise metagenômica, entre a imunoterapia de colostro e o microbioma intestinal colonizado por espécies bacterianas em recém-nascidos pré-termos atendidos no Sistema Único de Saúde em Feira de Santana – BA. Caso a senhora não aceite participar da pesquisa, não haverá nenhum tipo de penalidade, assim o procedimento não será interrompido por esse motivo. Além disso, iremos colher uma amostra do cocô no primeiro e 7º dia de vida do seu filho, onde serão analisadas o tipo de bactérias encontrada e a possível relação com o seu colostro. Os resultados desse estudo poderão contribuir para a disseminação do conhecimento científico sobre a importância do incentivo ao aleitamento materno na colonização de bactérias intestinais que são benéficas à criança, incentivo a realização de colostroterapia em hospitais da cidade, tendo em vista que o mesmo proporciona benefícios globais à criança por meio do efeito protetor contra a imaturidade intestinal, podendo reduzir risco de infecção e outras doenças. Os riscos desse estudo são: constrangimento e/ou vergonha ao responder alguma questão ou sentir-se incomodado com o tempo utilizado ao responder, algum desconforto para a criança com a manipulação, como perda de calor e/ou agitação, os quais serão avaliados pela equipe médica do hospital, contaminação da amostra de cocô (caso a equipe não esteja treinada), assim como danificação dos prontuários e sigilo do participante. Para evitar que isso aconteça, toda equipe será receberá treinamento adequado. Caso ocorra a interrupção do tratamento com colostro, determinado pela equipe médica, serão excluídas da pesquisa, sem que haja nenhum tipo de prejuízo no atendimento ao seu filho. Se a senhora entendeu o que é esta pesquisa, o nosso objetivo e concorde em participar da mesma, te convidamos a assinar esse documento, e caso queira, consulte outras pessoas ou familiares e tire suas dúvidas com nossa equipe antes de tomar a decisão. Concordando em participar, a senhora responderá algumas perguntas em local reservado, mas pode se recusar a responder qualquer uma delas, ou desistir em qualquer fase da pesquisa sem penalidade ou prejuízo algum no cuidado hospitalar recebido por você e seu filho (a). Nosso grupo de pesquisa possui um Núcleo grupo chamado NUPES,

Ass. Pesq. Resp./Colab.: _____ Ass. Mãe: _____

Núcleo de Pesquisa e Extensão em Saúde, que fica localizado no prédio do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da UEFS, endereço: Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Feira de Santana-BA ou pelo telefone: (75) 3161-8096. Caso queira qualquer informação sobre questões éticas, entre em contato com o CEP-UEFS pelo telefone (75) 3161-8124 ou pelo e-mail: cep@uefs.br, o CEP-UEFS funciona de segunda a sexta de 13:30 às 17:30h. Todas as informações pessoais fornecidas e coletadas não serão divulgadas associadas ao seu nome, mas sim, como dados gerais de todos as participantes da pesquisa, garantindo confidencialidade, privacidade e anonimato. Não existem despesas previstas para a Sra., no entanto, se porventura houver, será ressarcida; além disso, garantimos indenização em caso de danos, bem como receberá assistência integral imediata, pelo tempo que for necessário. A cópia deste termo e os questionários desta pesquisa serão guardados em nosso Núcleo de pesquisa (NUPES), sob minha responsabilidade, por até 5 anos e após este período serão destruídos. Informamos que os resultados desta pesquisa serão divulgados para toda sociedade e para o hospital que cedeu o local para pesquisa; e, para vocês, participantes, serão enviadas cartas respostas via correio.

1/2

Esta pesquisa está de acordo a Resolução 466/12, 510/16 e 580/18 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que trata dos aspectos éticos na pesquisa que envolve seres humanos. Foi aprovada pela Diretoria Médica desta Instituição e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS, sob protocolo n. XX. Caso sinta-se devidamente esclarecida e concorde em participar da pesquisa voluntariamente, por favor assine esse termo em duas vias, ficando com uma delas. Dessa maneira, solicitamos autorização para coletar informações do seu prontuário e também do bebê, que registra todo o acompanhamento da equipe clínica até o sétimo dia de vida da criança, assim como gostaríamos de autorização para publicação dos resultados em revistas científicas, congressos e outros meios. Além disso, vamos registrar seu endereço e telefone, já que existe a possibilidade de contatos futuros para novas pesquisas.

Feira de Santana, _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável

Assinatura

Pesquisador Colaborador

Assinatura

Nome da Mãe

Assinatura ou Digital



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOUTORADO EM SAÚDE COLETIVA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (INTERVENÇÃO) PARA O
RESPONSÁVEL LEGAL (Apêndice B)**

Estamos solicitando o seu consentimento para que a menor e o recém-nascido sob sua tutela possam participar de um estudo realizado pela doutoranda Jessica Santos Passos Costa e coordenado por Dr^a Graciete Oliveira Vieira, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com título: “ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PRÉ-TERMOS EM IMUNOTERAPIA DE COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”. Iremos relacionar o tipo de alimentação que o bebê recebe, o primeiro leite materno, a colostroterapia, que é uma prática realizada neste hospital, com o tipo de bactérias que moram no intestino do bebê, e que podem ser benéficas para desenvolver a saúde da criança. O bebê já está em uso dessa terapia por ter peso inferior a 1500 gramas e ter nascido prematuro com menos de 32 semanas. Os benefícios para os bebês que fazem uso dessa terapia envolvem a redução de doenças, a melhora da composição da flora intestinal, acelerar o crescimento e desenvolvimento, como também, reduzir tempo de internamento e diminuir o risco de morte, porém não podemos garantir que esses benefícios ocorram com o bebê. Esta pesquisa possui como objetivo avaliar a associação, por meio da análise metagenômica, entre a imunoterapia de colostro e o microbioma intestinal colonizado por espécies bacterianas em recém-nascidos pré-termos atendidos no Sistema Único de Saúde em Feira de Santana – BA. Caso a senhora não dê o consentimento para a menor e o bebê participar da pesquisa, não haverá nenhum tipo de penalidade, assim o procedimento não será interrompido por esse motivo. Além disso, iremos colher uma amostra do cocô no primeiro e 7º dia de vida da criança, onde serão analisadas o tipo de bactérias encontrada e a possível relação com o colostro da mãe. Os resultados desse estudo poderão contribuir para a disseminação do conhecimento científico sobre a importância do incentivo ao aleitamento materno na colonização de bactérias intestinais que são benéficas à criança, incentivo a realização de colostroterapia em hospitais da cidade, tendo em vista que o mesmo proporciona benefícios globais à criança por meio do efeito protetor contra a imaturidade intestinal, podendo reduzir risco de infecção e outras doenças. Os riscos desse estudo são: constrangimento e/ou vergonha ao responder alguma questão ou sentir-se incomodado com o tempo utilizado ao responder, algum desconforto para a criança com a manipulação, como perda de calor e/ou agitação, os quais serão avaliados pela equipe médica do hospital, contaminação da amostra de cocô (caso a equipe não esteja treinada), assim como danificação dos prontuários e sigilo do participante. Para evitar que isso aconteça, toda equipe será receberá treinamento adequado. Caso ocorra a interrupção do tratamento com colostro, determinado pela equipe médica, serão excluídas da pesquisa, sem que haja nenhum tipo de prejuízo no atendimento ao seu filho. Se a senhor (a) entendeu o que é esta pesquisa, o nosso objetivo e concorde em participar da mesma, te convidamos a assinar esse documento, e caso queira, consulte outras pessoas ou familiares e tire suas dúvidas com nossa equipe antes de tomar a

Ass. Pesq. Resp./Colab.: _____ Ass. Responsável legal: _____

decisão. Concordando as duas em participar, a menor responderá algumas perguntas em local reservado, mas pode se recusar a responder qualquer uma delas, ou desistir em qualquer fase da pesquisa sem penalidade ou prejuízo algum no cuidado hospitalar recebido. Nosso grupo de pesquisa

possui um Núcleo grupo chamado NUPES, Núcleo de Pesquisa e Extensão em Saúde, que fica localizado no prédio do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da UEFS, endereço: Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Feira de Santana-BA ou pelo telefone: (75) 3161-8096. Caso queira qualquer informação sobre questões éticas, entre em contato com o CEP-UEFS pelo telefone (75) 3161-8124 ou pelo e-mail: cep@uefs.br, o CEP-UEFS funciona de segunda à sexta de 13:30 às 17:30h. Todas as informações pessoais fornecidas e coletadas não serão divulgadas associadas ao seu nome ou da menor, mas sim, como dados gerais de todos as participantes da pesquisa, garantindo confidencialidade, privacidade e anonimato. Não existem despesas previstas para a Sra (o), no entanto, se porventura houver, será ressarcida (o); além disso, garantimos indenização em caso de danos, bem como receberá assistência integral imediata, pelo tempo que for necessário. A cópia deste termo e os questionários desta pesquisa serão guardados em nosso Núcleo de pesquisa (NUPES), sob minha responsabilidade, por até 5 anos e após este período serão destruídos. Informamos que os resultados desta pesquisa serão divulgados para toda sociedade e para o hospital que cedeu o local para pesquisa; e, para vocês, participantes, serão enviadas cartas respostas via correio.

Esta pesquisa está de acordo a Resolução 466/12, 510/16 e 580/18 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que trata dos aspectos éticos na pesquisa que envolve seres humanos. Foi aprovada pela Diretoria Médica desta Instituição e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS, sob protocolo n. XX. Caso sinta-se devidamente esclarecida e concorde em participar da pesquisa voluntariamente, por favor assine esse termo em duas vias, ficando com uma delas. Dessa maneira, solicitamos autorização para coletar informações do seu prontuário e também do bebê, que registra todo o acompanhamento da equipe clínica até o sétimo dia de vida da criança, assim como gostaríamos de autorização para publicação dos resultados em revistas científicas, congressos e outros meios. Além disso, vamos registrar seu endereço e telefone, já que existe a possibilidade de contatos futuros para novas pesquisas.

Feira de Santana, _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável

Assinatura

Pesquisador Colaborador

Assinatura

Nome Responsável legal

Assinatura ou Digital



**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (INTERVENÇÃO) PARA MÃE
ADOLESCENTE (Apêndice C)**

Você está sendo convidada a participar de um estudo realizado pela doutoranda Jessica Santos Passos Costa e coordenado por Dr^a Graciete Oliveira Vieira, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com título: “ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PRÉ-TERMOS EM IMUNOTERAPIA DE COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”. Iremos relacionar o tipo de alimentação que o bebê recebe, o primeiro leite materno, colostroterapia, que é uma prática realizada neste hospital, com o tipo de bactérias que moram no intestino do bebê, e que podem ser benéficas para desenvolver a saúde da criança. O seu bebê já está em uso dessa terapia por ter peso inferior a 1500 gramas e ter nascido prematuro com menos de 32 semanas. Os benefícios para os bebês que fazem uso dessa terapia envolvem a redução de doenças, a melhora da composição da flora intestinal, acelerar o crescimento e desenvolvimento, como também, reduzir tempo de internamento e diminuir o risco de morte, porém não podemos garantir que esses benefícios ocorram com o seu bebê. Esta pesquisa possui como objetivo avaliar a associação, por meio da análise metagenômica, entre a imunoterapia de colostro e o microbioma intestinal colonizado por espécies bacterianas em recém-nascidos pré-termos atendidos no Sistema Único de Saúde em Feira de Santana – BA. Caso você não queria participar da pesquisa, não haverá nenhum tipo de penalidade, assim o procedimento não será interrompido por esse motivo. Além disso, iremos colher uma amostra do cocô no primeiro e 7º dia de vida do seu filho, onde serão analisadas o tipo de bactérias encontrada e a possível relação com o seu colostro. Os resultados desse estudo poderão contribuir para a disseminação do conhecimento científico sobre a importância do incentivo ao aleitamento materno na colonização de bactérias intestinais que são benéficas à criança, incentivo a realização de colostroterapia em hospitais da cidade, tendo em vista que o mesmo proporciona benefícios globais à criança por meio do efeito protetor contra a imaturidade intestinal, podendo reduzir risco de infecção e outras doenças. Os riscos desse estudo são: constrangimento e/ou vergonha ao responder alguma questão ou sentir-se incomodado com o tempo utilizado ao responder, algum desconforto para a criança com a manipulação, como perda de calor e/ou agitação, os quais serão avaliados pela equipe médica do hospital, contaminação da amostra de cocô (caso a equipe não esteja treinada), assim como danificação dos prontuários e sigilo do participante. Para evitar que isso aconteça, toda equipe será receberá treinamento adequado. Caso ocorra a interrupção do tratamento com colostro, determinado pela equipe médica, serão excluídas da pesquisa, sem que haja nenhum tipo de prejuízo no atendimento ao seu filho. Se você entendeu o que é esta pesquisa, o nosso objetivo e concorde em participar da mesma, te convidamos a assinar esse documento, e caso queira, consulte outras pessoas ou familiares e tire suas dúvidas com nossa equipe antes de tomar a decisão, além da sua assinatura, será necessário a autorização

Ass. Pesq. Resp./Colab.: _____ Ass. Mãe: _____

do seu responsável legal. Concordando em participar, você responderá algumas perguntas em local reservado, mas pode se recusar a responder qualquer uma delas, ou desistir em qualquer fase da pesquisa sem penalidade ou prejuízo algum no cuidado hospitalar recebido. Nosso grupo de pesquisa possui um Núcleo grupo chamado NUPES, Núcleo de Pesquisa e Extensão em Saúde, que fica localizado no prédio do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da UEFS, endereço: Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Feira de Santana-BA ou pelo telefone: (75) 3161-8096. Caso queira qualquer informação sobre questões éticas, entre em contato com o CEP-UEFS pelo telefone (75) 3161-8124 ou pelo e-mail: cep@uefs.br, o CEP-UEFS funciona de segunda à sexta de 13:30 às 17:30h. Todas as informações pessoais fornecidas e coletadas não serão divulgadas associadas ao seu nome, mas sim, como dados gerais de todos as participantes da pesquisa, garantindo confidencialidade, privacidade e anonimato. Não existem despesas previstas, no entanto, se porventura houver, será ressarcida; além disso, garantimos indenização em caso de danos, bem como receberá assistência integral imediata, pelo tempo que for necessário. A cópia deste termo e os questionários desta pesquisa serão guardados em nosso Núcleo de pesquisa (NUPES), sob minha responsabilidade, por até 5 anos e após este período serão destruídos. Informamos que os resultados desta pesquisa serão divulgados para toda sociedade e para o hospital que cedeu o local para pesquisa; e, para vocês, participantes, serão enviadas cartas respostas via correio.

Esta pesquisa está de acordo a Resolução 466/12, 510/16 e 580/18 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que trata dos aspectos éticos na pesquisa que envolve seres humanos. Foi aprovada pela Diretoria Médica desta Instituição e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS, sob protocolo n. XX. Caso sinta-se devidamente esclarecida e concorde em participar da pesquisa voluntariamente, por favor assine esse termo em duas vias, ficando com uma delas. Dessa maneira, solicitamos autorização para coletar informações do seu prontuário e também do bebê, que registra todo o acompanhamento da equipe clínica até o sétimo dia de vida da criança, assim como gostaríamos de autorização para publicação dos resultados em revistas científicas, congressos e outros meios. Além disso, vamos registrar seu endereço e telefone, já que existe a possibilidade de contatos futuros para novas pesquisas.

Feira de Santana, _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável

Assinatura

Pesquisador Colaborador

Assinatura

Nome da Mãe

Assinatura ou Digital



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOUTORADO EM SAÚDE COLETIVA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTROLE) PARA MÃE -
(Apêndice D)**

A Sra. está sendo convidada para participar de um estudo realizado pela doutoranda Jessica Santos Passos Costa e coordenado por Dr^a Graciete Oliveira Vieira, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com título: “ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PRÉ-TERMOS EM IMUNOTERAPIA DE COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”. Iremos relacionar o tipo de alimentação que o bebê recebe, fórmula infantil, com o tipo de bactérias que moram no intestino dele que podem ser benéficas para desenvolver a saúde da criança. O seu filho foi selecionado pois está internado na Unidade de Terapia Intensiva desse Hospital, nasceu com até 32 semanas gestacionais, peso igual ou menor a 1500 gramas e está se alimentando por fórmula infantil prescrita pela equipe médica. Esta pesquisa possui como objetivo avaliar a associação, por meio da análise metagenômica, entre a imunoterapia de colostro e o microbioma intestinal colonizado por espécies bacterianas em recém-nascidos prematuros atendidos no Sistema Único de Saúde em Feira de Santana – BA. Caso a senhora não aceite participar da pesquisa, não haverá nenhum tipo de penalidade, além disso, iremos colher uma amostra do cocô no primeiro e 7º dia de vida do seu filho, onde serão analisadas o tipo de bactérias encontrada e a possível relação com a alimentação com a fórmula infantil. Este estudo visa reforçar a importância que o leite materno possui para o crescimento, desenvolvimento, como também, diminuição dos riscos de infecções intestinais e morte de bebês pré-termos. Dessa maneira, bebês que não recebem o leite materno podem ter atraso no desenvolvimento e desenvolver doenças infecciosas com mais facilidade. Os resultados desse estudo poderão contribuir para a disseminação do conhecimento científico sobre a importância do incentivo ao aleitamento materno na colonização de bactérias intestinais que são benéficas à criança, incentivo a realização de colostroterapia em hospitais da cidade, tendo em vista que o mesmo proporciona benefícios globais à criança por meio do efeito protetor contra a imaturidade intestinal, podendo reduzir risco de infecção e outras doenças. Os riscos desse estudo são: constrangimento e/ou vergonha ao responder alguma questão ou sentir-se incomodado com o tempo utilizado ao responder, algum desconforto para a criança com a manipulação, como perda de calor e/ou agitação, os quais serão avaliados pela equipe médica do hospital, contaminação da amostra de cocô (caso a equipe não esteja treinada), assim como danificação dos prontuários e sigilo do participante. Para evitar que isso aconteça, toda equipe será receberá treinamento adequado. Se isso ocorrer, a senhora pode desistir da participação e não responder. Se a senhora entendeu o que é esta pesquisa, o nosso objetivo e concorde em participar da mesma, te convidamos a assinar esse documento, e caso queira, consulte outras pessoas ou familiares e tire suas dúvidas com nossa equipe antes de tomar a decisão. Concordando em participar, a senhora responderá algumas perguntas em local reservado, mas pode se recusar a responder qualquer uma delas, ou desistir em qualquer fase da pesquisa sem penalidade ou prejuízo algum no cuidado hospitalar recebido por você e seu filho (a). Nosso grupo de pesquisa possui um Núcleo grupo chamado NUPES- Núcleo de Pesquisa e Extensão

Ass. Pesq. Resp./Colab.: _____ Ass. Mãe.: _____

em Saúde, que fica localizado no prédio do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana, endereço: Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Feira de Santana-BA ou pelo telefone: (75) 3161-8096. Caso queira qualquer informação sobre questões éticas, entre em contato com o CEP-UEFS pelo telefone (75) 3161-8124 ou pelo e-mail: cep@uefs.br, o CEP-UEFS funciona de segunda à sexta de 13:30 às 17:30h. Todas as informações pessoais fornecidas e coletadas não serão divulgadas associadas ao seu nome, mas sim, como dados gerais de todos as participantes da pesquisa, garantindo confidencialidade, privacidade e anonimato. Não existem despesas previstas para a Sra., no entanto, se porventura houver, será ressarcida; além disso, garantimos indenização em caso de danos, bem como receberá assistência integral imediata, pelo tempo que for necessário. A cópia deste termo e os questionários desta pesquisa serão guardados em nosso Núcleo de pesquisa (NUPES), sob minha responsabilidade, por até 5 anos e após este período serão destruídos. Informamos que os resultados desta pesquisa serão divulgados para toda sociedade e para o hospital que cedeu o local para pesquisa; e, para vocês, participantes, serão enviadas cartas respostas via correio.

Esta pesquisa está de acordo a Resolução 466/12, 510/16 e 580/18 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que trata dos aspectos éticos na pesquisa que envolve seres humanos. Foi aprovada pela Diretoria Médica desta Instituição e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS, sob protocolo n. XX. Caso sinta-se devidamente esclarecida e concorde em participar da pesquisa voluntariamente, por favor assine esse termo em duas vias, ficando com uma delas. Dessa maneira, solicitamos autorização para coletar informações do seu prontuário e também do bebê, que registra todo o acompanhamento da equipe clínica até o sétimo dia de vida da criança, assim como gostaríamos de autorização para publicação dos resultados em revistas científicas, congressos e outros meios. Além disso, vamos registrar seu endereço e telefone, já que existe a possibilidade de contatos futuros para novas pesquisas.

Feira de Santana, _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável

Assinatura

Pesquisador Colaborador

Assinatura

Nome da Mãe

Assinatura ou Digital



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOUTORADO EM SAÚDE COLETIVA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTROLE) PARA O
RESPONSÁVEL LEGAL (Apêndice E)**

Estamos solicitando o seu consentimento para que a menor e o recém-nascido sob sua tutela possam participar de um estudo realizado pela doutoranda Jessica Santos Passos Costa e coordenado por Dr^a Graciete Oliveira Vieira, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com título: “ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PRÉ-TERMOS EM IMUNOTERAPIA DE COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”. Iremos relacionar o tipo de alimentação que o bebê recebe, fórmula infantil, com o tipo de bactérias que moram no intestino. O bebê foi selecionado pois está internado na Unidade de Terapia Intensiva desse Hospital, nasceu com até 32 semanas gestacionais, peso igual ou menor a 1500 gramas e está se alimentando por fórmula infantil prescrita pela equipe médica. Esta pesquisa possui como objetivo avaliar a associação, por meio da análise metagenômica, entre a imunoterapia de colostro e o microbioma intestinal colonizado por espécies bacterianas em recém-nascidos prematuros atendidos no Sistema Único de Saúde em Feira de Santana – BA. Caso a senhora não dê o consentimento para a menor e o bebê participar da pesquisa, não haverá nenhum tipo de penalidade, além disso, iremos colher uma amostra do cocô no primeiro e 7º dia de vida do bebê, onde serão analisadas o tipo de bactérias encontrada e a possível relação com a alimentação com a fórmula infantil. Este estudo visa reforçar a importância que o leite materno possui para o crescimento, desenvolvimento, como também, diminuição dos riscos de infecções intestinais e morte de bebês pré-terms. Dessa maneira, bebês que não recebem o leite materno podem ter atraso no desenvolvimento e desenvolver doenças infecciosas com mais facilidade. Os resultados desse estudo poderão contribuir para a disseminação do conhecimento científico sobre a importância do incentivo ao aleitamento materno na colonização de bactérias intestinais que são benéficas à criança, incentivo a realização de colostroterapia em hospitais da cidade, tendo em vista que o mesmo proporciona benefícios globais ao bebê por meio do efeito protetor contra a imaturidade intestinal, podendo reduzir risco de infecção e outras doenças. Os riscos desse estudo são: constrangimento e/ou vergonha ao responder alguma questão ou sentir-se incomodado com o tempo utilizado ao responder, algum desconforto para a criança com a manipulação, como perda de calor e/ou agitação, os quais serão avaliados pela equipe médica do hospital, contaminação da amostra de cocô (caso a equipe não esteja treinada), assim como danificação dos prontuários e sigilo do participante. Para evitar que isso aconteça, toda equipe será receberá treinamento adequado. Se isso ocorrer, a senhora pode desistir da participação e não responder. Se a senhora (o) entendeu o que é esta pesquisa, o nosso objetivo e concorde em participar da mesma, te convidamos a assinar esse documento, e caso queira, consulte outras pessoas ou familiares e tire suas dúvidas com nossa equipe antes de tomar a decisão. Concordando em participar, a menor sob sua responsabilidade responderá algumas perguntas em local reservado, mas pode se recusar a responder qualquer uma delas, ou desistir em qualquer fase da pesquisa sem penalidade ou prejuízo algum no cuidado hospitalar recebido.

Ass. Pesq. Resp./Colab.: _____ Ass. Responsável legal.: _____

Nosso grupo de pesquisa possui um Núcleo grupo chamado NUPES- Núcleo de Pesquisa e Extensão em Saúde, que fica localizado no prédio do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana, endereço: Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Feira de Santana-BA ou pelo telefone: (75) 3161-8096. Caso queira qualquer informação sobre questões éticas, entre em contato com o CEP-UEFS pelo telefone (75) 3161-8124 ou pelo e-mail: cep@uefs.br, o CEP-UEFS funciona de segunda à sexta de 13:30 às 17:30h. Todas as informações pessoais fornecidas e coletadas não serão divulgadas associadas ao seu nome, mas sim, como dados gerais de todos as participantes da pesquisa, garantindo confidencialidade, privacidade e anonimato. Não existem despesas previstas para a Sra., no entanto, se porventura houver, será ressarcida; além disso, garantimos indenização em caso de danos, bem como receberá assistência integral imediata, pelo tempo que for necessário. A cópia deste termo e os questionários desta pesquisa serão guardados em nosso Núcleo de pesquisa (NUPES), sob minha responsabilidade, por até 5 anos e após este período serão destruídos. Informamos que os resultados desta pesquisa serão divulgados para toda sociedade e para o hospital que cedeu o local para pesquisa; e, para vocês, participantes, serão enviadas cartas respostas via correio.

Esta pesquisa está de acordo a Resolução 466/12, 510/16 e 580/18 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que trata dos aspectos éticos na pesquisa que envolve seres humanos. Foi aprovada pela Diretoria Médica desta Instituição e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS, sob protocolo n. XX. Caso sinta-se devidamente esclarecida e concorde em participar da pesquisa voluntariamente, por favor assine esse termo em duas vias, ficando com uma delas. Dessa maneira, solicitamos autorização para coletar informações do seu prontuário e também do bebê, que registra todo o acompanhamento da equipe clínica até o sétimo dia de vida da criança, assim como gostaríamos de autorização para publicação dos resultados em revistas científicas, congressos e outros meios. Além disso, vamos registrar seu endereço e telefone, já que existe a possibilidade de contatos futuros para novas pesquisas.

Feira de Santana, _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável

Assinatura

Pesquisador Colaborador

Assinatura

Nome Responsável legal

Assinatura ou Digital



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOUTORADO EM SAÚDE COLETIVA**

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTROLE) PARA MÃE
ADOLESCENTE (Apêndice F)**

Você está sendo convidada para participar de um estudo realizado pela doutoranda Jessica Santos Passos Costa e coordenado por Dr^a Graciete Oliveira Vieira, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com título: “ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PRÉ-TERMOS EM IMUNOTERAPIA DE COLOSTRO ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO”. Iremos relacionar o tipo de alimentação que o bebê recebe, fórmula infantil, com o tipo de bactérias que moram no intestino. O seu bebê foi selecionado pois está internado na Unidade de Terapia Intensiva desse Hospital, nasceu com até 32 semanas gestacionais, peso igual ou menor a 1500 gramas e está se alimentando por fórmula infantil prescrita pela equipe médica. Esta pesquisa possui como objetivo avaliar a associação, por meio da análise metagenômica, entre a imunoterapia de colostro e o microbioma intestinal colonizado por espécies bacterianas em recém-nascidos pré-termos atendidos no Sistema Único de Saúde em Feira de Santana – BA. Caso você não queira participar da pesquisa, não haverá nenhum tipo de penalidade, além disso, iremos colher uma amostra do cocô no primeiro e 7º dia de vida do bebê, onde serão analisadas o tipo de bactérias encontrada e a possível relação com a alimentação com a fórmula infantil. Este estudo visa reforçar a importância que o leite materno possui para o crescimento, desenvolvimento, como também, diminuição dos riscos de infecções intestinais e morte de bebês pré-termos. Dessa maneira, bebês que não recebem o leite materno podem ter atraso no desenvolvimento e desenvolver doenças infecciosas com mais facilidade. Os resultados desse estudo poderão contribuir para a disseminação do conhecimento científico sobre a importância do incentivo ao aleitamento materno na colonização de bactérias intestinais que são benéficas à criança, incentivo a realização de colostroterapia em hospitais da cidade, tendo em vista que o mesmo proporciona benefícios globais ao bebê por meio do efeito protetor contra a imaturidade intestinal, podendo reduzir risco de infecção e outras doenças. Os riscos desse estudo são: constrangimento e/ou vergonha ao responder alguma questão ou sentir-se incomodado com o tempo utilizado ao responder, algum desconforto para a criança com a manipulação, como perda de calor e/ou agitação, os quais serão avaliados pela equipe médica do hospital, contaminação da amostra de cocô (caso a equipe não esteja treinada), assim como danificação dos prontuários e sigilo do participante. Para evitar que isso aconteça, toda equipe será receberá treinamento adequado. Se isso ocorrer, você pode desistir da participação e não responder. Se entendeu o que é esta pesquisa, o nosso objetivo e concorde em participar da mesma, te convidamos a assinar esse documento, e caso queira, consulte outras pessoas ou familiares e tire suas dúvidas com nossa equipe antes de tomar a decisão, além da sua assinatura, será necessário a autorização do seu responsável legal. Concordando em participar, responderá algumas perguntas em local reservado, mas pode se recusar a responder qualquer uma delas, ou desistir em qualquer fase da pesquisa sem penalidade ou prejuízo algum no cuidado hospitalar recebido. Nosso grupo de pesquisa possui um Núcleo grupo chamado NUPES- Núcleo de

Ass. Pesq. Resp./Colab.: _____ Ass. Mãe.: _____

Pesquisa e Extensão em Saúde, que fica localizado no prédio do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana, endereço: Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Feira de Santana-BA ou pelo telefone: (75) 3161-8096. Caso queira qualquer informação sobre questões éticas, entre em contato com o CEP-UEFS pelo telefone (75) 3161-8124 ou pelo e-mail: cep@uefs.br, o CEP-UEFS funciona de segunda à sexta de 13:30 às 17:30h. Todas as informações pessoais fornecidas e coletadas não serão divulgadas associadas ao seu nome, mas sim, como dados gerais de todos as participantes da pesquisa, garantindo confidencialidade, privacidade e anonimato. Não existem despesas previstas, no entanto, se porventura houver, será ressarcida; além disso, garantimos indenização em caso de danos, bem como receberá assistência integral imediata, pelo tempo que for necessário. A cópia deste termo e os questionários desta pesquisa serão guardados em nosso Núcleo de pesquisa (NUPES), sob minha responsabilidade, por até 5 anos e após este período serão destruídos. Informamos que os resultados desta pesquisa serão divulgados para toda sociedade e para o hospital que cedeu o local para pesquisa; e, para vocês, participantes, serão enviadas cartas respostas via correio.

Esta pesquisa está de acordo a Resolução 466/12, 510/16 e 580/18 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que trata dos aspectos éticos na pesquisa que envolve seres humanos. Foi aprovada pela Diretoria Médica desta Instituição e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS, sob protocolo n. XX. Caso sinta-se devidamente esclarecida e concorde em participar da pesquisa voluntariamente, por favor assine esse termo em duas vias, ficando com uma delas. Dessa maneira, solicitamos autorização para coletar informações do seu prontuário e também do bebê, que registra todo o acompanhamento da equipe clínica até o sétimo dia de vida da criança, assim como gostaríamos de autorização para publicação dos resultados em revistas científicas, congressos e outros meios. Além disso, vamos registrar seu endereço e telefone, já que existe a possibilidade de contatos futuros para novas pesquisas.

Feira de Santana, _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável

Assinatura

Pesquisador Colaborador

Assinatura

Nome da Mãe

Assinatura ou Digital



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOUTORADO EM SAÚDE COLETIVA

QUESTIONÁRIO – PRIMEIRA PARTE (Apêndice G)

Bloco I - Dados sócio/econômicos/geográficos		
1. N° do prontuário:		
2. Setor:	3. Leito:	4. Data do Parto: ____/____/____
5. Nome da mãe:		6. RG:
7. Data de Nasc: ____/____/____	8. Idade: _____ anos	9. Contato: (999) AIP
10. Endereço: (999) AIP		11. Bairro: (999) AIP
12. Complemento: (999) AIP		13. Cidade: (999) AIP
14. Local de Residência: (0) urbana (1) rural (999) AIP		
15. Cor (autorreferida): (0) amarelo (1) branco (2) preto (3) pardo (4) indígena (999) AIP		
16. Situação conjugal: (0) casado (1) união estável (2) separado judicialmente/divorciado (3) solteiro (4) viúvo (999) AIP		
17. Escolaridade materna: (0) pós-graduação (1) superior completo (2) superior incompleto (3) ensino médio completo (4) ensino médio incompleto (5) ensino fundamental II (5ª a 8ª série) (6) ensino fundamental I (1ª a 4ª série) (7) apenas alfabetizado (8) sem escolaridade (999) AIP		18. Anos de estudo: (999) AIP (888) NSA
20. Trabalho materno/Ocupação habitual (DNV): (0) trabalho remunerado com vínculo (Empregada doméstica) (1) trabalho remunerado sem vínculo / Autônoma / Diarista (2) aposentada (3) desempregada (4) trabalho não remunerado (Dona do lar/Estudante) (5) não soube informar (999) AIP		19. Série: (999) AIP (888) NSA
21. Renda: _____ reais (999) AIP (888) NSA		22. Renda em salários mínimos (0) renda ≥ 2 salários mínimos (1) entre 1 e 2 salários mínimos (2) renda = 1 salário mínimo (3) renda < 1 salário mínimo (999) AIP (888) NSA

Bloco II – Dados de atenção ao pré-natal, parto e aleitamento materno		
23. Idade gestacional: semanas (999) AIP	24. Número de gestações: gestações (999) AIP	
25. Paridade: (0) múltipara (+3 gest) (1) secundípara (2) primípara (3) nulípara (999) AIP		
26. Número de Aborto(s): (999) AIP (888) NSA	27. Número de consultas de pré-natal: consultas (999) AIP	
28. Tipo de gravidez: (0) única (1) dupla (2) tripla ou mais (999) AIP	29. Apresentação do parto: (0) cefálica (1) pélvica ou podálica (2) transversa (999) AIP (888) NSA	30. Indução do parto: (0) sim (1) não (999) AIP (888) NSA
31. Tipo de parto: (0) Normal ou PSNV (1) Cesáreo ou PSAC (2) Fórceps (999) AIP	32. Cesárea ocorreu antes do trabalho de parto iniciar? (0) sim (1) não (999) AIP (888) NSA	33. Assistência ao nascer: (0) médico (1) enfermeira (2) parteira (3) outros (4) médico + enfermeira (999) AIP
34. Ingesta de cafeína na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
35. Ingestão de bebida alcoólica na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
36. Fumou na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
37. Registro em prontuário do uso de drogas na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
38. Uso de antibiótico pela mãe na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
39. Uso de corticoide pela mãe na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
40. Uso de anti-hipertensivo pela mãe na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
41. Uso de insulina/hipoglicemiante oral pela mãe na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
42. Uso de outros medicamentos pela mãe na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
43. Qual: NSA		(888)
44. Apresentou intercorrências no parto: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
45. Qual(is): NSA		(888)
46. Apresentou hipertensão durante a gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim
47. Apresentou diabetes durante a gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim

48. Mãe com infecção na gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim	
49. Apresentou outra patologia durante a gestação: (999) AIP		(0) Não (1) Sim	
50. Qual: NSA		(888)	
51. Apresentou manchas vermelhas na pele (exantema) anteriormente? (suspeita de zika, dengue ou chikungunya) (999) AIP		(0) Não (1) Sim (2) Não lembra	
52. Se SIM, foi: (0) antes da gestação (1) depois da gestação		(999) AIP	(888) NSA
53. Se SIM, apresentou febre: (0) Não (1) Sim	54. Se SIM, apresentou manchas vermelhas: (0) Não (1) Sim	55. Se SIM, apresentou prurido: (0) Não (1) Sim	56. Se SIM, apresentou dor nos olhos: (0) Não (1) Sim
(999)AIP (888)NSA	(999)AIP (888)NSA	(999)AIP (888)NSA	(999)AIP (888)NSA
57. Se SIM, apresentou dor nas juntas: (0) Não (1) Sim	58. Se SIM, apresentou dor no corpo: (0) Não (1) Sim	59. Se SIM, apresentou gânglios alterados: (0) Não (1) Sim	60. Se SIM, apresentou outros sintomas: (0) Não (1) Sim
(999)AIP (888)NSA	(999)AIP (888)NSA	(999)AIP (888)NSA	(999)AIP (888)NSA
61. Se OUTROS, descreva quais: _____		999) AIP (888) NSA	
62. Mãe com febre no periparto: (999) AIP		(0) Não (1) Sim	
63. Mãe com infecção urinária no periparto: (999) AIP		(0) Não (1) Sim	
64. Corioamnionite: (999) AIP		(0) Não (1) Sim	
65. Infecção por <i>Streptococos</i> tipo B vaginal: (999) AIP		(0) Não (1) Sim	
		(888) NSA (para RN abaixo de 34 semanas)	
66. Presença de outras infecções no periparto: (999) AIP		(0) Não (1) Sim	
67. Se SIM, qual: (888) NSA		(999) AIP	
68. Tempo de ruptura de membrana: _____ horas com relação ao parto (888) NSA		(999) AIP	
69. Recebeu orientação sobre aleitamento materno no pré-natal? (999) AIP		(0) Não (1) Sim	
70. Vontade prévia de amamentar? (999) AIP		(0) Não (1) Sim	
71. Já amamentou outros filhos? (888) NSA		(0) Não (1) Sim (999) AIP	
Bloco III – Dados da criança ao nascer			
72. Data de Nascimento: ____/____/____		73. Hora de nascimento: _____ h	
		(999) AIP	

74. Peso ao nascer:	g	(999) AIP	75. Sexo: (0) feminino (1) masculino	(999)
			AIP	
76. Comprimento:		(999) AIP	77. Perímetro cefálico:	(999)
			AIP	
78. Perímetro torácico:		(999) AIP	79. Perímetro abdominal:	(999)
			AIP	
80. Escore de Apgar 1': _____		(999) AIP	81. Escore de Apgar 5': _____	(999)
			AIP	



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOUTORADO EM SAÚDE COLETIVA

FORMULÁRIO – SEGUNDA PARTE (Apêndice H)

135. Setor: (0) UTI (1) UCI (2) CO (3) Canguru	136. Leito:	137. N° do Prontuário do RN:	138. Nome da mãe:	
139. Data: / /	140. Dias de vida:		141. IG:	142. IGC:
SINAIS VITAIS				
Temperatura	143. mínima: _____ °C (999) AIP (888)NSA		144. máxima: _____ °C (999) AIP (888)NSA	
Frequência Respiratória	145. mínima: _____ irpm (999) AIP (888)NSA		146. máxima: _____ irpm (999) AIP (888)NSA	
Frequência Cardíaca	147. mínima: _____ bpm (999) AIP (888)NSA		148. máxima: _____ bpm (999) AIP (888)NSA	
Pressão arterial (sistólica)	149. mínima: _____ bpm (999) AIP (888)NSA		150. máxima: _____ bpm (999) AIP (888)NSA	
Pressão arterial (diastólica)	151. mínima: _____ bpm (999) AIP (888)NSA		152. máxima: _____ bpm (999) AIP (888)NSA	
Pressão venosa central (PVC)	153. mínima: _____ (999) AIP (888)NSA		154. máxima: _____ (999) AIP (888)NSA	
Pressão arterial média (PAM)	155. mínima: _____ (999) AIP (888)NSA		156. máxima: _____ (999) AIP (888)NSA	
Hemoglicoteste (HGT)	157. mínima: _____ (999) AIP (888)NSA		158. máxima: _____ (999) AIP (888)NSA	
Saturação (SPO₂)	159. mínima: _____ (999) AIP (888)NSA		160. máxima: _____ (999) AIP (888)NSA	
OXIGENOTERAPIA				
161. Em ventilação espontânea (ar ambiente)? (0) Sim (1) Não (999) AIP				

162. Tipo de oxigenoterapia: (0) HOOD ou Halo (VNI) (1) CPAP ou BIPAP (VNI) (2) Ventilação mecânica (IMV) (3) Cateter de O ₂ (999) AIP (888) NSA						
163. Se cateter de O₂, qual a vazão: _____ L/min (999) AIP (888) NSA						
Parâmetros da ventilação mecânica (12 h)						
164. PEEP: _____ (999) AIP (888) NSA	165. PI: _____ (999) AIP (888) NSA	166. I.E.: _____ (999) AIP (888) NSA	REL: _____ (999) AIP (888) NSA	167. FIO₂: _____ (999) AIP (888) NSA	168. FAP: _____ (999) AIP (888) NSA	169. Tins: _____ (999) AIP (888) NSA
Parâmetros da ventilação mecânica (24 h)						
170. PEEP: _____ (999) AIP (888) NSA	171. PI: _____ (999) AIP (888) NSA	172. I.E.: _____ (999) AIP (888) NSA	REL: _____ (999) AIP (888) NSA	173. FIO₂: _____ (999) AIP (888) NSA	174. FAP: _____ (999) AIP (888) NSA	175. Tins: _____ (999) AIP (888) NSA
ADMINISTRADOS						
176. Via Oral (VO): (0) sim (1) não		177. Se VO, qual o volume nas últimas 24 horas: _____ mL (999) AIP (888) NSA				
178. Via Endovenosa (EV): (0) sim (1) não		179. Se EV, qual o volume nas últimas 24 horas: _____ mL (999) AIP (888) NSA				
180. Via Sonda Orogástrica (SOG): (0) sim (1) não		181. Se SOG, qual o volume nas últimas 24 horas: _____ mL (999) AIP (888) NSA				
182. Nut. Parenteral Total (NPT): (0) sim (1) não		183. Se NPT, qual o volume nas últimas 24 horas: _____ mL (999) AIP (888) NSA				
184. Colostroterapia (COL): (0) sim (1) não		185. Se COL, qual o volume nas últimas 24 horas: _____ mL (999) AIP (888) NSA				
186. Se COL, usou dose 1? (0) Sim (1) Não (999) AIP (888) NSA	187. Se COL, usou dose 2? (0) Sim (1) Não (999) AIP (888) NSA	188. Se COL, usou dose 3? (0) Sim (1) Não (999) AIP (888) NSA	189. Se COL, usou dose 4? (0) Sim (1) Não (999) AIP (888) NSA			
190. Se COL, usou dose 5? (0) Sim (1) Não (999) AIP (888) NSA	191. Se COL, usou dose 6? (0) Sim (1) Não (999) AIP (888) NSA	192. Se COL, usou dose 7? (0) Sim (1) Não (999) AIP (888) NSA	193. Se COL, usou dose 8? (0) Sim (1) Não (999) AIP (888) NSA			
194. Hemoderivados (HEMO): (0) sim (1) não		195. Se HEMO, qual o volume nas últimas 24 horas: _____ mL (999) AIP (888) NSA				
196. Se HEMO, tipo: (0) Conc. Hemácias (1) Conc. Plaquetas (2) Plasma Fresco (3) Sangue Total (999) AIP (888) NSA						
ELIMINADOS						
197. Diurese (DIUR): (0) sim (1) não (999) AIP		198. Se DIUR, qual volume nas últimas 24 hs: _____ mL (999) AIP (888) NSA				
199. Fezes (FEZ): (0) sim (1) não (999) AIP		200. Se FEZ, qual a frequência: _____ x/dia (999) AIP (888) NSA				
		201. Se FEZ, qual o aspecto: _____ (999) AIP (888) NSA				

202. Uso de sonda aberta? (0) sim (1) não (999) AIP	
203. Resíduo gástrico (RG)? (0) sim (1) não (999) AIP	204. Se RG, qual o volume: _____ mL (999) AIP (888) NSA
205. Se RG, qual o aspecto: (0) claro (1) leitoso (2) verde claro (3) verde escuro (4) tinto de sangue (5) hemorrágico (999) AIP (888) NSA	
206. Aspirado (ASP)? (0) sim (1) não (999) AIP	207. Se ASP, qual o volume: _____ mL (999) AIP (888) NSA
208. Se ASP, qual o aspecto: (0) mucoso (1) purulento (2) mucopurulento (3) sanguinolento (4) sanguepurulento (999) AIP (888) NSA	
209. Regurgitação (REG): (0) sim (1) não (999) AIP	210. Se REG, qual o aspecto: _____ (999) AIP (888) NSA
211. Se REG, qual o número de regurgitações ao dia _____ x/dia (999) AIP (888) NSA	
TRATAMENTOS	
212. Uso de antibiótico (ATB) pela criança?	(0) sim (1) não (999) AIP
213. Se ATB, qual? cefepime, vancomicina, meropenem, amicacina, ampicilina, gentamicina, fluconazol, ceftazidina, metronidazol, penicilina, ciprofloxacino, _____ (999) AIP (888) NSA	
214. Uso de surfactante (SURF) pela criança?	(0) sim (1) não (999) AIP
215. Se SURF, qual? curosurf, _____ (999) AIP (888) NSA	
216. Uso de corticoide inalatório (CORT IN)?	(0) sim (1) não (999) AIP
217. Se CORT IN, qual? clenil, flixotide, busonid, _____ (999) AIP (888) NSA	
218. Uso de corticosteróide pela criança (CORT EST)?	(0) sim (1) não (999) AIP
219. Se CORT EST, qual? dexametasona, prednisolona, hidrocortisona, _____ (999) AIP (888) NSA	
220. Uso de diurético pela criança (DIURT)?	(0) sim (1) não (999) AIP
221. Se DIURT, qual? furosemida, hidroclorotiazida, espirolactona, _____ (999) AIP (888) NSA	
222. Uso de vasoativos (VAS) pela criança?	(0) sim (1) não (999) AIP
223. Se VAS, qual? adrenalina, atropina, dopamina, dobutamina, noradrenalina, _____ (999) AIP (888) NSA	
224. Uso de sedativo pela criança (SED)?	(0) sim (1) não (999) AIP

225. Se SED, qual? fentanil, midazolan, _____ (999) AIP (888) NSA	
226. Uso de anticonvulsivante pela criança (ANTICONV)?	(0) sim (1) não (999) AIP
227. Se ANTICONV, qual? fenobarbital, hidantal, _____ (999) AIP (888) NSA	
228. Uso de suplemento (SUP) de vitaminas e/ou minerais?	(0) sim (1) não (999) AIP
229. Se SUP, qual? protovit, sulfato ferroso, cálcio, magnésio, vitamina K, _____ (999) AIP (888) NSA	
230. Outros medicamentos? cafeína, aminofilina, _____ (999) AIP (888) NSA	
231. Uso de fototerapia?	(0) sim (1) não (999) AIP
232. Acompanhado por fonoaudiólogo?	(0) sim (1) não (999) AIP
233. Acompanhado por fisioterapeuta?	(0) sim (1) não (999) AIP
DISPOSITIVOS	
234. Uso de cateter umbilical? (0) sim (1) não (999) AIP	235. Uso de cateter vesical? (0) sim (1) não (999) AIP
236. Uso de acesso venoso central (jugular ou subclávia)? (0) sim (1) não (999) AIP	237. Uso de drenos? (0) sim (1) não (999) AIP
238. Uso de acesso periférico? (0) sim (1) não (999) AIP	239. Uso de venóclise? (0) sim (1) não (999) AIP
240. Uso de PIC? (0) sim (1) não (999) AIP	241. Uso de sonda? (0) sim (1) não (999) AIP
242. Fez dissecação hoje? (0) sim (1) não (999) AIP	243. Uso cateter hidrolisado? (0) sim (1) não (999) AIP
DADOS CLÍNICOS	
244. Presença de sucção? (0) sim (1) não (999) AIP	245. Presença de deglutição? (0) sim (1) não (999) AIP
246. Distensão abdominal? (0) sim (1) não (999) AIP	247. Desconforto respiratório? (0) sim (1) não (999) AIP
248. Presença de estridor? (0) sim (1) não (999) AIP	249. Presença de gemido? (0) sim (1) não (999) AIP
250. Presença de cianose? (0) sim (1) não (999) AIP	251. Presença de tiragem? (0) sim (1) não (999) AIP
252. Icterícia? (0) sim (1) não (999) AIP	253. Hemorragia? (0) sim (1) não (999) AIP
254. Se hemorragia, qual tipo? _____ (999) AIP (888) NSA	

255. Se hemorragia intracraniana, qual o GRAU: () 1 () 2 () 3 () 4 (999) AIP (888) NSA			
256. Suspeitas diagnósticas novas:			
DADOS NUTRICIONAIS			
257. Tipo de dieta: (0) jejum (1) leite materno exclusivo (2) fórmula padrão (3) fórmula enriquecida (4) leite mat. + fórmula			
258. Se fórmula, tipo? _____ (999) AIP (888) NSA		259. Se fórmula, quantidade: _____ (999) AIP (888) NSA	
260. Via de dieta: (0) Seio (1) VO (2) SOG/SNG (3) Seio + Copinho (4) Seio + SOG (999) AIP (888) NSA			
261. Volume prescrito da dieta: _____ ml (999) AIP (888) NSA	262. Tempo de dieta? _____ / _____ h (999) AIP (888) NSA	263. Vazão: _____ mL/h (999) AIP (888) NSA	264. Gavagem: (0) Sim (1) Não (999) AIP (888) NSA
265. Se dieta, Σ Volume/dia: _____ ml (999) AIP (888) NSA		266. Dieta suspensa: (0) sim (1) não (888) NSA	
DADOS ANTROPOMÉTRICOS			
267. Perímetro cefálico: _____ cm (999) AIP		268. Escore: _____ (999) AIP	
269. Perímetro torácico: _____ cm (999) AIP		270. Escore: _____ (999) AIP	
271. Comprimento: _____ cm (999) AIP		272. Escore: _____ (999) AIP	
273. Peso: _____ g (999) AIP		274. Escore: _____ (999) AIP	
HEMOGASOMETRIA			
275. pH: _____ (999) AIP	276. pCO ₂ : _____ (999) AIP	277. pO ₂ : _____ (999) AIP	
278. cHCO ₃ ⁻ : _____ (999) AIP	279. sO ₂ : _____ (999) AIP	280. cCa ²⁺ : _____ (999) AIP	
281. cK ⁺ : _____ (999) AIP	282. cNa ⁺ : _____ (999) AIP	283. cCl ⁻ : _____ (999) AIP	
EXAMES BIOQUÍMICOS			
284. Tipo sanguíneo: _____ (999) AIP	315. Fósforo (mg/dl) _____ (999) AIP		
285. Fator Rh: _____ (999) AIP	316. Albumina (mg/dl) _____ (999) AIP		
286. Hemáceas/Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³) _____ (999) AIP	317. Globulina (mg/dl) _____ (999) AIP		
287. Hemoglobina (g/dl) _____ (999) AIP	318. Proteínas totais (mg/dl) _____ (999) AIP		
288. Hematócrito (%) _____ (999) AIP	319. Uréia (mg/dl) _____ (999) AIP		
289. VCM (µm ³) _____ (999) AIP	320. Creatinina (mg/dl) _____ (999) AIP		
290. HCM (pg) _____ (999) AIP	321. TGO (UI/ml) _____ (999) AIP		

291. CHCM (g/dl)	(999) AIP	322. TGP (UI/ml)	(999) AIP
292. RDW (%)	(999) AIP	323. Fosfatase Alcalina (UI/L)	(999) AIP
293. Leucócitos (10 ³ /mm ³)	(999) AIP	324. Gamaglutaminatransferase (U/L)	(999) AIP
294. Bastonetes (%)	(999) AIP	325. VDRL	(999) AIP
295. Segmentados (%)	(999) AIP	326. PCR (mg/dl)	(999) AIP
296. Linfócitos Atípicos (%)	(999) AIP	327. Lactoferrina	(999) AIP
297. Eosinófilos (%)	(999) AIP	328. Bilirrubina total (mg/dl)	(999) AIP
298. Neutrófilos (%)	(999) AIP	329. Bilirrubina direta (mg/dl)	(999) AIP
299. Linfócitos (%)	(999) AIP	330. Bilirrubina indireta (mg/dl)	(999) AIP
300. Monócitos (%)	(999) AIP	331. Hemocultura	(999) AIP
301. Basófilo (%)	(999) AIP	332. Cultura de Ponta de Catéter	(999) AIP
302. Eritroblastos (%)	(999) AIP	333. Antibiograma	(999) AIP
303. Reticulócitos (%)	(999) AIP	334. Colesterol Total (mg/dl)	(999) AIP
304. Blastos (%)	(999) AIP	335. HDL (mg/dL)	(999) AIP
305. Mielócitos (%)	(999) AIP	336. LDL (mg/dL)	(999) AIP
306. Promielócitos (%)	(999) AIP	337. Triglicérides (mg/dl)	(999) AIP
307. Metamielócitos (%)	(999) AIP	338. Glicose	(999) AIP
308. Plaquetas (10 ³ /mm ³)	(999) AIP	339. Creatinofosfoquinase	(999) AIP
309. IgA (mg/ml)	(999) AIP	340. Imuno-hematologia	(999) AIP
310. Cálcio Ionizado (mg/dl)	(999) AIP	341. IGG Citomegalovírus	(999) AIP
311. Potássio (mmol/l)	(999) AIP	342. IGM Citomegalovírus	(999) AIP
312. Magnésio (mg/dl)	(999) AIP	343. IGG Toxoplasmose	(999) AIP
313. Sódio (mmol/l)	(999) AIP	344. IGM Toxoplasmose	(999) AIP
314. Cloro (mmol/L)	(999) AIP	345. Outros	(999) AIP

EXAMES DE IMAGEM

346. Raio X: (0) sim (1) não

347. _____
 Tipo? _____
 (888) NSA

348.

Resultado:

_____ (888) NSA

349. Ultrassom: (0) sim (1) não

350. _____
 Tipo? _____
 (888) NSA

351.

Resultado: _____

_____ (888) NSA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOUTORADO EM SAÚDE COLETIVA

PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS HIPS (Apêndice I)

UNIDADE DE ADMINISTRAÇÃO: Unidade Neonatal Colostroterapia (Terapia Imunológica Colostral)	Hospital Inácia Pinto
DEFINIÇÃO: É a administração do colostro cru da mãe diretamente na mucosa orofaríngea do RN, nos horários pré-definidos independentemente da administração de dieta.	OBJETIVOS: * Atuar como suplementação imunológica, principalmente para RNs de muito baixo peso (MBP). * Promover a colonização do tubo digestivo por bactérias comensais (benéficas ao neonato) * Redução de morbimortalidades que acometem o RN.
INDICAÇÕES: RNPT (≤ 32 semanas gestacionais) com peso de nascimento abaixo de 1.500g em dieta zero e clinicamente estável para iniciar o protocolo	CONTRA-INDICAÇÕES - Mãe: histórico materno de abuso de substâncias ou drogas, presença de desordem psicológica, uso de vacina de febre amarela, gestação múltipla a partir de trigêmeos e filhos de mães contraíndicadas para amamentar (retrovírus e citomegalovírus); - RN: a termo, uso de medicamento vasopressor $>10\text{mcg/Kg/min}$, neuropata, requerimento de intervenção cirúrgica imediata, síndromes e /ou malformações congênitas.
MATERIAL/EQUIPAMENTO NECESSÁRIO: - Luvas de procedimento - Gorro descartável - Máscara descartável - Óculos de proteção - Avental - Bomba elétrica	QUANDO REALIZAR - Iniciar a partir do nascimento até 24 horas de vida e permanecer até quinto dia, respeitando os critérios de elegibilidade do estudo. - Realizar o procedimento de 03 em 03 horas, conforme rotina de administração das dietas

<ul style="list-style-type: none"> - Copo plástico dosador com tampa contendo leite ordenhado pela mãe - Seringas de 1ml - Etiqueta adesiva -tubos de Falcon 	<p>(9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h, 03h, 06h), totalizando 8 doses por dia (55° doses).</p> <p>EXAMES LABORATORIAIS: Devem ser dosados e solicitados pelo médico ao 1º e 7º dia de vida da criança, os seguintes biomarcadores sanguíneos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Proteína C reativa - IgA - Linfócitos
--	--

AGENTE	DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE ADMINISTRAÇÃO DO COLOSTRO (PADRÃO DO HIPS)	JUSTIFICATIVA
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	1. Verificar se há contraindicação médica e o aprazamento de administração pela enfermagem.	1. Evitar a realização de procedimentos inadequados.
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	2. Higienizar as mãos e antebraços com água e sabão.	2. Prevenir infecções cruzadas
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	3. Utilização de equipamentos de proteção individual (EPI's): luvas descartáveis, máscara, óculos de proteção, gorro e avental.	3. Proteção para o funcionário devido a manipulação de fluidos e/ou secreção.
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	4. Conferir a identificação do RN (leito e nome) com a identificação da seringa antes da administração.	4. Garantir a segurança do paciente.
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	5. Conversar calmamente com o RN sobre o procedimento.	5. Diminuir os níveis de estresse e demonstra respeito para com ele.
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	6. Administrar no RN o primeiro 0,1 mL (02 gotas) de colostro direcionada para o tecido mucoso oral direito nos primeiros 5 segundos.	6. Permitir o contato e absorção do colostro pelas mucosas.

Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	7. Administrar no RN o segundo 0,1 mL (02 gotas) de colostro direcionada para o tecido mucoso oral esquerdo nos 5 segundos posteriores.	7. Permitir o contato e absorção do colostro pelas mucosas.
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	8. Monitorar o batimento cardíaco, temperatura, a frequência respiratória, a pressão sanguínea e a saturação do oxigênio de pulso; e, a terapia será imediatamente interrompida caso seja observado: sinais de agitação, episódio de dessaturação com saturação de oxigênio menor que 88% ou percepção de mudança dos sinais vitais.	8. Avaliar a estabilidade clínica e evitar complicações.
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	9. Verificar se o RN está organizado na incubadora.	9. Manutenção do conforto do RN.
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	10. Retirar as luvas e higienizar as mãos e antebraços com água e sabão e álcool 70%.	10. Prevenir infecções cruzadas.
Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	11. Registrar o procedimento realizado em prontuário.	11. Respaldar documentalmente a assistência de Enfermagem prestada ao paciente.
AGENTE	COLETA DE DADOS	JUSTIFICATIVA
Pesquisador da equipe do projeto	1. Abordar a mãe e solicitar a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ou assentimento para mães menores de 18 anos) 2. Aplicar questionário sobre informações socioeconômicas e gestacionais para a mãe.	1. garantir respaldo legal para aplicação do formulário 1. Obter informações progressas ao nascimento da criança, assim como hábitos de vida da mãe.
Pesquisador da equipe do projeto	3. Coleta das informações (pelo preenchimento do formulário) diariamente do prontuário do neonato na UTIN durante 7 dias.	3. Acompanhar a evolução clínica da criança
Pesquisador da equipe do projeto, Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	4. Troca de Fralda (Enfermeira ou Técnico de Enfermagem) fechamento e reserva do material. Coleta das fezes diretamente da fralda e armazenadas nos Tubos	4. Obtenção de amostra para análise do DNA metagenômico e identificação das espécies bacterianas.

	<p>de Falcon, em dois momentos diferentes (pesquisador da equipe do projeto):</p> <ul style="list-style-type: none"> * Mecônio na primeira evacuação do bebê (apenas na UTIN). * primeiro cocô ao 7º dia de vida do RN (UTIN). <p>Os tubos serão etiquetados para identificação do paciente por meio de uma numeração).</p>	
Pesquisador da equipe do projeto	5. As amostras contidas nos Tubos de Falcon devem ser encaminhadas ao laboratório de Microbiologia da UEFS em até 24 horas em transporte próprio.	5. O procedimento garantirá a qualidade do DNA bacteriano das amostras.
Pesquisador da equipe do projeto	6. Preenchimento do formulário com as informações contidas nos exames laboratoriais, no 1º e ao 7º dia de vida do RN	6. avaliar a evolução clínica por meio de biomarcadores sanguíneos.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOCTORADO EM SAÚDE COLETIVA

PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS HEC (Apêndice J)

UNIDADE DE CONTROLE: Unidade Neonatal	Hospital Estadual da Criança
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: RNPT (≤ 32 semanas gestacionais) com peso de nascimento abaixo de 1.500g em dieta zero e/ou a administração enteral de fórmula infantil e clinicamente estável para iniciar o protocolo	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: - Mãe – histórico materno de uso de substâncias psicoativas, drogas, álcool, presença de desordem psicológica, gestação múltipla a partir de trigêmeos e filhos de mães contraindicadas para a amamentação (retrovíruses e citomegalovírus); - RN - uso de medicamento vasopressor $>10\text{mcg/Kg/min}$, requerimento de intervenção cirúrgica imediata, síndromes e /ou malformações congênitas, morbidades neonatais como a incidência de persistência do canal arterial (PCA), sepse ou enterocolite necrosante (NEC).
OBJETIVO: -Verificar o tipo de proliferação/colonização bacteriana contidas nas fezes (no primeiro e ao quinto dia de vida) de RNPT em dieta zero e/ou alimentados com fórmula infantil, - Acompanhar a evolução clínica do RN por meio da coleta das informações dos prontuários	MATERIAIS NECESSÁRIOS: - Tubos de Falcon - Luvas de procedimento - Gorro descartável - Máscara descartável - Etiquetas adesivas de identificação
QUANDO REALIZAR A COLETA: Atendendo os critérios de inclusão e exclusão, imediatamente após o nascimento do RN (para a primeira coleta da amostra fecal), a coleta de informações no prontuário	EXAMES LABORATORIAIS: Devem ser dosados e solicitados pelo médico ao 1º e 7º dia de vida da criança, os seguintes biomarcadores sanguíneos: - Proteína C reativa - IgA

se dará após internamento na UTIN e permanecer coletando até quinto dia de vida.	- Linfócitos
--	--------------

AGENTE	COLETA DE DADOS	JUSTIFICATIVA
Pesquisador da equipe do projeto	1. Abordar a mãe e solicitar a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ou assentimento para mães menores de 18 anos) 2. Aplicar questionário sobre informações socioeconômicas e gestacionais para a mãe.	1. Garantir respaldo legal para aplicação do formulário 1. Obter informações pregressas ao nascimento da criança, assim como hábitos de vida da mãe.
Pesquisador da equipe do projeto	3. Coleta das informações (pelo preenchimento do formulário) diariamente do prontuário do neonato na UTIN durante 7 dias.	3. Acompanhar a evolução clínica da criança
Pesquisador da equipe do projeto, Enfermeira ou Técnico de Enfermagem	4. Troca de Fralda (Enfermeira ou Técnico de Enfermagem) fechamento e reserva do material. Coleta das fezes diretamente da fralda e armazenadas nos Tubos de Falcon, em dois momentos diferentes (pesquisador da equipe do projeto): * Mecônio na primeira evacuação do bebê (apenas na UTIN). * primeiro cocô ao 7º dia de vida do RN (UTIN). Os tubos serão etiquetados para identificação do paciente por meio de uma numeração.	4. Obtenção de amostra para análise do DNA metagenômico e identificação das espécies bacterianas.
Pesquisador da equipe do projeto	5. As amostras contidas nos Tubos de Falcon devem ser encaminhadas ao laboratório de Microbiologia da UEFS em até 24 horas em transporte próprio.	5. O procedimento garantirá a qualidade do DNA bacteriano das amostras.
Pesquisador da equipe do projeto	6. Preenchimento do formulário com as informações contidas nos exames laboratoriais, no 1º e ao 7º dia de vida do RN	6. avaliar a evolução clínica por meio de biomarcadores sanguíneos.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
DOUTORADO EM SAÚDE COLETIVA**

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (Apêndice K)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA - UEFS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PREMATUROS EM TRATAMENTO COM COLOSTROTERAPIA ATENDIDOS PELO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS): ESTUDO DE INTERVENÇÃO

Pesquisador: JESSICA SANTOS PASSOS COSTA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 16095219.0.0000.0053

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Feira de Santana

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.869.450

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de doutorado da pesquisadora responsável, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana, sob a orientação da Profa. Dra. Graciete Oliveira Vieira e coorientação do Profa. Dra. Raquel Guimarães Benevides.