



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

DENIS MASASHI SUGITA

**Avaliação citológica de material subamniótico para
diagnóstico de corioamnionite: Estudo de avaliação de teste
diagnóstico**

**Goiânia
2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Denis Masashi Sugita

Título do trabalho: Avaliação citológica de material subamniótico para diagnóstico de corioamnionite: Estudo de avaliação de teste diagnóstico.

3. Informações de acesso ao documento:

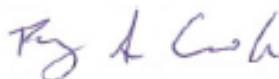
Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, toma-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 23 /12 /2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Versão atualizada em setembro de 2017.

² A assinatura deve ser escaneada.

DENIS MASASHI SUGITA

**Avaliação citológica de material subamniótico para
diagnóstico de corioamnionite: Estudo de avaliação de teste
diagnóstico**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Tropical e
Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título de Mestre em Medicina
Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Dr. Ruy de Souza Lino
Júnior.

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Masashi Sugita, Denis

Avaliação citológica de material subamniótico para diagnóstico de
corioamnionite: Estudo de avaliação de teste diagnóstico [manuscrito] /
Denis Masashi Sugita. - 2017.

51 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Souza Lino Júnior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Corioamnionite. 2. Citologia. 3. Patologia. 4. Estudo de teste
diagnóstico. I. Souza Lino Júnior, Ruy , orient. II. Título.

CDU 61



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DENIS MASASHI SUGITA – Aos vinte dias do mês de março do ano de 2017 (20/03/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. RUY DE SOUZA LINO JÚNIOR, MARA RÚBIA NUNES CELES e PAULO SÉRGIO SUCASAS DA COSTA, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO CITOLÓGICA DE MATERIAL SUBAMNIÓTICO PARA DIAGNÓSTICO DE CORIOAMNIONITE: ESTUDO DE AVALIAÇÃO DE TESTE DIAGNÓSTICO”**, em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **PATOLOGIA**, de autoria de **DENIS MASASHI SUGITA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. **RUY DE SOUZA LINO JÚNIOR**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1304/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes

Prof. Dr. Paulo Sérgio Sucasas da Costa

Aprovado / Reprovado

Aprovado

APROVADO

Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato HABILITADO, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PATOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 30 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, **KARINY VIEIRA SOARES E SILVA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes (IPTSP/UFG)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Sucasas da Costa (FM/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

[Assinatura]
[Assinatura]
[Assinatura]

Dedico este trabalho aos meus pais (Tatsushi Sugita e Tereza Yoshie Ikegami Sugita) e à minha irmã (Tatiana Haruka Sugita), portos seguros perante as dificuldades durante este percurso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e pelas forças dadas para nunca desistir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior, pela confiança, pelos conselhos e pela amizade, além da paciência e compreensão nos meus momentos de dificuldades pessoais.

Aos meus professores de Patologia Geral, que abriram portas e me deram oportunidades para dedicar à essa maravilhosa área do conhecimento.

Ao professor Luiz Murilo Martins Araújo, mestre, amigo e modelo, que me incentivou (e me inspirou) a seguir carreira docente.

À médica patologista do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG), Maria Helena Tavares Vilela, por ter guiado meus primeiros passos nesse campo de Patologia Feto-Placentária e ter me estimulado a estudar tão intrigante e instigante área.

Aos meus preceptores de residência médica, que criaram o patologista que hoje sou.

A todos os professores das disciplinas do Mestrado, que contribuíram para minha formação, com valiosos conhecimentos.

Aos funcionários técnicos do Laboratório de Patologia do HC-UFG (Kássia, Maria Aparecida, Mirian e Vitório), que, graças aos seus esforços, geraram todo o material a ser analisado neste trabalho.

À Isaias Prestes, Tatiana Haruka Sugita e Cristine Póvoa, pelos conhecimentos ensinados para avaliação estatística dos resultados.

À professora Jozelia Rego, mestra e amiga, pelos conselhos, aprendizados e oportunidades, que nunca conseguirão ser retribuídos.

Aos colegas professores da disciplina de Morfofuncional e à diretoria do curso de Medicina da UniEvangélica, pelo apoio e parceria, nos momentos de angústia e dificuldade.

Aos meus alunos, por sempre me incentivarem a ser uma pessoa e um profissional melhor.

Aos familiares e amigos (novos e antigos), que sempre me incentivaram e apoiaram nessa jornada.

SUMÁRIO

TABELAS.....	ix
FIGURAS	x
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Infecções no Período Gravídico-Puerperal.....	1
1.2. Fisiopatologia das Infecções de Membranas Amnióticas	2
1.3. Complicações Neonatais, com Ênfase em Sepsis Neonatal	5
1.4. Diagnóstico das Infecções de Membranas Amnióticas	8
1.4.1.Principais Patógenos.....	8
1.4.2.Diagnóstico Clínico	9
1.4.3.Exames Laboratoriais Séricos	10
1.4.4.Avaliação do líquido amniótico	10
1.4.5.Esfregaço Vaginal	12
1.4.6.Avaliação Histopatológica da Placenta	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1. Geral	16
3.2. Específicos.....	16
4 MÉTODOS	17
4.1. Desenho do Estudo	17
4.2. Amostragem e tamanho da amostra	17
4.3. Avaliação Citológica	18
4.4. Avaliação Macroscópica	18
4.5. Avaliação Histopatológica	19
4.6. Análise de Dados e Considerações Estatísticas	21
5 RESULTADOS	22
6 DISCUSSÃO.....	35
7 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

TABELAS

Tabela 01 – Distribuição dos casos por leucometria amniótica.....	24
Tabela 02 – Distribuição dos casos pela coloração de membranas amnióticas em relação à presença de corioamnionite histológica.....	24
Tabela 03 – Distribuição dos casos por padrão de inflamação placentária.....	28
Tabela 04 – Distribuição dos casos (leucometria amniótica x corioamnionite histológica) para cálculo dos índices de avaliação de teste diagnóstico e respectivos intervalos de confiança (95%).....	31
Tabela 05 – Regressão logística ordinária entre as categorias de leucometria amniótica e os estádios de corioamnionite histológica.....	32
Tabela 06 – Distribuição dos casos (leucometria amniótica x corioamnionite histológica) para cálculo dos índices de avaliação de teste diagnóstico e respectivos intervalos de confiança (95%), com alteração do cut-off para leucometria amniótica.....	33
Tabela 07 – Regressão logística ordinária entre as categorias de leucometria amniótica e o diagnóstico de placentite histológica.....	34

FIGURAS

Figura 01 – (Papanicolaou) Epitélio amniótico esfoliado.....	22
Figura 02 – (Papanicolaou) Esfregaço com fundo mucóide e leucometria negativa.....	23
Figura 03 – (Papanicolaou) Esfregaço com fundo mucóide e leucometria moderada.....	23
Figura 04 – (Papanicolaou) Esfregaço hemorrágico.....	25
Figura 05 – (Hematoxilina-Eosina) Hematoma subamniótico do esfregaço hemorrágico.....	25
Figura 06 – (Hematoxilina-Eosina) Corioamnionite estágio 1.....	26
Figura 07 – (Hematoxilina-Eosina) Corioamnionite estágio 2.....	27
Figura 08 – (Hematoxilina-Eosina) Funiculite estágio 1.....	27
Figura 09 – (Hematoxilina-Eosina) Funiculite estágio 2.....	28
Figura 10 – (Hematoxilina-Eosina) Vilosite ancorante.....	29
Figura 11 – (Hematoxilina-Eosina) Vilosite aguda.....	29
Figura 12 – (Hematoxilina-Eosina) Vilosite crônica ativa e intervilosite aguda.....	30
Figura 13 – Curva ROC para os níveis de leucometria amniótica.....	31

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ATBT	Antibioticoterapia
CA	Corioamnionite
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating fator</i>
HBCS	Células de Hofbauer
IG	Idade gestacional
IIA	Infecção intra-amniótica
IL	Interleucina
LA	Líquido amniótico
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
MA	Membranas amnióticas
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MMP	Metaloproteases de matriz
PCR	Proteína C reativa
PP	Parto prematuro
RN	Recém-nascido
RPMA	Rotura prematura de membranas amnióticas
RPPMA	Rotura prematura pré-termo de membranas amnióticas
SN	Sepse neonatal
SRIF	Síndrome de resposta inflamatória fetal

RESUMO

A corioamnionite é uma patologia placentária de etiologia infecciosa, associada com aumento significativo de morbi-mortalidade materno-fetal e diversos estudos têm discutido a importância do seu diagnóstico precoce. A abordagem diagnóstica mais utilizada é a análise do líquido amniótico, obtido por amniocentese (procedimento invasivo, não inserido na rotina pré-natal do Brasil) e o padrão-ouro para diagnóstico é o exame histopatológico da placenta, mas as fases analítica e pós-analítica deste exame podem levar um tempo suficiente para retardar o início da terapêutica. Objetiva-se, neste trabalho, a validação da avaliação citológica de material subamniótico, através de um estudo de avaliação de teste diagnóstico, comparando a avaliação citológica com respectivos resultados histopatológicos. 125 amostras (exclusão de 2 amostras) foram avaliadas cito e histopatologicamente, obtendo-se sensibilidade de 77,55%, especificidade de 60,53%, acurácia de 67,2% e valores preditivos de 55,88% (positivo) e 80,7% (negativo). A alteração do *cut-off* para positividade citológica resultou em valores semelhantes à literatura, contudo, a alta especificidade e o alto valor preditivo negativo demonstram baixa capacidade de previsão de corioamnionite histopatológica, sendo a avaliação citológica uma técnica melhor utilizada para o diagnóstico de ausência de corioamnionite.

Palavras-chave: Corioamnionite, Citologia, Patologia, Estudo de teste diagnóstico.

ABSTRACT

Chorioamnionitis is a placental disease of infectious etiology, associated with a significant increase of maternal and fetal morbidity and mortality. Several studies have discussed the importance of its early diagnosis. The most widely used diagnostic approach is the analysis of amniotic fluid, obtained by amniocentesis (an invasive procedure, not inserted in the Brazilian prenatal routine) and the gold standard for its diagnosis is the histopathology of the placenta, but analytical and post-analytical phases of this exam may take enough time to delay the onset of therapy. This work aims for the validation of cytological evaluation of subamniotic material, through a diagnostic test study, comparing the cytologic evaluation with respectively histopathologic results. 125 samples (2 samples excluded) were evaluated cytologically and histologically, yielding a sensitivity of 77.55%, specificity of 60.53%, accuracy of 67.2% and predictive values of 55.88% (positive) and 80.7% (negative). Changing the cut-off for cytological positivity resulted in values similar to literature, however, the high specificity and high negative predictive value demonstrate low capacity to foresight histopathological chorioamnionitis, with the cytologic evaluation being a technique best used for the diagnosis of absence of chorioamnionitis.

Keywords: Chorioamnionitis, Cytology, Pathology, Diagnostic test study.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Infecções no Período Gravídico-Puerperal

Infecções durante a gestação incluem um conjunto de patologias de etiologia infecciosa que afetam a placenta e o feto, levando a inúmeras complicações obstétricas (Al-Aldani; Sebire, 2007). Essas complicações estão associadas com aumento significativo da morbidade e da mortalidade maternas e fetais, além de aumentar consideravelmente os custos com cuidados de saúde (internações prolongadas, necessidade de internação em centros de terapia intensiva, métodos diagnósticos onerosos e uso de medicações de alto custo (Czikk et al, 2011).

Complicações maternas incluem risco aumentado para hemorragias pós-parto, atonia uterina e complicações raras como choque séptico, coagulopatias e síndrome da angústia respiratória do adulto; além de aumentar a incidência de partos cesáreos. Em situações de cesarianas, na presença de infecção intra-amniótica (IIA), há aumento do risco para transfusão sanguínea materna, tromboflebite séptica pélvica, formação de abscessos pélvicos e infecção de sítio cirúrgico (Czikk et al, 2011).

Complicações fetais e neonatais incluem risco para sepse neonatal (SN), pneumonia e desenvolvimento da síndrome de resposta inflamatória fetal (SRIF), com aumento na incidência de alterações neurológicas e respiratórias (Czikk et al, 2011).

As infecções no período gravídico-puerperal são, geralmente, subclínicas e o diagnóstico só é firmado mediante análise histopatológica da placenta ou do feto. Em alguns casos, sinais e sintomas maternos podem indicar um processo infeccioso no período obstétrico (Al-Aldani; Sebire, 2007). Febre materna persistente ($> 37,8^{\circ}\text{C}$), principalmente associada a taquicardia materna e/ou fetal, é sugestiva de infecção (Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2008). Outros achados clínicos incluem dor ou tensão abdominal e leucorreia anormal (Czikk et al, 2011). Embora o diagnóstico seja clínico na grande maioria dos casos, exames laboratoriais podem confirmar o diagnóstico em mulheres sintomáticas (Montuclard et al, 1996).

Há dois mecanismos de infecção no período gestacional, com achados histopatológicos distintos. Por um lado, infecção ascendente, geralmente de sítio genital, na grande maioria dos casos bacteriana, variando desde uma inflamação cório-decidual local, a franca corioamnionite (CA), com SN. Esta é uma das principais causas de aborto de segundo trimestre e parto prematuro (PP) severo / prematuridade extrema, além de estudos sugerirem que este mecanismo também pode ter efeitos potencialmente importantes na lesão cerebral neonatal, através da liberação de citocinas. Por outro lado, disseminação hematogênica de uma infecção sistêmica materna (bacteriana, viral ou parasitária), resultando em alterações no parênquima placentário e possível transmissão ao feto, com desenvolvimento de anomalias e complicações neonatais (Al-Adnani; Sebire, 2007).

1.2. Fisiopatologia das Infecções de Membranas Amnióticas

A literatura mostra que a IIA (inclusive com graus de severidade distintos) está associada a resultados perinatais adversos, independente da detecção microbiológica de patógenos (Lee et al, 2010; Combs et al, 2014), levando alguns autores a especular o desenvolvimento de uma síndrome de resposta inflamatória amniótica, que explicaria as adversidades secundárias à IIA. Contudo, o prognóstico de pacientes com uma cultura do líquido amniótico negativa é melhor do que o de pacientes com cultura positiva, mostrando que o estado microbiológico do líquido amniótico (LA) é um importante fator prognóstico no desenrolar da gravidez. (Romero et al, 1992). A simples colonização, sem processo inflamatório associado, é benigna (Combs et al, 2014).

Devido à natureza subclínica da IIA, o diagnóstico precoce depende de amniocentese, que é um método invasivo, não realizado como rotina clínica (Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2006; Holst et al, 2006). O risco de perda fetal, na amniocentese, é em torno de 1% (Broekhuizen et al, 1985; Amorim; Melo, 2009) a 2,1%, quando comparado à ausência de procedimentos (1,3%). (Alfirevic et al, 2003). A amniocentese deve ser realizada após a 16ª semana (Alfirevic et al, 2003), e sugere-se sua realização em casos de trabalho de PP e febre materna. (Mazor et al, 1992). Amniocentese para redução, em casos de polidrâmnio acentuado, diminuem o desconforto materno e o risco de trabalho de PP, mas sua realização seriada aumenta o risco de CA por *Candida* (Rode et al, 2000).

O modelo proposto de invasão microbiana da cavidade amniótica seria de uma invasão bacteriana intra-amniótica inicial, através de uma região discreta das membranas amnióticas, seguida de proliferação bacteriana intra-amniótica e invasão bacteriana das membranas amnióticas, demonstrando a importância do estudo do compartimento intra-amniótico (Kim et al, 2009). A invasão microbiana da cavidade amniótica ocorre mais frequentemente em pacientes com dilatação cervical, evento usual no segundo trimestre (Romero et al, 1992).

De maneira geral, 2% a 4% das gestações a termo nos Estados Unidos são complicadas por CA. Essa incidência aumenta para 40% a 70% em situações de PP (Czikk et al, 2011). É uma causa comum de aborto no segundo trimestre e o processo inflamatório parece antecipar o início do trabalho de parto, sendo um mecanismo primário na etiologia de tais perdas (Allanson et al, 2010). Em caso de rotura prematura de membranas amnióticas (RPMA) entre 34 e 36 semanas, o risco de CA é de 16%, se adotada conduta conservadora (Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2008).

A RPMA é definida como rotura espontânea das membranas amnióticas após a 20ª semana de gravidez e antes do início do trabalho de parto. Antes da 20ª semana, caracteriza quadro de abortamento inevitável. Quando acontece antes do termo (20 até 37 semanas), é classificada como rotura prematura pré-termo das membranas (RPPMA). O período decorrido entre a rotura das membranas e o parto é chamado de período de latência. Na gravidez a termo, a amniorrexe parece estar associada a um processo natural de amadurecimento, no qual a quantidade de colágeno do córion diminui progressivamente com o avançar da gravidez. Esse fenômeno ocorre tanto em gestações complicadas com RPMA, quanto naquelas em que a amniorrexe ocorre durante o trabalho de parto. A infecção é uma das principais causas de RPPMA, sendo que estudos mostram que 32% a 35% dos casos têm cultura de líquido amniótico positiva (Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2008).

As bactérias infectantes produzem enzimas (proteases, collagenases e elastases) que atuam sobre as membranas, levando ao enfraquecimento e à rotura das mesmas. Ocorre ainda uma diminuição das concentrações de fosfatidilinositol nas membranas, que tem papel lubrificante na interface entre o córion e o âmnio e sua diminuição leva a menor distensibilidade das membranas, favorecendo a rotura (Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2008). Mesmo não havendo recomendações específicas

referentes à frequência de exames intraparto, avaliação fetal em casos de RPMA deve ser feita frequentemente, inclusive em regime diário (Veille, 1988).

Invasão microbiana da cavidade amniótica é detectável em casos de PP, RPPMA e em pacientes com RPMA no termo ou amniorrexe espontânea durante o parto (DiGiulio et al, 2010a). Em casos de RPPMA, o impacto da invasão microbiana da cavidade amniótica não está suficientemente caracterizado, em parte por causa da dependência de métodos baseados em cultura (muitos casos com cultura negativa, tipicamente associados a patógenos do trato gastrointestinal) (DiGiulio et al, 2010b).

Ao diagnóstico de RPMA, preconiza-se direcionar a conduta (se intervencionista ou conservadora) baseado na idade gestacional (IG) e na presença de infecção materna (Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2008). Antibioticoterapia (ATBT) de amplo espectro é considerada rotina no manejo de casos de RPPMA, entretanto tal prática vem sendo avaliada (Jackson et al, 2012; Kiser et al, 2014). São evidências que suportam esse questionamento: 1. administração de ATBT de amplo espectro raramente erradica IIAs em pacientes com RPPMA; 2. IIA desenvolveu-se em um terço das pacientes sem inflamação prévia, independente da ATBT; 3. e um subgrupo de pacientes com IIA diagnosticada demonstrou diminuição na intensidade do processo inflamatório após início da ATBT (Gomez et al, 2007).

Bactérias são encontradas em membranas amnióticas de PPs ou a termo, sendo que uma maior quantidade e diversidade de espécies foram encontradas em casos de prematuros extremos. Em situações de parto por via vaginal, não é possível definir se uma maior quantidade de bactérias reflete infecção ou colonização das membranas amnióticas durante o parto. Em casos de PP, a identificação de bactérias está associada a CA histológica e a uma depressão imunológica materna pronunciada (Jones et al, 2009). Estudos sugerem que a CA histológica no termo é, na maioria das vezes, resultado de um processo inflamatório não-infeccioso (Roberts et al, 2012).

CA histológica apresenta como achado característico o amniotropismo de neutrófilos nas membranas amnióticas, sendo classificado em categorias, de acordo com o local onde se concentra o infiltrado neutrofílico (cordão umbilical e/ou membranas amnióticas – decídua, córion e espaço subamniótico) e a presença de alterações adicionais (como necrose) (Pankuch et al, 1989; Kim et al, 2015a).

A amnionite é a fase final da inflamação corioamniótica extra-placentária e seu achado confere maior gravidade ao processo inflamatório, quando comparada à corionite isolada. (Park et al, 2009a). Em casos de CA, demonstrou-se associação com apoptose das células do miométrio humano (Lirussi et al, 2008).

A fisiopatologia do trabalho de PP desencadeado por condições inflamatórias, como a CA, permanece em grande parte obscura. Embora a IIA é causalmente associada com trabalho de PP, alguns pacientes têm trabalho de PP, na ausência de infecção demonstrável (Romero et al, 2011). Quimiocinas pró-inflamatórias tem sido associadas a trabalho de PP (Esplin et al, 2005; Figueroa et al, 2005), sejam elas relacionadas com IIA (como a interleucina 8 (Cherouny et al, 1993) ou não (como a MCP-1 - monocyte chemotactic protein-1 - que pode desempenhar um papel no trabalho de PP, independentemente da presença de IIA (Esplin et al, 2005)). A inflamação pode ser desencadeada mesmo em situações não infecciosas (Romero et al, 2011).

No pólo anti-inflamatório, a interleucina-10 é uma citocina chave para a manutenção da gravidez, ao atuar no combate da inflamação associada com trabalho de PP. (Hanna et al, 2006). Inflamação / infecção intra-uterina é citada como uma contra-indicação para o uso de corticosteróides, entretanto, a literatura revela que o uso de corticosteróides não está associado com piora significativa em qualquer resultado neonatal, e foi associado com reduções significativas na síndrome do desconforto respiratório e na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Goldenberg et al, 2006).

Em relação aos macrófagos placentários presentes nas vilosidades, em toda a gestação (células de Hofbauer – HBCS), alterações quantitativas, genéticas e morfológicas dessas células tem sido descritas em diversas patologias placentárias, como vilosite de etiologia desconhecida e CA. As HBCS desempenham um papel chave na fisiopatologia placentária, entretanto, há poucas evidências e mais estudos são necessários para elucidar suas funções (Tang et al, 2011).

1.3. Complicações Neonatais, com Ênfase em Sepses Neonatais

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, há cerca de 5 milhões de mortes neonatais por ano, 98% ocorrendo em países em desenvolvimento, sendo infecção uma das principais causas de morte (Miura et al, 1999).

A infecção bacteriana constitui uma importante causa de morbi-mortalidade neonatal (Geisler et al, 1998). A incidência de SN varia de 7,1 a 38 por 1000 nascidos vivos na Ásia, 6,5 a 23 por 1000 nascidos vivos na África, e 3,5 a 8,9 por 1000 nascidos vivos na América do Sul e Caribe. Em comparação, as taxas relatadas nos Estados Unidos e Australásia variam entre 1,5 e 3,5 por 1000 para sepse de início precoce e até 6 por 1000 nascidos vivos, para sepse tardia, um total de 6 a 9 por 1000 para SN (Vergnano et al, 2005). A incidência da sepse é maior em recém-nascido (RN) de baixo peso, podendo chegar a aproximadamente 25%. Em países em desenvolvimento, a sepse é responsável por 30% a 40% dos óbitos neonatais (Meireles et al, 2011). Além disso, a taxa de mortalidade da SN varia com o tipo de patógeno (40% para gram-negativos, 28% para fungos), estado de imunocompetência do RN (humoral, fagocítico e celular) e complicações desenvolvidas (Miura et al, 1999).

O diagnóstico precoce e o início da ATBT, com apropriado manejo dos problemas metabólicos e respiratórios, reduzem, significativamente, sua morbi-mortalidade, contudo, o diagnóstico precoce e de certeza é difícil, principalmente nas situações de SN precoce (não há teste diagnóstico definitivo e os exames disponíveis possuem baixa sensibilidade) (Miura et al, 1999). Sepse em neonatos pode ser diagnosticada, sem perda de acurácia, com a coleta de hemocultura (volume sanguíneo $\geq 1,0$ mL) em um único sítio (Sarkar et al, 2006), sendo padrão-ouro, apesar da baixa sensibilidade (Miura et al, 1999).

A SN precoce ocorre nos primeiros seis dias de vida (geralmente nas primeiras 72 horas de vida (Ceccon, 2008; Chacko; Sohi, 2005) e está relacionada diretamente a fatores maternos gestacionais e periparto (toques vaginais frequentes, CA clínica ou histopatológica, rotura prematura e prolongada de membranas amnióticas, durante a passagem através do canal de parto infectado e no momento de reanimação), com comprometimento multissistêmico, e agente etiológico (quando identificável) prevalente no trato genital materno ou nos ambientes da maternidade e sala de parto (Miura et al, 1999; Chacko; Sohi, 2005; Dutta et al, 2010). A prematuridade, o baixo peso ao nascimento, a infecção materna e a rotura prolongada de membranas amnióticas são fatores de risco estatisticamente significativos para SN precoce (Goulart et al, 2006).

A SN tardia é relacionada à infecção hospitalar, ocorrendo após o sexto dia de vida (Miura et al, 1999). Fatores maternos não estão relacionados ao surgimento de SN

tardia. Dentre os fatores neonatais, os principais foram a prematuridade e o baixo peso. Com relação aos fatores nosocomiais, os procedimentos invasivos (cateterismo venoso central, intubação endotraqueal, ventilação mecânica e nutrição parenteral prolongada) estiveram associados à doença (Herrmann et al, 2008).

CA é um fator de risco para SN precoce, não havendo consenso entre os neonatologistas sobre a duração do tratamento de bebês nascidos de mães febris com hemocultura negativa, mas cujas placentas evidenciam CA histopatológica. Há uma associação significativa entre CA, níveis elevados de proteína C reativa (PCR) sérica materna e febre materna. CA associada a uma PCR elevada pode orientar a duração da ATBT em crianças nascidas de mães febris (Hoang et al, 2013). A IIA também está relacionada a restrição do crescimento fetal (Di Giulio et al, 2010a).

A ATBT deve se basear na idade do paciente quando do início da sepse, origem do RN (domiciliar ou hospitalar), história materna, colonização conhecida, situações epidêmicas, entre outros. O tempo de tratamento deve ser baseado em encontro de bactérias e sua localização (sangue, urina, líquido, secreção brônquica), evolução clínica e repetição do exame microbiológico. Uma vez identificado o patógeno, é possível uma ATBT mais precisa (Miura et al, 1999). O conhecimento dos organismos causadores prováveis e seus padrões de sensibilidade contribui para uma utilização mais racional e adequada de antibióticos, minimizando, assim, o surgimento de bactérias multirresistentes em unidades neonatais (Chacko; Sohi, 2005).

Em casos de natimortos, um estudo evidenciou positividade histológica e microbiológica em 8,4% dos casos, através de hemocultura fetal, análise de swab placentário e avaliação de funiculite (Monari et al, 2013).

Alguns estudos defendem o desenvolvimento de uma SRIF (desordem multissistêmica associada a PP iminente e resultado neonatal adverso), mais evidente em IIA com infecção diagnosticada. É definida pela concentração sérica de PCR em cordão umbilical e evidência histológica de funiculite (Lee et al, 2006; Lee et al, 2007; Park et al, 2009a; Lee et al, 2010). Oligoâmnio também é mais frequente nessas condições (Lee et al, 2010).

Com relação às complicações respiratórias, CA aumentou a incidência de colonização traqueal precoce, o que predispõe ao desenvolvimento de displasia

broncopulmonar (Young et al, 2005). Apesar de a SRIF ser um fator protetor para doenças pulmonares crônicas (devido à maturação pulmonar desencadeada pelo processo inflamatório), a SN está fortemente relacionada a doenças pulmonares crônicas, principalmente se relacionadas a infecções estafilocócicas coagulase-negativas e candidemias (Lahra et al, 2009).

CA também é fator de risco para danos neurológicos em RNs. A associação significativa de CA clínica ou histológica com paralisia cerebral sugere que as estratégias clínicas para prevenir ou reduzir CA levariam a uma redução na paralisia cerebral (Shatrov et al, 2010). Exposição intra-uterina à infecção materna foi associada a um aumento significativo no risco de paralisia cerebral em bebês prematuros ou com peso ao nascer inferior a 1.500g (Horvath et al, 2012).

Já avaliação da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nas primeiras horas do nascimento pode ser adotada como método não-invasivo de significado prognóstico e diagnóstico tardio imediato, pois significativa diminuição da resistência, vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo foram observados em todas as artérias cerebrais dos pacientes com SN (Basu et al, 2012).

1.4. Diagnóstico das Infecções de Membranas Amnióticas

1.4.1. Principais Patógenos

CA pode ser causada por um único patógeno ou ser polimicrobiana (65% das culturas de LAs positivas identificaram dois ou mais agentes (Flores-Herrera et al, 2012).

Streptococcus do grupo B e *Escherichia coli* foram os patógenos mais comuns isolados (Bhola et al, 2008), principalmente em casos de bacteremia materna ou neonatal complicando com IIA (Gibbs; Duff, 1991), não sendo detectada sinergia entre essas duas bactérias (Flores-Herrera et al, 2012). Mulheres com cultura vaginal e/ou retal pré-natal positiva para *Streptococcus* do grupo B são consideradas colonizadas (Chan et al, 2013) e fetos com infecção por esse patógeno parecem apresentar sinais de SN periparto. (Tudela et al, 2012). Alguns estudos advogam que o risco de SN precoce em um RN a termo de uma mãe com CA e triagem para *Streptococcus* do grupo B negativa é < 1% (Taylor; Opel, 2012). É possível detectar *E. coli* no LA através de *Escherichia coli* de referência

de agrupamento e fatores de virulência por reação em cadeia da polimerase (Daoud et al, 2008).

Outros patógenos isolados incluem *Ureaplasma urealyticum* (Romero et al, 1992; Hassan et al, 2006; Berger et al, 2009), e *U. parvum* (von Chamier et al, 2012) (relacionados à distúrbios gastrointestinais pós-natais (Wolfs et al. 2013)), *Gardnerella vaginalis*, *Fusobacterium* sp (Romero et al, 1992; Hitti et al, 2001) e *Mycoplasma hominis* (Gibbs; Duff, 1991; Czikk et al, 2011) (associados a respostas inflamatórias mais intensas (Oh et al, 2010a)).

IIA por *Candida* sp está associada com a RPMA, trabalho de PP, infecção neonatal grave e morte fetal (Romero et al, 1985; Chaim et al, 1993; Crawford et al, 2006). Diagnóstico e tratamento precoce são essenciais e são relatados casos relacionados a amniocenteses de repetição (Rode et al, 2000) e a dispositivo intra-uterino retido. (Chaim et al, 1993). Como a cultura pode levar dias, novos testes, tais como perfil proteômico pode levar a um diagnóstico mais rápido (Crawford et al, 2006).

Patógenos menos frequentes incluem casos de CA e/ou SN (precoce ou tardia) por *Staphylococcus aureus* (Geisler et al, 1998), *Listeria monocytogenes* (Mazor et al, 1992; Sarkar et al, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Muppala et al, 2007; Basu; Kumar, 2011), *Chlamydia trachomatis* (Czikk et al, 2011), *Neisseria gonorrhoeae* (Czikk et al, 2011), *Clostridium perfringens* (Vigliani, 2009), *Bacteroides ureolyticus* (Hitti et al, 2001), *Staphylococcus epidermidis* (Sarkar et al, 2006), *Klebsiella pneumoniae* (Sarkar et al, 2006), *Enterococcus fecalis* (Sarkar et al, 2006) e *Serratia marcescens* (Sarkar et al, 2006).

1.4.2. Diagnóstico Clínico

Dados clínicos maternos com alto valor preditivo para IIA incluem IG (Bhola et al, 2008; Jung et al, 2011; Park et al, 2012), tempo de rotura das membranas amnióticas (Bhola et al, 2008), febre materna (Bhola et al, 2008; Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2008), paridade (Park et al, 2012) e uso de antibiótico intraparto (Bhola et al, 2008).

O comprimento cervical avaliado por ultra-sonografia transvaginal é uma ferramenta clínica útil no manejo de pacientes em trabalho de PP, ao auxiliar na previsão

de IIA e SN, principalmente em casos de insuficiência cervical (Holst et al, 2006; Lee et al, 2008; Jung et al, 2011; Kim et al, 2012; Oncel et al, 2013). Um colo de útero curto (< 25 mm no segundo trimestre) é um preditor forte de PP espontâneo e 9% das pacientes apresentaram IIA subclínica (Hassan et al, 2006).

Sangramento vaginal pode ser a única manifestação clínica de IIA, ocorrendo em 14% dos pacientes com esse achado (Gomez et al, 2005). Apesar de quadros de placenta prévia serem protetores contra infecção ascendente intra-uterina, casos de CA foram relatados em pacientes com sangramento vaginal (Park et al, 2009b; Madan et al, 2010).

1.4.3. Exames Laboratoriais Séricos

A contagem sérica de leucócitos materna tem relevância tanto no diagnóstico (Allanson et al, 2010), quanto no manejo terapêutico (interrupção da ATBT) (Mikhael et al, 2014) de pacientes com CA. Contudo, a literatura sugere mais estudos para melhorar a sensibilidade do teste, especialmente em casos no início do segundo trimestre (Montuclard et al, 1996). A contagem de leucócitos em LA também auxilia nesse diagnóstico (Oh et al, 2010a), bem como a contagem de leucócitos em aspirado traqueal de RNs (Booth et al, 2009).

PCR sérica materna está aumentada em casos de IIA (Oh et al, 2010a; Oh et al, 2011) e de SN (Jeon et al, 2014). Já a PCR sérica de cordão umbilical é preditivo de SRIF (Lee et al, 2007).

1.4.4. Avaliação do líquido amniótico

O LA provém dos organismos materno e fetal, em proporções variáveis de acordo com a IG, composto por elementos em suspensão (células esfoliadas do âmnio, do feto e gotículas de gordura) e em dissolução (substâncias orgânicas e inorgânicas). Suas funções são: permitir crescimento externo simétrico e desenvolvimento muscular do embrião, impedir a aderência entre o embrião e o âmnio, controlar a temperatura corporal do embrião e proteger o embrião contra traumatismos sofridos pela mãe e infecções.

Uma dosagem de glicose < 14 mg/dL no LA parece estar associada a IIA (Odibo et al, 1999; Edwards et al, 2001; Ford; Genc, 2011; Aguin et al, 2012; Lisonkova et al, 2014).

Uma contagem de leucócitos no LA $> 50 / \text{mm}^3$ também correlaciona com IIA (Gomez et al, 2007; Aguin et al, 2012; Ryu et al, 2013), exceto quando estiver contaminado com 1.000 hemácias / mm^3 (Abdel-Razeq et al, 2010). A determinação da atividade de esterase leucocitária está associada a um aumento da probabilidade de endometrite pós-parto, mas não com CA clínica ou morbidade infecciosa neonatal. (Romero et al, 1988b; Coultrip; Grossman, 1992;). Níveis de G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) estão elevados em CA, sendo bastante confiável na sua previsão. (Hoskins et al, 1997).

Dosagens de interleucinas no LA podem ser um complemento útil na exclusão de IIA (Coultrip et al, 1994). A interleucina-6 no LA é um marcador sensível e específico quando $\geq 600 \text{ pg/mL}$ (Greig et al, 1993; Romero et al, 1993a, 1993b; Edwards et al, 2001; Kacerovsky et al, 2009; Oh et al, 2011; Aguin et al, 2012; Ryu et al, 2013). A interleucina 8 é mais sensível que a própria cultura de LA. (Cherouny et al, 1993). Dosagens de interleucina 12 não se correlacionaram com resultados de cultura ou incidência de trabalho de PP (Edwards et al, 2001).

A pesquisa de metaloproteases de matriz (MMP) também tem sido utilizada, dentre elas MMP-9 (Locksmith et al, 1999; Edwards et al, 2001; Oh et al, 2011) e MMP-8 (Lee et al, 2007; Kim et al, 2012), esta inclusive com um teste rápido disponível (Nien et al, 2006; Kim et al, 2007), considerando sua participação no processo de RPMA.

Valores de prostaglandina $\text{PGF2a} \geq 170 \text{ pg/mL}$ no LA estão associados a IIA, independentemente da cultura e a parto precoce em situações de RPMA (Lee et al, 2009). Além disso, observou-se alterações na expressão de receptores de prostaglandinas na placenta, levando a uma cascata de reações que estimulam o trabalho de parto (Unlugedik et al, 2010). Níveis elevados de nucleossomas no LA também estão associados a IIA. (Lu; Hsu, 1999).

Ácidos orgânicos de cadeia curta são subprodutos de metabolismo bacteriano, e a sua detecção por meio de cromatografia gás-líquido em LA tem sido proposta como um método rápido, sensível e específico para o diagnóstico de infecção, entretanto, com valor clínico limitado (Romero et al, 1988c). O ensaio de Limulus Amebocyte Lysate utilizado na detecção de endotoxinas de bactérias Gram-negativas apresenta resultados conflitantes na literatura (Romero et al, 1987; Coultrip; Grossman, 1992). Outro método utilizado é a detecção microbiológica através de reação em cadeia da polimerase de amplo espectro

em tempo real, associada a espectrometria de massas com ionização por eletrospray, para identificar e quantificar material genômico de bactérias e vírus (Romero et al, 2014).

Exames de maior especificidade e valor preditivo positivo, porém com baixa sensibilidade, são a bacterioscopia pela coloração de Gram (Broekhuizen et al, 1985; Romero et al, 1988a; Carroll et al, 1996) e a cultura de LA (Hoskins et al, 1997; Kirchner et al, 2007; Oh et al, 2010b), tanto para diagnóstico de CA, quanto para predição de SN.

A coleta de LA e swab de superfície placentária em partos cesáreos contribui pouco ou nada no manejo pós-parto (Zbinden et al, 2011).

Até o momento, poucos métodos diagnósticos utilizando biomarcadores inflamatórios têm demonstrado benefício clínico. Os futuros esforços devem concentrar-se na busca de biomarcadores precisos, que possam ser obtidos de forma não invasiva e permitam o diagnóstico de situações subclínicas para início de intervenções eficazes, com risco específico (Genc; Ford, 2010).

1.4.5. Esfregaço Vaginal

Vaginose bacteriana ou flora vaginal anormal (principalmente aneróbios) detectada em esfregaços pré-natais estão associados a IIA (Hitti et al, 2001), CA e PP (Mass et al, 1999), porém não são indicadores de morbidade neonatal (Kirchner et al, 2007) e alguns estudos constestam essa relação (Takei; Ruiz, 2006).

Concentrações elevadas de PCR (Shim et al, 2005), IL-6 e IL-8 (Hitti et al, 2001) no fluido vaginal foram detectadas em casos de IIA.

1.4.6. Avaliação Histopatológica da Placenta

O exame histológico da placenta pode fornecer informações valiosas, que auxiliam no diagnóstico e no tratamento materno e fetal. Culturas de material placentário podem também fornecer informações valiosas para terapêutica, entretanto, são pouco sensíveis. A técnica de swab placentário também é altamente específica, mas pouco sensível (Bhola et al, 2008).

CA histológica está estatisticamente associada a prematuridade, RPMA e SN precoce (Novak; Platt, 1985), contudo, apenas 3% dos casos de CA histológica resultou

em SN confirmada por hemocultura (Lee; Leung, 2012). Nenhuma alteração histopatológica placentária foi significativamente associada com neutropenia, único parâmetro avaliado que parecia ter valor prognóstico em um dos trabalhos (Novak; Platt, 1985). Funiculite está presente em 4% das gestações (Lee et al, 2006).

O diagnóstico de CA histológica em gestações a termo é uma condição inflamatória não-infecciosa, provavelmente relacionada ao contexto pró-inflamatório do próprio trabalho de parto (Roberts et al, 2012; Conti et al, 2015), demonstrando a necessidade de melhores métodos para diagnóstico de infecção da cavidade amniótica.

Os resultados histológicos e bacteriológicos foram concordantes em cerca de 70% das placentas examinadas, com 61,1% dos casos negativos e 7,4% placentas com resultados histológicos e microbiológicos positivos. Resultados discordantes foram observados em casos de CA leve ou inicial, ou em situações de infecção bacteriana incipiente, sem lesões microscópicas detectáveis. E a porcentagem de culturas positivas foi maior em casos de associação entre CA e funiculite. (Queiros da Mota et al, 2013). No entanto, outro estudo demonstrou uma precisão de apenas 58%, refletindo pouco o quadro IIA (Pettker et al, 2007).

A técnica de esfregaço subamniótico como exame de triagem para infecção intra-amniótica é uma maneira simples, rápida, não-invasiva e de baixo custo (Bruch et al, 1994), inclusive na investigação de causas infecciosas de óbito intra-útero (Bove, 1997; Knowles, 1991; Chaudry et al, 2008). Ela foi primeiramente descrita em 1953 (Blanc, 1953) e validada em 1983 (Nessmann-Emmanuelli, 1983). Contudo, poucos estudos na literatura trazem os reais benefícios dessa técnica, uma vez que a avaliação bioquímica e microbiológica de líquido amniótico colhido em pré-natal é a metodologia adotada em países desenvolvidos, na previsão de infecção intra-amniótica, o que não é uma realidade de países em desenvolvimento, a exemplo do Brasil.

A corioamnionite é um diagnóstico imperativo, considerando sua relação com prejuízos ao feto e ao recém-nascido (Ericson; Laughon, 2015; Xie et al, 2015); além do manejo complexo, tanto da mãe, quanto da criança (Shakib et al, 2015; Higgins et al, 2016); principalmente no que concerne ao uso de antibióticos (Bhola et al, 2008; Lee et al, 2015). Contudo, a literatura ressalta as dificuldades no diagnóstico dessa entidade (critérios clínicos maternos e fetais apenas em casos mais graves, diagnóstico através de métodos não aplicáveis rotineiramente na propedêutica obstétrica, dificuldade na

reprodutibilidade da cultura de materiais biológicos, fase pré-analítica longa do exame padrão-ouro) (Avila et al, 2015; Kim et al, 2015a, 2015b; Romero et al, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos têm discutido a importância do diagnóstico precoce de corioamnionite, especialmente para o manejo de sepse neonatal precoce. A abordagem diagnóstica mais utilizada nos estudos é feita através de análise do líquido amniótico obtido por amniocentese durante o pré-parto, um procedimento invasivo, não inserido na rotina pré-natal do Brasil.

Além disso, a literatura demonstra ineficiência da antibioticoterapia de amplo espectro, em casos suspeitos de infecção intra-amniótica, sendo mais eficaz quando diagnosticada laboratorialmente a infecção ou a sepse neonatal, principalmente com identificação do patógeno.

O padrão-ouro para diagnóstico atual de corioamnionite é o exame histopatológico da placenta. No entanto, as fases analítica e pós-analítica deste exame podem levar um tempo suficiente para retardar o início da terapêutica, situação não ideal em casos de sepse neonatal. Já a coleta de material subamniótico, com avaliação citológica, poderia fornecer um diagnóstico de corioamnionite mais rápido e acessível.

Ao relacionar os resultados da avaliação citológica de material subamniótico com resultados histopatológicos da placenta (padrão-ouro), o presente estudo propõe um método diagnóstico para corioamnionite e posterior manejo de sepse neonatal precoce mais rápido e acessível.

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a acurácia da análise citológica de material coletado em espaço subamniótico placentário como teste diagnóstico de corioamnionite, em comparação com exame histopatológico das mesmas placentas.

3.2. Específicos

- Determinar a validade da análise citológica de material coletado em espaço subamniótico placentário como teste diagnóstico de corioamnionite.
- Determinar a sensibilidade, especificidade e acurácia da análise citológica de material coletado em espaço subamniótico placentário como teste diagnóstico de corioamnionite.
- Determinar os valores preditivos positivo e negativo da análise citológica de material coletado em espaço subamniótico placentário como teste diagnóstico de corioamnionite.

4 MÉTODOS

4.1. Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo prospectivo de avaliação de teste diagnóstico para comparação de resultados de análise citológica de material colhido em espaço subamniótico (espaço abaixo da membrana amniótica e acima da placa coriônica) de placentas de pacientes submetidas a parto no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos anos de 2015 e 2016, com resultados de exame histopatológico das mesmas placentas (padrão-ouro).

4.2. Amostragem e tamanho da amostra

A prevalência de corioamnionite histológica da instituição foi levantada a partir dos resultados das avaliações histopatológicas de placentas nos anos anteriores, sendo encontrada uma prevalência de 8,73%. A partir dessa determinação, foi calculado o tamanho da amostra necessária para avaliação do teste diagnóstico, examinando-se as placentas prospectivamente até alcançar a amostragem necessária.

Para o cálculo do tamanho da amostra para amostragem aleatória não-randomizada, foi utilizada a seguinte fórmula: $n = Z^2 [P (1-P)] / (D^2)$; na qual, Z é o valor da distribuição normal padrão correspondente ao nível de confiança desejado (Z= 1,96 para Intervalo de 95% de Confiança - IC 95%), P é a prevalência esperada e D é o erro máximo aceitável na estimativa (semi-amplitude do IC - medida de precisão), sendo obtida uma amostra mínima de 112 placentas.

Foram excluídas do estudo amostras de pacientes gestantes, cujos informes clínicos, no pedido de exame histopatológico, indicavam o uso de antibioticoterapia prévia.

4.3. Avaliação Citológica

Para coleta de material subamniótico (espaço virtual, localizado abaixo do epitélio amniótico), utilizou-se técnica preconizada por Blanc (Blanc, 1953; Nessmann-Emmanuelli, 1983; Bruch et al, 1994), realizada anteriormente à fixação da placenta com formaldeído a 10%.

Fez-se abrasão de superfície fetal das membranas amnióticas, com alça metálica de sementeira de urocultura submetida à chama. Com bisturi estéril, foi feita uma incisão no âmnio, preferencialmente próximo ao cordão umbilical, com descolamento deste do córion subjacente, sendo exposto o espaço subamniótico, com ajuda de pinça anatômica. (McDonald; Chambers, 2000). Em condições de placentas gemelares, o procedimento foi realizado em cada placenta, exceto em condições monócóricas monoamnióticas.

Uma vez acessado o espaço subamniótico, coletou-se material, através de lâmina estéril, que foi distendido em lâmina de vidro (devidamente identificadas com o número do protocolo cadastrado). Esta foi imediatamente imersa em álcool absoluto, para fixação. As lâminas foram coradas pela técnica de Papanicolaou e submetidas à avaliação citológica.

Para avaliação citológica, utilizou-se técnica preconizada e previamente descrita por Blanc, 1961; Nessmann-Emmanuelli, 1983, por meio de análise semi-quantitativa de neutrófilos. A leucometria amniótica foi calculada após avaliação de 25 campos de grande aumento (objetiva de 100x), nas áreas de maior quantidade dessas células (*hotspot*). Essa leucometria foi classificada como negativa (< 5 neutrófilos), leve (5 – 10 neutrófilos), moderada (11 – 30 neutrófilos) e acentuada (> 30 neutrófilos). Não há, na literatura, outros parâmetros citomorfológicos descritos para diagnóstico de IIA.

4.4. Avaliação Macroscópica

Todas as placentas de partos realizados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás foram recebidas no Laboratório de Patologia por técnico próprio da instituição, sendo, imediatamente registrada sua recepção em um livro próprio de protocolo e cadastrada no sistema de laudos institucional, recebendo um protocolo específico, para registro. Todas as placentas vieram acompanhada de um pedido de

exame, que contém informações clínicas (idade da paciente, idade gestacional, comorbidades e uso de medicações durante a gestação).

Todas as placentas foram submetidas à fixação, através da imersão em solução neutra de formaldeído a 10%. Após fixação, as placentas foram avaliadas macroscopicamente. Inicialmente avaliou-se a inserção do cordão umbilical e das membranas amnióticas, seguida de secção do cordão umbilical, ao nível da sua inserção. O cordão umbilical foi medido e o número de espirais foi contado. Alterações de coloração ou lesões no cordão umbilical também foram descritas (nós, constrições e artéria umbilical única) (Spencer; Khong, 2003; Kent; Dahlstrom, 2006; Roberts, 2008).

Após avaliação da coloração das membranas amnióticas na porção fetal, retirou-se um fragmento das mesmas e todas as membranas amnióticas foram destacadas do parênquima placentário. Procedeu-se à pesagem e medida de comprimento do disco placentário, com posterior secção, para avaliação de lesões macroscópicas (infartos, trombos, descolamentos e neoplasias). Fragmentos de 3,0 – 5,0 mm de espessura de áreas aleatórias do parênquima foram obtidos, armazenados em cassetes histológicos de plástico, manual e devidamente identificados (número do protocolo cadastrado) (Spencer; Khong, 2003; Kent; Dahlstrom, 2006; Roberts, 2008).

Desse processamento macroscópico, foi levantada a informação da coloração das membranas amnióticas em superfície fetal (classificada, qualitativamente, em normal ou alterada – opacificada, amarelada ou esverdeada), uma vez que este critério macroscópico é um indício sugestivo de corioamnionite histológica, quando alterado (Spencer; Khong, 2003; Kent; Dahlstrom, 2006; Roberts, 2008).

4.5. Avaliação Histopatológica

As amostras foram processadas e incluídas em blocos de parafina, sendo submetidas à microtomia manual, coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) e montagem das lâminas para avaliação histopatológica.

A avaliação histopatológica ocorreu a partir do diagnóstico de patologias placentárias específicas, com ênfase no diagnóstico e classificação dos processos infecciosos placentários (corioamnionite, funiculite e placentite), a partir de critérios qualitativos (presença ou ausência de infiltrado inflamatório, localização e caracterização

do infiltrado inflamatório, e presença de alterações histopatológicas correlacionadas, como necrose, hemorragia e calcificações).

A corioamnionite foi classificada, histologicamente, como discreta (estádio 1 - subcorionite aguda / corionite aguda - neutrófilos em fibrina subcoriônica ou na interface entre decídua e córion), moderada (estádio 2 - corioamnionite aguda - neutrófilos em espaço subamniótico) e acentuada (estádio 3 - corioamnionite necrotizante - necrose, descamação do âmnio, espessamento da membrana basal amniótica, cariorrexe neutrofílica e abscessos multifocais) (Pankuch et al, 1989; Redline et al, 2003; Spencer; Khong, 2003; Kraus, 2004; Kent; Dahlstrom, 2006; Roberts, 2008; Baergen, 2011; Kim et al, 2015a, 2015b).

A funiculite foi classificada em precoce (estádio 1, caracterizada pela presença de neutrófilos na parede da veia umbilical), intermediária (estádio 2 – neutrófilos na parede de uma ou ambas as artérias umbilicais) e tardia (estádio 3 – panvasculite, por vezes com debris celulares e necrose concêntrica). Casos com um padrão específico de funiculite (necrose amniótica e múltiplos microabscessos periféricos) foram separados para avaliação por *Candida* sp (Pankuch et al, 1989; Redline et al, 2003; Spencer; Khong, 2003; Kraus, 2004; Kent; Dahlstrom, 2006; Roberts, 2008; Baergen, 2011; Kim et al, 2015a, 2015b).

A placentite histológica, que pode envolver o comprometimento das vilosidades coriônicas, do espaço intervilo, ou de ambos, foi classificada em vilite aguda (neutrófilos e necrose de vilosidades, geralmente associada à seps neonatal), intervilosite aguda (neutrófilos e fibrina em espaço intervilo, geralmente associada à listeriose), placentite crônica (geralmente associada a infecções maternas durante a gestação, apresentando infiltrado inflamatório mononuclear e fibrina, podendo apresentar neutrófilos de permeio – vilite crônica ativa) e intervilosite crônica (infiltrado inflamatório mononuclear com fibrina, em espaço intervilo, geralmente associada à malária) (Spencer; Khong, 2003; Kraus, 2004; Kent; Dahlstrom, 2006; Roberts, 2008; Baergen, 2011).

4.6. Análise de Dados e Considerações Estatísticas

O banco de dados foi desenvolvido e analisado com o programa “*Statistical Package for the Social Sciences– SPSS*” versão 18.0 (International Business Machine Corp, Armonk, New York, EEUU).

Para análise dos resultados, fez-se estatística descritiva, mediante a distribuição de frequências simples e percentuais; além de comparações entre variáveis categóricas, com testes devidos e nível de significância de 5%.

Para determinação da validade da análise citológica de material subamniótico, foi comparado os resultados do teste com o diagnóstico histopatológico de corioamnionite (padrão-ouro), através da distribuição dos casos em uma tabela 2 x 2, com posterior cálculo da sensibilidade, especificidade e valores preditivos, além do cálculo da área sob a curva ROC (Buck; Gart, 1966; Oliveira et al, 2010).

Após distribuição dos casos pelas categorias diagnósticas ordenadas, utilizou-se regressão logística ordinal para cálculo da probabilidade de ocorrência do evento (Abreu et al, 2009).

5 RESULTADOS

Durante o período do estudo, realizado entre 14 de setembro de 2015 e 18 de março de 2016, o Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás recebeu um total de 214 placentas. Desse quantitativo, 34 amostras foram excluídas do estudo, devido ao informe clínico de antibioticoterapia (para qualquer infecção materna) no pedido de exame, resultando em 180 placentas. Destas, 4 (quatro) placentas eram gemelares, sendo que nenhuma era padrão monócórionica-monoamniótica, totalizando 184 amostras. Os outros dados clínicos, obtidos do pedido de exame, não foram utilizados para avaliação dos resultados.

Conforme metodologias descritas, todas as 184 amostras tiveram material subamniótico colhido por swab e 127 (69,02%) amostras aleatórias foram processadas macroscopicamente e analisadas histologicamente. O critério de avaliação citológica foi a identificação de epitélio amniótico esfoliado, em blocos, ou com células isoladas (Figura 01).

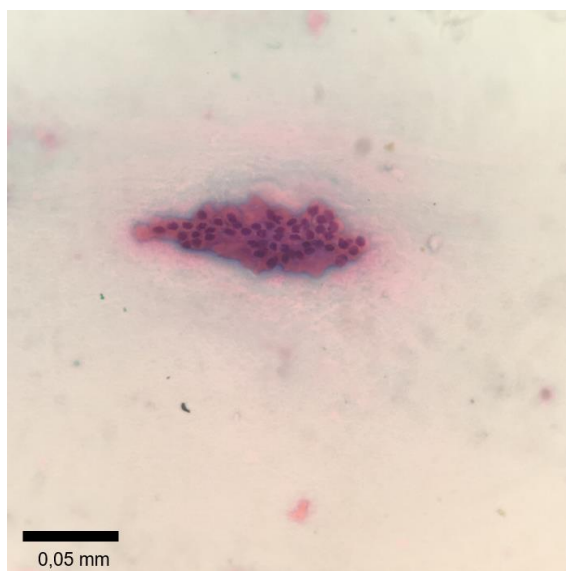


Figura 01 – (Papanicolaou) Epitélio amniótico esfoliado.

Das 127 amostras, 57 (44,88%) citologias apresentaram leucometria amniótica negativa (< 5 neutrófilos – Figura 02) e a maioria das positivas (34 citologias, 26,77% -

Figura 03) apresentou leucometria leve (Tabela 01). Duas amostras (1,57%) não puderam ser avaliadas citologicamente, devido ao fundo extremamente hemorrágico (Figura 04), o que pode prejudicar a avaliação da leucometria (neutrófilos do processo inflamatório x neutrófilos do sangue periférico); sendo excluídas da avaliação estatística.

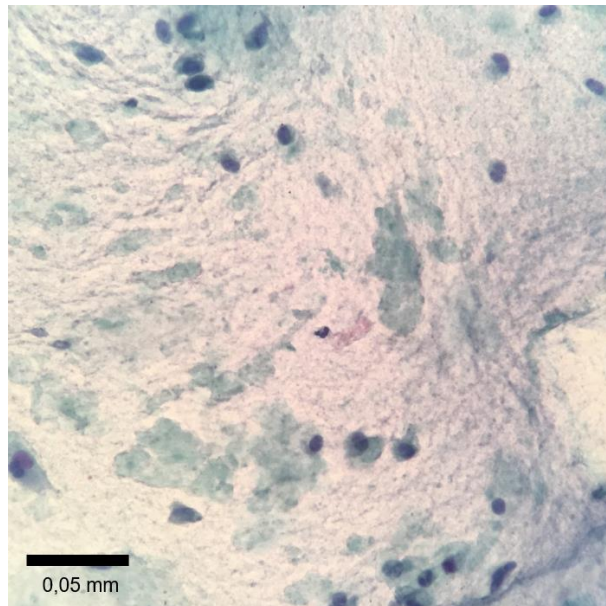


Figura 02 – (Papanicolaou) Esfregaço com fundo mucóide e leucometria negativa.

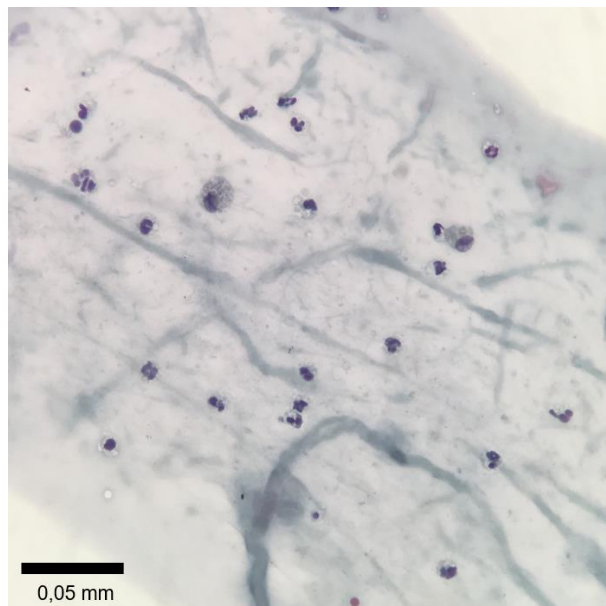


Figura 03 – (Papanicolaou) Esfregaço com fundo mucóide e leucometria moderada.

Na avaliação macroscópica das placentas, 33 (25,98%) apresentaram coloração de MA alterada, em um espectro qualitativo, variando em tonalidades amarelo-esverdeadas, até à opacificação das mesmas. Destas, apenas 16 apresentavam corioamnionite

histológica. 61 placentas foram negativas para ambos os critérios (coloração alterada e corioamnionite histológica). A comparação entre o achado macroscópico da coloração das placentas não apresentou chance estatisticamente significativa para o diagnóstico de corioamnionite histológica (χ^2 : 1,845; OR: 1,74; IC 95%: 0,7791 – 3,885; p = 0,17) (Tabela 02).

Tabela 01 – Distribuição dos casos por leucometria amniótica

Leucometria amniótica	N (%)
< 5 neutrófilos (negativa)	57 (44,88%)
5 – 10 neutrófilos (leve)	34 (26,77%)
11 – 30 neutrófilos (moderada)	21 (16,54%)
> 30 neutrófilos (acentuada)	13 (10,24%)
Não avaliável	2 (1,57%)
TOTAL	127 (100%)

Tabela 02 – Distribuição dos casos pela coloração de membranas amnióticas em relação à presença de corioamnionite histológica

		Corioamnionite histológica	
		Presente	Ausente
Coloração das membranas amnióticas (superfície fetal)	Normal	33	61
	Alterada (opacificada, amarelada ou esverdeada)	16	17
χ^2 : 1,845	OR: 1,74 (IC 95%: 0,7791 – 3,885)	p = 0,17	

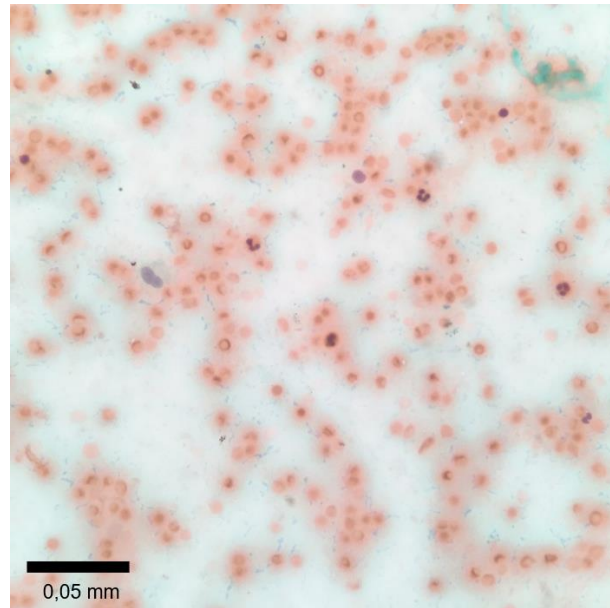


Figura 04 – (Papanicolaou) Esfregaço hemorrágico.

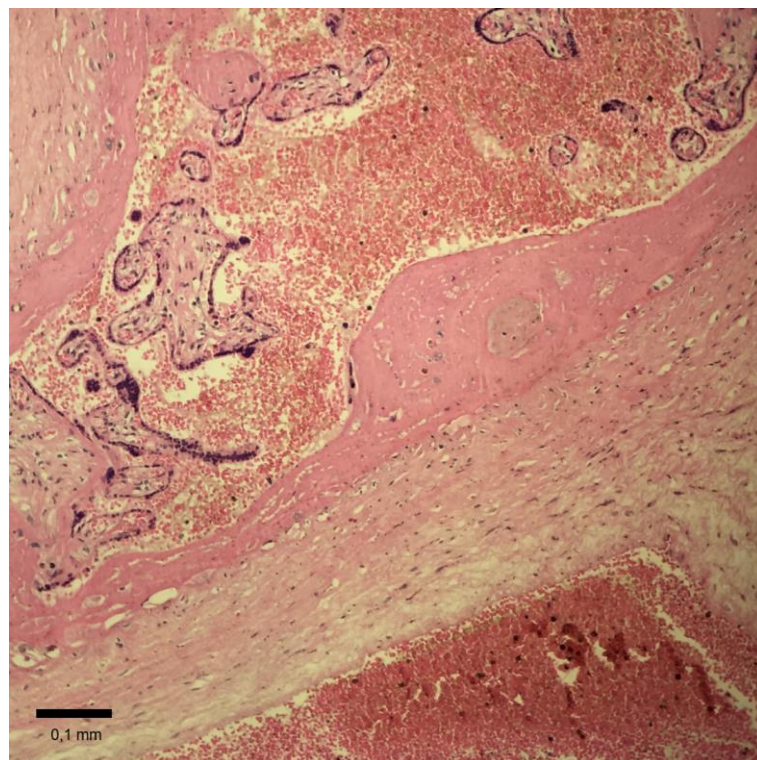


Figura 05 – (Hematoxilina-Eosina) Hematoma subamniótico do esfregaço hemorrágico.

Uma alteração macroscópica bastante identificada foram focos / áreas de infarto do parênquima placentário (30 amostras, 23,62%), inclusive um caso cursando com infarto extenso do assoalho materno. Outras alterações identificáveis, à macroscopia,

foram: membranas circunvaladas, nó verdadeiro, placenta suscenturiada, hematoma subamniótico (Figura 05) e hemangioma subcoriônico (1 caso de cada).

Na avaliação histopatológica (Tabela 03), 49 (38,58%) amostras apresentaram corioamnionite histológica, sendo 39 de estágio 1 (Figura 06) e 10 de estágio 2 (Figura 07). Observou-se, ainda, funiculite aguda em 7 (5,51%) amostras, sendo 4 de estágio 1 (Figura 08) e 3 de estágio 2 (Figura 09). Todos os casos de funiculite aguda foram observados em amostras com corioamnionite histológica. Não foi observada amostra com corioamnionite histológica ou funiculite aguda de estágio 3.

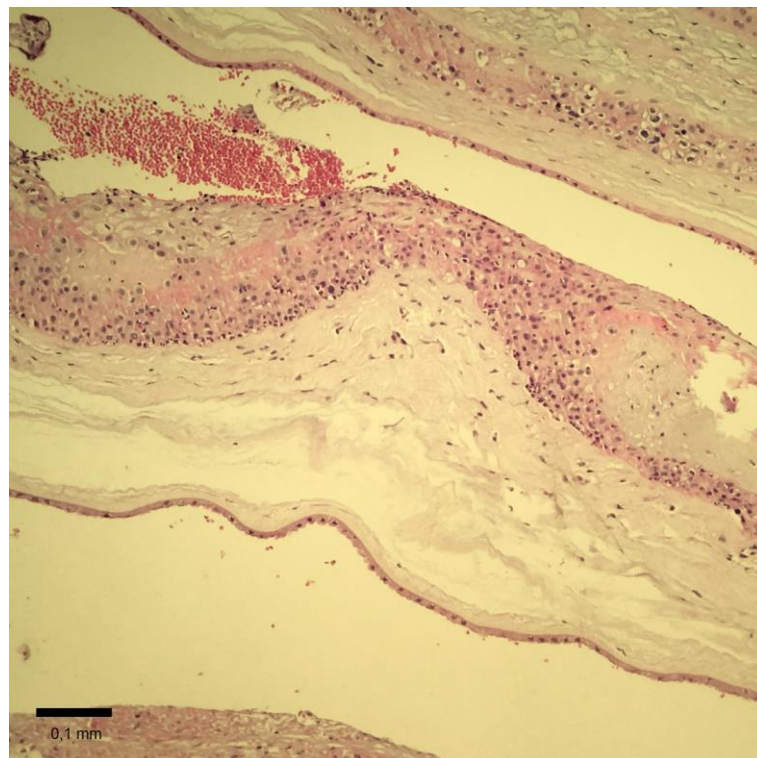


Figura 06 – (Hematoxilina-Eosina) Corioamnionite estágio 1.

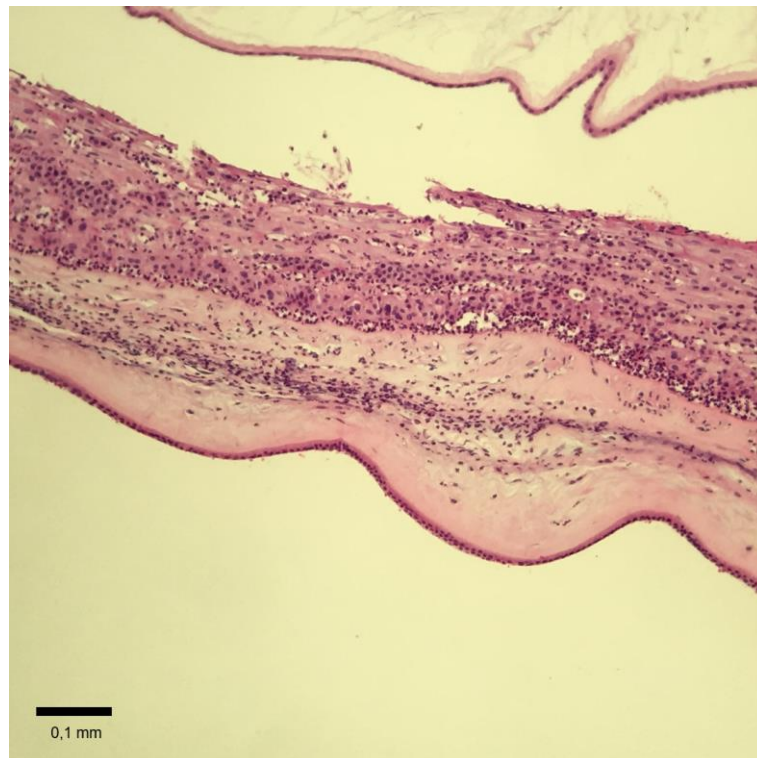


Figura 07 – (Hematoxilina-Eosina) Corioamnionite estágio 2.

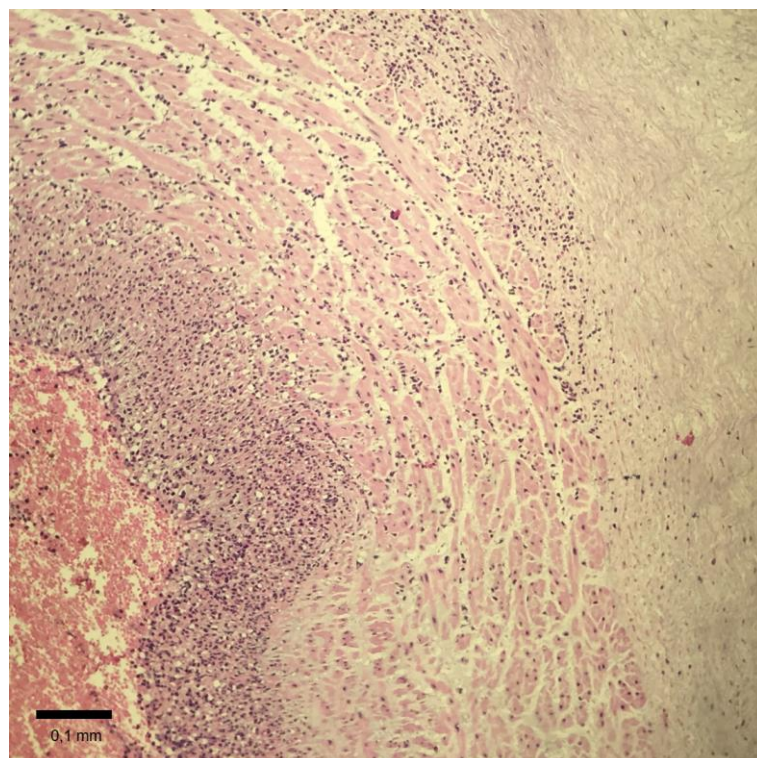


Figura 08 – (Hematoxilina-Eosina) Funiculite estágio 1.

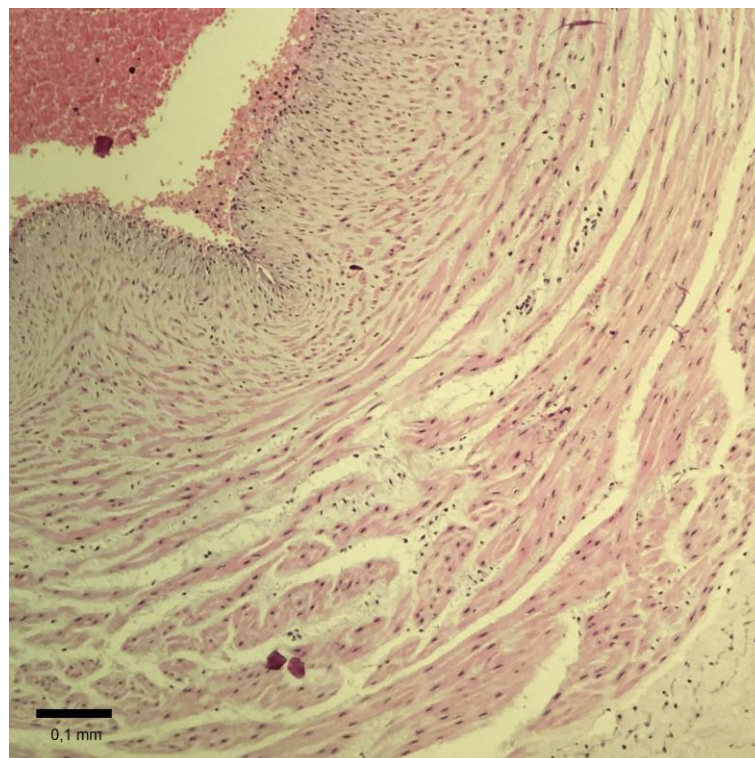


Figura 09 – (Hematoxilina-Eosina) Funiculite estágio 2.

Em relação à placentite, 12 (9,45%) amostras foram positivas, sendo que o padrão predominante foi de vilosite ancorante (7 casos, 58,34% dos casos de placentite – Figura 10). Outros padrões encontrados foram de vilosite aguda (3 casos, 25,0% - Figura 11) e 1 caso (8,33%) com vilosite crônica ativa e intervilosite aguda associada (Figura 12) (Tabela 03).

Tabela 03 – Distribuição dos casos por padrão de inflamação placentária

Inflamação placentária		N (%)
Corioamnionite aguda	Estádio 1	39 (30,70%)
	Estádio 2	10 (7,88%)
	Estádio 3	0
Funiculite aguda	Estádio 1	4 (3,15%)
	Estádio 2	3 (2,36%)
	Estádio 3	0
Placentite		12 (9,45%)
Ausência de infecção		71 (55,90%)

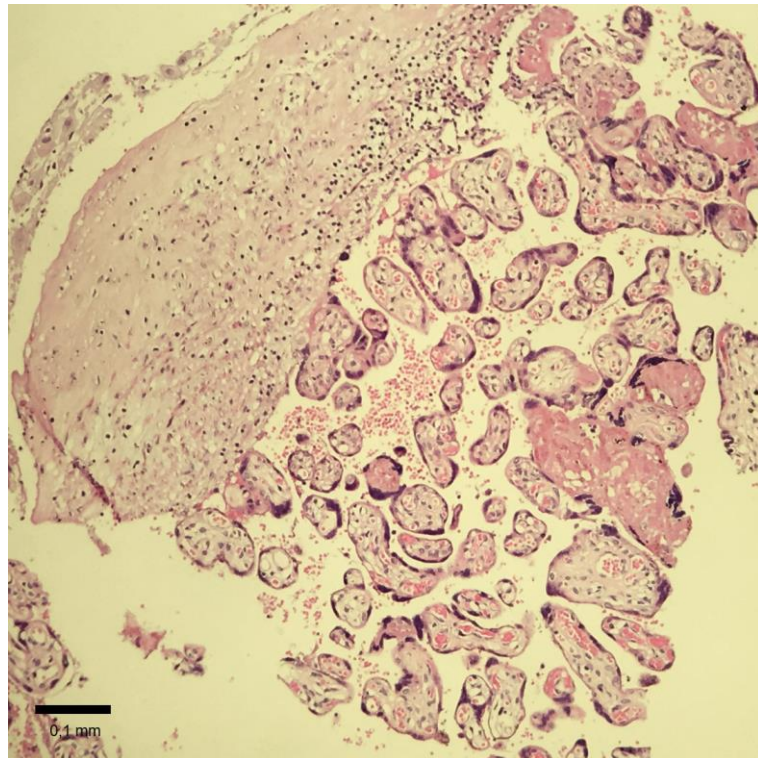


Figura 10 – (Hematoxilina-Eosina) Vilosite ancorante.

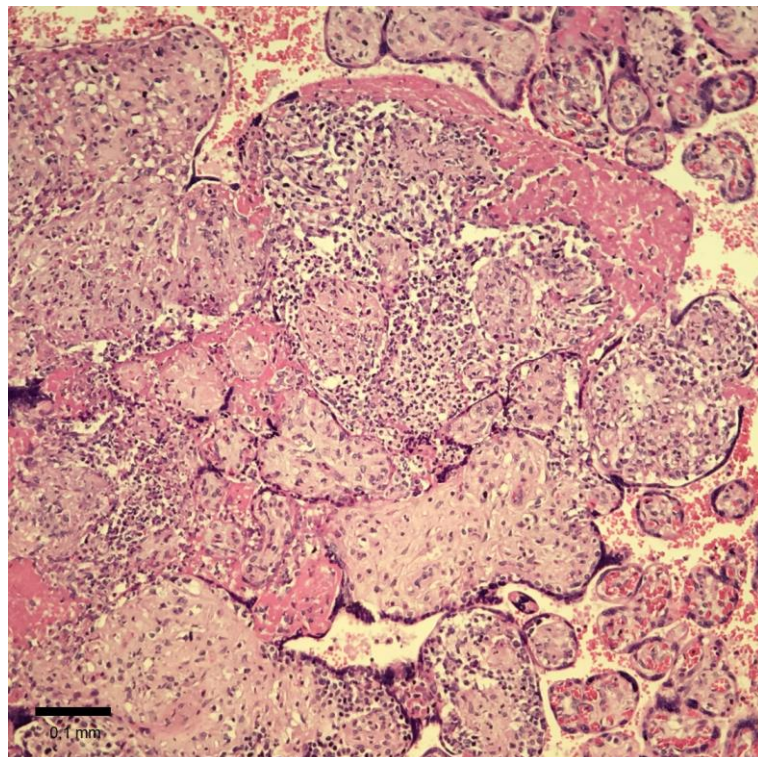


Figura 11 – (Hematoxilina-Eosina) Vilosite aguda.

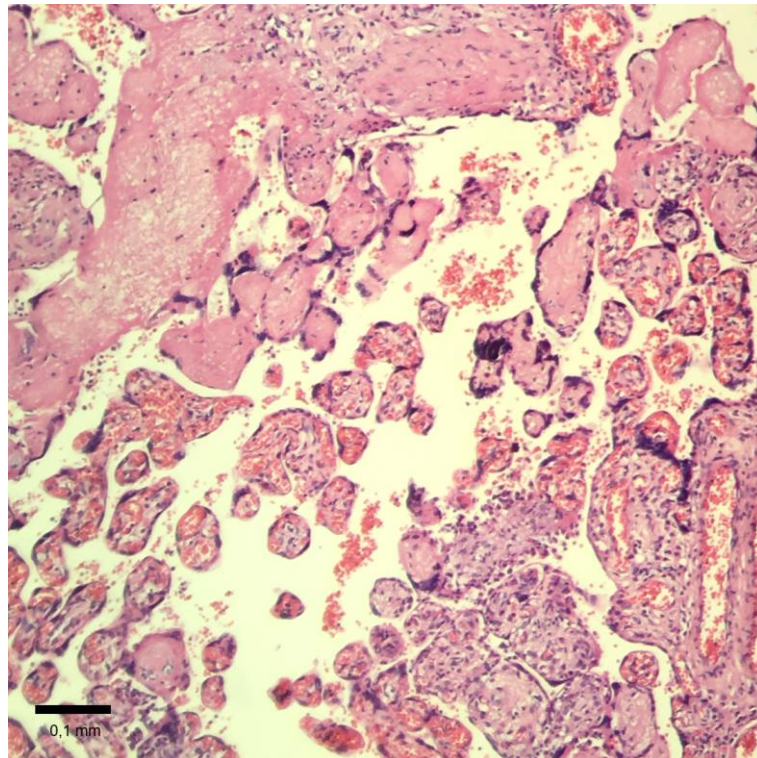


Figura 12 – (Hematoxilina-Eosina) Vilosite crônica ativa e intervilosite aguda.

Outras alterações microscópicas identificáveis foram: infarto crônico de vilosidades (21 casos, 16,53%), focos de descolamento (21 casos, 16,53%), trombo interviloso (12 casos, 9,45%), hematoma subamniótico (10 casos, 7,87%), deposição excessiva de fibrina perivilosa (8 casos, 6,30%) e infarto agudo de vilosidades (5 casos, 3,94%); além das confirmações histológicas de infarto do assoalho materno e de hemangioma placentário.

Para avaliação do teste diagnóstico, construiu-se uma tabela 2 x 2, utilizando, como critério positivo para citologia, leucometria amniótica > 4 neutrófilos, e, como caso positivo, a presença de corioamnionite histológica. 38 casos foram positivos para ambas as técnicas e 46 casos foram negativos citológica e histopatologicamente. 30 casos foram positivos à citologia, apesar da negatividade histopatológica e 11 casos apresentavam < 5 neutrófilos no swab de material amniótico, apesar de evidenciarem corioamnionite histológica (Tabela 04).

A partir dos cálculos, obteve-se sensibilidade desse teste de 77,55% e especificidade de 60,53%, com acurácia de 67,2%. Os valores preditivos foram de 55,88% para positivo e de 80,7% para negativo (Tabela 04).

Tabela 04 – Distribuição dos casos (leucometria amniótica x corioamnionite histológica) para cálculo dos índices de avaliação de teste diagnóstico e respectivos intervalos de confiança (95%).

		Corioamnionite histológica	
		Presente	Ausente
Leucometria amniótica	Positiva (5 ou mais neutrófilos)	38	30
	Negativa (4 ou menos neutrófilos)	11	46
S: 77,55% (64,12 - 86,98%)	E: 60,53% (49,29 – 70,75%)	VPP: 55,88% (44,08 – 67,05%)	VPN: 80,7% (68,66 – 88,87%)
A: 67,20% (58,56 – 88,87%)			

S: Sensibilidade, E: Especificidade, VPP: Valor preditivo positivo, VPN: Valor preditivo negativo, A: Acurácia.

Ao estratificar os resultados da avaliação citológica, conforme escore de leucometria amniótica, e calcular a área sob a curva ROC (Figura 13), obteve-se valor de 0,7591 (IC 95%: 0,6690 – 0,8492).

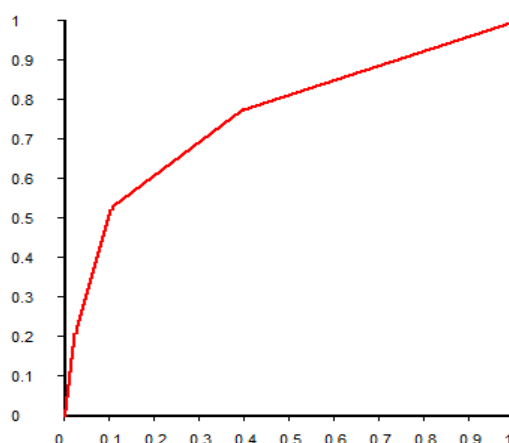


Figura 13 – Curva ROC para os níveis de leucometria amniótica (abscissa: FALSOS POSITIVOS, ordenada: VERDADEIROS POSITIVOS)

O resultado do χ^2 entre leucometria amniótica e corioamnionite histológica em relação às suas respectivas categorias, foi de 31,033 ($p < 0,05$ / grau de liberdade: 6 / χ^2 tabelado: 1,635) (Tabela 05), sendo maior que o resultado tabelado, fato que rejeita a hipótese nula, evidenciando associação entre os dois parâmetros.

A regressão logística ordinal demonstrou que essa associação é mais forte quando os resultados são negativos (leucometria amniótica < 5 neutrófilos e CA histológica ausente), não havendo associação entre os resultados positivos. Ocorre, também, associação entre o resultado de leucometria amniótica leve (entre 5 e 10 neutrófilos) e um achado negativo de corioamnionite histológica (Tabela 05).

Diante dos resultados da regressão logística ordinária, optou-se por recalcular os índices de avaliação de teste diagnóstico; considerando, como negativo, o valor de leucometria amniótica menor que 11 neutrófilos; permanecendo o critério do exame padrão-ouro (histopatológico); e posterior comparação com os primeiros resultados (Tabela 06).

Tabela 05 – Regressão logística ordinária entre as categorias de leucometria amniótica e os estádios de corioamnionite histológica.

		Corioamnionite histológica		
		Ausente	Estádio 1	Estádio 2
Leucometria amniótica	Negativa (< 5 neutrófilos)	46 (80,7%)	11 (19,3%)	0 (0,0%)
	Leve (5 – 10 neutrófilos)	22 (64,7%)	9 (26,5%)	3 (8,8%)
	Moderada (11 – 30 neutrófilos)	6 (30,0%)	10 (50,0%)	4 (20,0%)
	Acentuada (> 30 neutrófilos)	2 (14,3%)	9 (64,3%)	3 (21,4%)
		χ^2 : 31,033 / p: 0,000 ($< 0,05$) / χ^2 tabelado: 1,635 (grau de liberdade: 6 / p: 5%)		

Tabela 06 – Distribuição dos casos (leucometria amniótica x corioamnionite histológica) para cálculo dos índices de avaliação de teste diagnóstico e respectivos intervalos de confiança (95%), com alteração do *cut-off* para leucometria amniótica.

		Corioamnionite histológica	
		Presente	Ausente
Leucometria amniótica	Positiva (11 ou mais neutrófilos)	26	8
	Negativa (10 ou menos neutrófilos)	23	68
S: 53,06% (39,38 – 66,30%)	E: 89,47% (80,58 – 94,57%)	VPP: 76,47% (60,00 – 87,56%)	VPN: 74,73% (64,92 – 82,53%)
A: 75,20% (66,95 – 81,94%)			
S: Sensibilidade, E: Especificidade, VPP: Valor preditivo positivo, VPN: Valor preditivo negativo, A: Acurácia.			

Em relação à placentite, não há associação entre as variáveis (leucometria amniótica e placentite histopatológica) em uma avaliação com estratificação da leucometria amniótica (χ^2 : 0,052 / p: 0,974 / χ^2 tabelado: 0,352), uma vez que o escore calculado foi menor que o tabelado, aceitando-se a hipótese nula (Tabela 07).

Tabela 07 – Regressão logística ordinária entre as categorias de leucometria amniótica e o diagnóstico de placentite histológica

		Placentite histológica	
		Presente	Ausente
Leucometria amniótica	Negativa (< 5 neutrófilos)	6 (10,53%)	51 (89,47%)
	Leve (5 – 10 neutrófilos)	2 (5,88%)	32 (94,12%)
	Moderada (11 – 30 neutrófilos)	3 (15,0%)	17 (85,0%)
	Acentuada (> 30 neutrófilos)	1 (7,14%)	13 (92,86%)
χ^2 : 0,052 / p: 0,974 / χ^2 tabelado: 0,352 (grau de liberdade: 3 / p: 5%)			

6 DISCUSSÃO

Com relação à previsão diagnóstica de corioamnionite, através do critério macroscópico de alteração da coloração das membranas amnióticas em face fetal, percebe-se não haver associação desse critério com corioamnionite (OR: 1,74; IC 95%: 0,7791 – 3,885; p: 0,17). A avaliação desse critério, segundo a literatura, é subjetiva e pouco específica (Lee; Leung, 2012; Queiros da Mota et al, 2013; Kim et al, 2015a, 2015b), conforme comprovado nos resultados. Outros achados macroscópicos não foram considerados, devido ao fato de terem pouca correlação com corioamnionite, sendo mais importantes no diagnóstico de outras patologias placentárias (Redline, 2014).

Todos os casos de funiculite histológica, independentemente do estadiamento, também apresentaram diagnóstico de corioamnionite histopatológica. Este resultado reforça o conceito de que a leucotaxia para o cordão umbilical é uma condição mais grave, associada a uma resposta fetal à infecção (Jessop; Sebire, 2011; Kim et al, 2015a, 2015b).

Seguindo a mesma técnica descrita por Bruch et al (1994), obteve-se maior quantidade de esfregaços subamnióticos positivos (68, 54,4%), apesar da amostra menor (127 casos). Os índices de avaliação de teste diagnóstico (sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo) foram próximos, contudo a área abaixo da curva ROC obteve um valor próximo ao limite considerado estatisticamente significativo (área > 0,7). Tais resultados equiparam-se aos encontrados no maior estudo para avaliação do valor diagnóstico da citologia de esfregaço subamniótico, realizado em 1994 (Bruch et al, 1994), através da comparação entre citologia e histopatologia de 300 casos, havendo 34% com leucometria amniótica positiva. Os autores obtiveram uma sensibilidade baixa (54,8%) e uma boa especificidade (79,5%), com valores preditivos relativamente bons (positivo de 62,4% e negativo de 73,9%).

Cabe citar a importância da caracterização do fundo do esfregaço (também mencionada no estudo de Bruch et al, 1994), que deve ser limpo, mucóide ou exsudativo/necrótico para uma melhor avaliação, uma vez que fundos hemorrágicos

podem levar a uma interpretação errônea da leucometria amniótica, conforme constatado em 2 (dois) casos.

A avaliação da regressão logística ordinária, quando comparados os níveis de leucometria amniótica aos estádios de corioamnionite histológica, permitiu observar associação entre os dois métodos ($\chi^2_{\text{calculado}} > \chi^2_{\text{tabelado}}$, $p < 0,05$). No entanto, percebe-se que essa correlação ocorre, principalmente entre os valores negativos, com pouca relação entre os valores positivos extremos. Nota-se, ainda, na regressão logística ordinária, maior relação entre o grau leve de leucometria amniótica (entre 5 e 10 neutrófilos) com a ausência de corioamnionite histológica.

Considerando esses resultados da regressão logística ordinária, optou-se por aumentar o valor da leucometria amniótica (*cut-off*) para o critério de citologia negativa (casos considerados positivos com contagem neutrofílica acima de 11) e obtiveram-se índices da avaliação de teste diagnóstico mais próximos ao estudo de Bruch et al, 1994, contudo com melhor especificidade e valores preditivos. Tais resultados sugerem uma provável necessidade de redefinição dos valores de referência para leucometria amniótica, reforçada pelo fato de aumento importante da especificidade, associado à melhora nos resultados dos valores preditivos.

Em relação ao uso da técnica citológica de análise de material subamniótico, percebe-se que o valor da sensibilidade encontra-se próximo de 50%, não adequado para um exame de triagem. A técnica merece destaque pela sua capacidade diagnóstica, contudo, a força do teste restringe-se à capacidade de identificação dos casos verdadeiramente negativos (alta especificidade e alto valor preditivo negativo).

A identificação de uma citologia subamniótica positiva não permite prever, de modo seguro, a presença de corioamnionite histológica (considerado o maior critério de relevância para manejo clínico dos pacientes). Além disso, a estratificação da citologia positiva não permite correlação com o estadiamento da corioamnionite. No entanto, a própria literatura aconselha o abandono de critérios de estadiamento ou de gradação da corioamnionite histológica, uma vez que há pouca correlação entre essa classificação e a repercussão clínica (Jessop; Sebire, 2011; Kim et al, 2015a, 2015b).

Com relação à placentite, nota-se, pela regressão logística ordinária, que não há associação entre as técnicas ($\chi^2_{\text{calculado}} < \chi^2_{\text{tabelado}}$, $p > 0,05$). Tal fato já era esperado,

considerando que a placentite é um espectro de lesões morfológicas que atinge o parênquima placentário, região do órgão que não é acessado pela técnica de esfregaço do espaço subamniótico (Russell, 1980; Redline; Abramowsky, 1985; Kim et al, 2015a, 2015b).

Uma limitação do trabalho é a incapacidade de analisar a reprodutibilidade da técnica, considerando que o estudo foi realizado por apenas um avaliador.

7 CONCLUSÕES

O trabalho permitiu avaliar a correlação entre a análise citológica de material coletado em espaço subamniótico placentário como teste diagnóstico de CA, em comparação com exame histopatológico das mesmas placentas, considerado como método padrão-ouro.

Contudo, os resultados apontam uma sensibilidade baixa, mesmo após alteração do valor de referência para leucometrias amnióticas consideradas positivas. A alta especificidade e o alto valor preditivo negativo demonstram baixa capacidade de previsão de CA histopatológica, o que não altera os protocolos de manejo dos pacientes em investigação de complicações relacionadas às infecções intra-amnióticas.

Portanto, percebe-se que a avaliação citológica de material subamniótico é uma técnica melhor utilizada para o diagnóstico de ausência de corioamnionite (o que é extremamente útil no raciocínio da *causa mortis* em casos de óbito intra-útero ao afastar possíveis causas infecciosas).

Logo, o histopatológico mantém-se como padrão-ouro, tanto para o diagnóstico de CA e funiculite, quanto para o diagnóstico de placentite, sendo necessários mais estudos para melhorar a fase pré-analítica do exame histopatológico, de maneira a torná-lo hábil o suficiente para ser realmente eficaz no manejo dos pacientes.

REFERÊNCIAS

Abdel-Razeq SS, Buhimschi IA, Bahtiyar MO, Rosenberg VA, Dulay AT, Han CS, Werner EF, Thung S, Buhimschi CS. Interpretation of amniotic fluid white blood cell count in "bloody tap" amniocenteses in women with symptoms of preterm labor. ***Obstetrics and Gynecology***, v. 116, p. 344-354, 2010.

Abreu MNS, Siqueira AL, Caiaffa WT. Regressão logística ordinal em estudos epidemiológicos. ***Revista de Saúde Pública***, v. 43, n. 1, p. 183-194, 2009.

Aguin E, Aguin T, Cordoba M, Aguin V, Roberts R, Albayrak S, Kruger M, Bahado-Singh R. Amniotic fluid inflammation with negative culture and outcome after cervical cerclage. ***The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine***, v. 25, p. 1990-1994, 2012.

Al-Adnani M, Sebire NJ. The role of perinatal pathological examination in subclinical infection in obstetrics. Best practice & research. ***Clinical Obstetrics & Gynaecology***, v. 21, p. 505-521, 2007.

Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. ***The Cochrane database of systematic reviews***, Cd003252, 2003.

Allanson B, Jennings B, Jacques A, Charles AK, Keil AD, Dickinson JE. Infection and fetal loss in the mid-second trimester of pregnancy. ***The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology***, v. 50, p. 221-225, 2010.

Amorim MMR, Melo ASdO. Avaliação dos exames de rotina no pré-natal: parte 2. ***Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia***, v. 31, p. 367-374, 2009.

Avila C, Willins JL, Jackson M, Mathai J, Jabsky M, Kong A, Callaghan F, Ishkin S, Shroyer, LW. Usefulness of two clinical chorioamnionitis definitions in predicting neonatal infectious outcomes: A systematic review. ***American Journal of Perinatology***, v. 32, p. 1001-1019, 2015.

Baergen RN. Manual of Pathology of Human Placenta. 2nd edition. New York: Springer, 2011. 560 p.

Basu S, Dewangan S, Shukla RC, Anupurva S, Kumar A. Cerebral blood flow velocity in early-onset neonatal sepsis and its clinical significance. ***European Journal of Pediatrics***, v. 171, p. 901-909, 2012.

Berger A, Witt A, Haiden N, Kaider A, Klebermasz K, Fuiko R, Langgartner M, Pollak A. Intrauterine infection with Ureaplasma species is associated with adverse neuromotor outcome at 1 and 2 years adjusted age in preterm infants. ***Journal of Perinatal Medicine***, v. 37, p. 72-78, 2009.

Bhola K, Al-Kindi H, Fadia M, Kent AL, Collignon P, Dahlstrom JE. Placental cultures in the era of peripartum antibiotic use. ***The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology***, v. 48, p. 179-184, 2008.

Blanc PWA. Infection amniotique et néonatale. ***Gynaecologica***, v. 135, p. 101-110, 1953.

Booth GR, Al-Hosni M, Ali A, Keenan WJ. The utility of tracheal aspirate cultures in the immediate neonatal period. ***Journal of Perinatology***, v. 29, p. 493-496, 2009.

Bove KE. Practice guidelines for autopsy pathology: The perinatal and pediatric autopsy. ***Archives of Pathology & Laboratory Medicine***, v. 121, p. 368-376, 1997.

Broekhuizen FF, Gilman M, Hamilton PR. Amniocentesis for gram stain and culture in preterm premature rupture of the membranes. ***Obstetrics and Gynecology***, v. 66, p. 316-321, 1985.

Bruch JF, Bingen E, Fondacci C, Pierin M, Lombrail P, Oury JF, Nessmann C. The value of chorioamniotic plate smears in predicting intraamniotic infection. ***Trophoblast Research***, v. 8, p. 177-191, 1994.

Buck AA, Gart JJ. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. ***American Journal of Epidemiology***, v. 83, p. 586-592, 1966.

Carroll SG, Philpott-Howard J, Nicolaides KH. Amniotic fluid gram stain and leukocyte count in the prediction of intrauterine infection in preterm prelabour amniorrhexis. ***Fetal Diagnosis and Therapy***, v. 11, p. 1-5, 1996.

Ceccon MEJR. Novas Perspectivas na Sepse Neonatal. ***Pediatrics***, v. 30, p. 198-202, 2008.

Chacko B, Sohi I. Early onset neonatal sepsis. ***Indian Journal of Pediatrics***, v. 72, p. 23-26, 2005.

Chaim W, Mazor M, Meril T, Peleg R, Maor E. Late miscarriage and intraamniotic candidiasis in a woman with a retained intrauterine contraceptive device. ***Archives of Gynecology and Obstetrics***, v. 253, p. 157-160, 1993.

Chan GJ, Baqui AH, Modak JK, Murillo-Chaves A, Mahmud AA, Boyd TK, Black RE, Saha SK. Early-onset neonatal sepsis in Dhaka, Bangladesh: Risk associated with maternal bacterial colonisation and chorioamnionitis. ***Tropical Medicine and International Health: TM & IH***, v. 18, p. 1057-1064, 2013.

Chaudry S, Khong TY, Charles AK, Keil AD. What happens when a baby dies: Stillbirth investigations for infection and other aetiologies. ***Microbiology Australia***, p. 179-183, 2008.

Cherouny PH, Pankuch GA, Romero R, Botti JJ, Kuhn DC, Demers LM, Appelbaum PC. Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8: Association with histologic chorioamnionitis, preterm delivery, and bioactive amniotic fluid leukoattractants. ***American Journal of Obstetrics and Gynecology***, v. 169, p. 1299-1303, 1993.

Combs CA, Gravett M, Garite TJ, Hickok DE, Lapidus J, Porreco R, Rael J, Grove T, Morgan TK, Clewell W, Miller H, Luthy D, Pereira L, Nageotte M, Robilio PA, Fortunato S, Simhan H, Baxter JK, Amon E, Franco A, Trofatter K, Heyborne K. Amniotic fluid infection, inflammation, and colonization in preterm labor with intact membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 210, p. 125 (e121-125.e115), 2014.

Conti N, Torricelli M, Voltolini C, Vannuccini S, Clifton VL, Bloise E, Petraglia F. Term histologic chorioamnionitis: A heterogeneous condition. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2015.

Coultrip LL, Grossman JH. Evaluation of rapid diagnostic tests in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 167, p. 1231-1242, 1992.

Coultrip LL, Lien JM, Gomez R, Kapernick P, Khoury A, Grossman JH. The value of amniotic fluid interleukin-6 determination in patients with preterm labor and intact membranes in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 171, p. 901-911, 1994.

Crawford JT, Pereira L, Buckmaster J, Gravett MG, Tolosa JE. Amniocentesis results and novel proteomic analysis in a case of occult candidal chorioamnionitis. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v. 19, p. 667-670, 2006.

Czikk MJ, McCarthy FP, Murphy KE. Chorioamnionitis: from pathogenesis to treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, p. 1304-1311, 2011.

Daoud GA, Suzuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Suzumori N, Tanemura M. Establishment of a polymerase chain reaction method for detection of Escherichia coli in amniotic fluid in patients with chorioamnionitis. *Fetal Diagnosis and Therapy*, v. 24, p. 132-139, 2008.

DiGiulio DB, Gervasi MT, Romero R, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Seok KS, Gomez R, Mittal P, Gotsch F, Chaiworapongsa T, Oyarzun E, Kim CJ, Relman DA. Microbial invasion of the amniotic cavity in pregnancies with small-for-gestational-age fetuses. *Journal of Perinatal Medicine*, v. 38, p. 495-502, 2010.

DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, Gomez R, Kim CJ, Seok KS, Gotsch F, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Sanders K, Bik EM, Chaiworapongsa T, Oyarzun E, Relman DA. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 64, p. 38-57, 2010.

Dutta S, Reddy R, Sheikh S, Kalra J, Ray P, Narang A. Intrapartum antibiotics and risk factors for early onset sepsis. Archives of Disease in Childhood. *Fetal and Neonatal Edition*, v. 95, p. F99-103, 2010.

Edwards RK, Clark P, Locksmith Gregory J, Duff P. Performance characteristics of putative tests for subclinical chorioamnionitis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, v. 9, p. 209-214, 2001.

Ericson JE, Laughon MM. Chorioamnionitis: Implications for the neonate. *Clinics in Perinatology*, v. 42, p. 155-165, 2015.

Esplin MS, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim YM, Edwin S, Gomez R, Mazor M, Adashi EY. Monocyte chemotactic protein-1 is increased in the amniotic fluid of women who deliver preterm in the presence or absence of intra-amniotic infection. ***The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine***, v. 17, p. 365-373, 2005.

Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. Assistência Pré-Natal. In Projeto Diretrizes, AMB CFM, p. 1, 2006.

Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. Rotura Prematura das Membranas. In Projeto Diretrizes, AMB CFM, p. 13, 2008.

Figuerola R, Garry D, Elimian A, Patel K, Sehgal PB, Tejani N. Evaluation of amniotic fluid cytokines in preterm labor and intact membranes. ***The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine***, v. 18, p. 241-247, 2005.

Flores-Herrera H, Garcia-Lopez G, Diaz NF, Molina-Hernandez A, Osorio-Caballero M, Soriano-Becerril D, Zaga-Clavellina V. An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha) and proMMP-9 in human fetal membranes. ***Placenta***, v. 33, p. 271-277, 2012.

Ford C, Genc MR. Optimized amniotic fluid analysis in patients suspected of intrauterine infection/inflammation. ***Journal of Perinatal Medicine***, v. 40, p. 33-37, 2011.

Geisler JP, Horlander KM, Hiatt AK. Methicillin resistant Staphylococcus aureus as a cause of chorioamnionitis. ***Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology***, v. 25, p. 119-120, 1998.

Genc MR, Ford CE. The clinical use of inflammatory markers during pregnancy. ***Current Opinion in Obstetrics and Gynecology***, v. 22, p. 116-121, 2010.

Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. ***American Journal of Obstetrics and Gynecology***, v. 164, p. 1317-1326, 1991.

Goldenberg RL, Andrews WW, Faye-Petersen OM, Cliver SP, Goepfert AR, Hauth JC. The Alabama preterm birth study: Corticosteroids and neonatal outcomes in 23- to 32-week newborns with various markers of intrauterine infection. ***American Journal of Obstetrics and Gynecology***, v. 195, p. 1020-1024, 2006.

Gomez R, Romero R, Nien JK, Medina L, Carstens M, Kim YM, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gonzalez R. Idiopathic vaginal bleeding during pregnancy as the only clinical manifestation of intrauterine infection. ***The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine***, v. 18, p. 31-37, 2005.

Gomez R, Romero R, Nien JK, Medina L, Carstens M, Kim YM, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Gonzalez R, Iams JD, Rojas I. Antibiotic administration to patients with preterm premature rupture of membranes does not eradicate intra-amniotic infection. ***The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine***, v. 20, p. 167-173, 2007.

Goulart AP, Valle CF, Dal-Pizzol F, Cancelier ACL. Fatores de risco para o desenvolvimento de sepse neonatal precoce em hospital da rede pública do Brasil. ***Revista Brasileira de Terapia Intensiva***, v. 18, p. 148-153, 2006.

Greig PC, Ernest JM, Teot L, Erikson M, Talley R. Amniotic fluid interleukin-6 levels correlate with histologic chorioamnionitis and amniotic fluid cultures in patients in premature labor with intact membranes. ***American Journal of Obstetrics and Gynecology***, v. 169, p. 1035-1044, 1993.

Hanna N, Bonifacio L, Weinberger B, Reddy P, Murphy S, Romero R, Sharma S. Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta. ***American Journal of Reproductive Immunology***, v. 55, p. 19-27, 2006.

Hassan S, Romero R, Hendler I, Gomez R, Khalek N, Espinoza J, Nien JK, Berry SM, Bujold E, Camacho N, Sorokin Y. A sonographic short cervix as the only clinical manifestation of intra-amniotic infection. ***Journal of Perinatal Medicine***, v. 34, p. 13-19, 2006.

Herrmann DMdML, Amaral LMB, Almeida SC. Fatores de risco para o desenvolvimento de sepse neonatal tardia em uma unidade de terapia intensiva. ***Pediatrics***, v. 30, p. 228-236, 2008.

Higgins RD, Saade G, Polin RA, Grobman WA, Buhimschi IA, Watterberg K, Silver RM, Raju TNK. Evaluation and management of women and newborns with a maternal diagnosis of chorioamnionitis. ***Obstetrics and Gynecology***, v. 127, p. 426-436, 2016.

Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner DP, Eschenbach DA. Vaginal indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. ***Obstetrics and Gynecology***, v. 97, p. 211-219, 2001.

Hoang D, Charlagorla P, Salafia C, VanHorn S, Dygulska B, Narula P, Gad A. Histologic chorioamnionitis as a consideration in the management of newborns of febrile mothers. ***The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine***, v. 26, p. 828-832, 2013.

Holst RM, Jacobsson B, Hagberg H, Wennerholm UB. Cervical length in women in preterm labor with intact membranes: Relationship to intra-amniotic inflammation/microbial invasion, cervical inflammation and preterm delivery. ***Ultrasound in Obstetrics and Gynecology***, v. 28, p. 768-774, 2006.

Horvath B, Grasselly M, Bodecs T, Boncz I, Bodis J. Histological chorioamnionitis is associated with cerebral palsy in preterm neonates. ***European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology***, v. 163, p. 160-164, 2012.

Hoskins IA, Zandieh P, Schatz F, Lee C. Amniotic fluid granulocyte colony stimulating factor levels: A rapid marker for diagnosing chorioamnionitis. ***American Journal of Reproductive Immunology***, v. 38, p. 286-288, 1997.

Jackson GL, Rawiki P, Sendelbach D, Manning MD, Engle WD. Hospital course and short-term outcomes of term and late preterm neonates following exposure to prolonged rupture of membranes and/or chorioamnionitis. ***The Pediatric Infectious Disease Journal***, v. 31, p. 89-90, 2012.

Jeon JH, Namgung R, Park MS, Park KI, Lee C. Positive maternal C-reactive protein predicts neonatal sepsis. ***Yonsei Medical Journal***, v. 55, p. 113-117, 2014.

Jessop F, Sebire NJ. Histological chorioamnionitis: Current concepts of diagnosis, classification and clinical significance. *Fetal and Maternal Medicine Review*, v. 22, n. 1, p. 25-44, 2011.

Jones HE, Harris KA, Azizia M, Bank L, Carpenter B, Hartley JC, Klein N, Peebles D. Differing prevalence and diversity of bacterial species in fetal membranes from very preterm and term labor. *PloS ONE*, v. 4, e8205, 2009.

Jung HJ, Park KH, Kim SN, Hong JS, Oh KJ, Kim G, Kwon JY. Non-invasive prediction of intra-amniotic inflammation in women with preterm labor. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, v. 37, p. 82-87, 2011.

Kacerovsky M, Drahosova M, Hornychova H, Pliskova L, Bolehovska R, Forstl M, Tosner J, Lesko D, Andrys C. [Amniotic fluid interleukin 6 levels in preterm premature rupture of membranes]. *Ceska gynekologie / Ceska lekarska spolecnost J. Ev. Purkyne*, v. 74, p. 403-410, 2009.

Kent AL, Dahlstrom JE. Placental assessment: Simple techniques to enhance best practice. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 46, p. 32-37, 2006.

Kim, CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim, YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: Definition, pathologic features and clinical significance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2015.

Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Kim JS. Chronic inflammation of the placenta: Definition, classification, pathogenesis and clinical significance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, p. S53-S69, 2015.

Kim KW, Romero R, Park HS, Park CW, Shim SS, Jun JK, Yoon BH. A rapid matrix metalloproteinase-8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 197, p. e291-295, 2007.

Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC, Mittal P, Erez O, Kusanovic JP, Hassan SS, Kim CJ. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Laboratory Investigation*, v. 89, p. 924-936, 2009.

Kim SM, Romero R, Lee J, Mi Lee S, Park CW, Shin Park J, Yoon BH. The frequency and clinical significance of intra-amniotic inflammation in women with preterm uterine contractility but without cervical change: Do the diagnostic criteria for preterm labor need to be changed? *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v. 25, p. 1212-1221, 2012.

Kirchner L, Helmer H, Heinze G, Wald M, Brunbauer M, Weninger M, Zaknun D. Amnionitis with *Ureaplasma urealyticum* or other microbes leads to increased morbidity and prolonged hospitalization in very low birth weight infants. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, v. 134, p. 44-50, 2007.

Kiser C, Nawab U, McKenna K, Aghai ZH. Role of guidelines on length of therapy in chorioamnionitis and neonatal sepsis. *Pediatrics*, v. 133, p. 992-998, 2014.

Knowles S. The investigation of intrauterine death. *Fetal and Maternal Medicine Review*, v. 3, n. 1, p. 29-46, 1991.

Kraus et al. Atlas of Nontumor Pathology – Placental Pathology. 1st edition. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 2004. 331 p.

Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics*, v. 123, p. 1314-1319, 2009.

Lee JH, Romero R, Kim SM, Chaemsaitong P, Park CW, Park JS, Jun JK, Yoon BY. A new anti-microbial combination prolongs the latency period, reduces acute histologic chorioamnionitis as well as funisitis, and improves neonatal outcomes in preterm PROM. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2015.

Lee SE, Park IS, Romero R, Yoon BH. Amniotic fluid prostaglandin F2 increases even in sterile amniotic fluid and is an independent predictor of impending delivery in preterm premature rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v. 22, p. 880-886, 2009.

Lee SE, Romero R, Jung H, Park CW, Park JS, Yoon BH. The intensity of the fetal inflammatory response in intraamniotic inflammation with and without microbial invasion of the amniotic cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 197, p. e291-296, 2007.

Lee SE, Romero R, Kim CJ, Shim SS, Yoon BH. Funisitis in term pregnancy is associated with microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic inflammation. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v. 19, p. 693-697, 2006.

Lee SE, Romero R, Lee SM, Yoon BH. Amniotic fluid volume in intra-amniotic inflammation with and without culture-proven amniotic fluid infection in preterm premature rupture of membranes. *Journal of Perinatal Medicine*, v. 38, p. 39-44, 2010.

Lee SE, Romero R, Park CW, Jun JK, Yoon BH. The frequency and significance of intraamniotic inflammation in patients with cervical insufficiency. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 198, p. e631-638, 2008.

Lee SY, Leung CW. Histological chorioamnionitis - implication for bacterial colonization, laboratory markers of infection, and early onset sepsis in very-low-birth-weight neonates. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v. 25, p. 364-368, 2012.

Lirussi F, Rakotoniaina Z, Madani S, Goirand F, Breuiller-Fouche M, Leroy MJ, Sagot P, Morrison JJ, Dumas M, Bardou M. ADRB3 adrenergic receptor is a key regulator of human myometrial apoptosis and inflammation during chorioamnionitis. *Biology of Reproduction*, v. 78, p. 497-505, 2008.

Lisonkova S, Sabr Y, Joseph KS. Diagnosis of subclinical amniotic fluid infection prior to rescue cerclage using gram stain and glucose tests: An individual patient meta-analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, v. 36, p. 116-122, 2014.

Locksmith GJ, Clark P, Duff P, Schultz GS. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection. ***Obstetrics and Gynecology***, v. 94, p. 1-6, 1999.

Lu LC, Hsu CD. Elevated amniotic fluid nucleosome levels in women with intra-amniotic infection. ***Obstetrics and Gynecology***, v. 94, p. 7-10, 1999.

Madan I, Romero R, Kusanovic JP, Mittal P, Chaiworapongsa T, Dong Z, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Alpay Savasan Z, Yeo L, Kim CJ, Hassan SS. The frequency and clinical significance of intra-amniotic infection and/or inflammation in women with placenta previa and vaginal bleeding: An unexpected observation. ***Journal of Perinatal Medicine***, v. 38, p. 275-279, 2010.

Mass SB, Brennan JP, Silverman N, van Hoeven KH. Association between a shift in vaginal flora on Papanicolaou smear and acute chorioamnionitis and preterm delivery. ***Diagnostic Cytopathology***, v. 21, p. 7-9, 1999.

Mazor M, Froimovich M, Lazer S, Maymon E, Glezerman M. *Listeria monocytogenes*. The role of transabdominal amniocentesis in febrile patients with preterm labor. ***Archives of Gynecology and Obstetrics***, v. 252, p. 109-112, 1992.

McDonald HM, Chambers HM. Intrauterine infection and spontaneous midgestation abortion: Is the spectrum of microorganisms similar to that in preterm labor? ***Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology***, v. 8, p. 220-227, 2000.

Meireles Lda, Vieira AA, Costa CR. Avaliação do diagnóstico da sepse neonatal: Uso de parâmetros laboratoriais e clínicos como fatores diagnósticos. ***Revista da Escola de Enfermagem da USP***, v. 45, p. 33-39, 2011.

Mikhael M, Brown LS, Rosenfeld CR. Serial neutrophil values facilitate predicting the absence of neonatal early-onset sepsis. ***The Journal of Pediatrics***, v. 164, p. e521-523, 2014.

Miura E, Silveira RdC, Procianoy RS. Sepse neonatal: Diagnóstico e tratamento. ***Jornal de Pediatria***, v. 71, p. s57-s62, 1999.

Monari F, Gabrielli L, Gargano G, Annessi E, Ferrari F, Rivasi F, Facchinetti F. Fetal bacterial infections in antepartum stillbirth: A case series. ***Early Human Development***, v. 89, p. 1049-1054, 2013.

Montuclard B, Guibert M, Ville Y, Frydman R, Fernandez H. [Does asymptomatic amniotic infection in the second trimester really exist?]. ***Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction***, v. 25, p. 186-191, 1996.

Muppala H, Rafi J, Arthur I. Morbidly obese woman unaware of pregnancy until full-term and complicated by intraamniotic sepsis with pseudomonas. ***Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology***, 51689, 2007.

Nessmann-Emmanuelli C, Paul G, Amiel-Tison C, Goujard J, Firtion G, Henrion R, Sureau C. Frottis placentaires en maternité. Intérêt pour le diagnostic précoce des infections bactériennes néonatales par contamination materno-foetale. ***J. Gynecol. Obstet. Biol. Repr.*** 12, 373-380, 1983.

Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, Kusanovic JP, Erez O, Soto E, Richani K, Gomez R, Hassan S, Mazor M, Edwin S, Bahado-Singh R, Romero R. A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 195, p. 1025-1030, 2006.

Novak RW, Platt MS. Significance of placental findings in early-onset group B streptococcal neonatal sepsis. *Clinical Pediatrics*, v. 24, p. 256-258, 1985.

Odibo AO, Rodis JF, Sanders MM, Borgida AF, Wilson M, Egan JF, Campbell WA. Relationship of amniotic fluid markers of intra-amniotic infection with histopathology in cases of preterm labor with intact membranes. *Journal of Perinatology*, v. 19, p. 407-412, 1999.

Oh KJ, Lee KA, Sohn YK, Park CW, Hong JS, Romero R, Yoon BH. Intraamniotic infection with genital mycoplasmas exhibits a more intense inflammatory response than intraamniotic infection with other microorganisms in patients with preterm premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 203, p. e211-218, 2010.

Oh KJ, Lee SE, Jung H, Kim G, Romero R, Yoon BH. Detection of ureaplasmas by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with cervical insufficiency. *Journal of Perinatal Medicine*, v. 38, p. 261-268, 2010.

Oh KJ, Park KH, Kim SN, Jeong EH, Lee SY, Yoon HY. Predictive value of intra-amniotic and serum markers for inflammatory lesions of preterm placenta. *Placenta*, v. 32, p. 732-736, 2011.

Oliveira GM, Camargo FT, Gonçalves EC, Duarte CVN, Guimarães CA. Revisão sistemática da acurácia dos testes diagnósticos: Uma revisão narrativa. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia*, v. 37, n. 2, p. 153-156, 2010.

Oncel MY, Arayici S, Celen S, Kadioglu Simsek G, Oskovi A, Uras N, Oguz SS, Erdeve O, Danisman N, Dilmen U. The association of a cervical length of <25 mm in high-risk pregnancies on neonatal morbidity and mortality in preterm infants. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 287, p. 893-899, 2013.

Pankuch GA, Cherouny PH, Botti JJ, Appelbaum PC. Amniotic fluid leukotaxis assay as an early indicator of chorioamnionitis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 161, p. 802-807, 1989.

Park CW, Moon KC, Park JS, Jun JK, Romero R, Yoon BH. The involvement of human amnion in histologic chorioamnionitis is an indicator that a fetal and an intra-amniotic inflammatory response is more likely and severe: Clinical implications. *Placenta*, v. 30, p. 56-61, 2009.

Park CW, Moon KC, Park JS, Jun JK, Yoon BH. The frequency and clinical significance of intra-uterine infection and inflammation in patients with placenta previa and preterm labor and intact membranes. *Placenta*, v. 30, p. 613-618, 2009.

Park KH, Kim SN, Oh KJ, Lee SY, Jeong EH, Ryu A. Noninvasive prediction of intra-amniotic infection and/or inflammation in preterm premature rupture of membranes. **Reproductive Sciences**, v. 19, p. 658-665, 2012.

Pettker CM, Buhimschi IA, Magloire LK, Sfakianaki AK, Hamar BD, Buhimschi CS. Value of placental microbial evaluation in diagnosing intra-amniotic infection. **Obstetrics and Gynecology**, v. 109, p. 739-749, 2007.

Queiros da Mota V, Prodhom G, Yan P, Hohlfeld P, Greub G, Rouleau C. Correlation between placental bacterial culture results and histological chorioamnionitis: A prospective study on 376 placentas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, p. 243-248, 2013.

Redline RW. The clinical implications of placental diagnoses. **Seminars in Perinatology**, v. 39, p. 2-8, 2014.

Redline RW, Abramowsky, CR. Clinical and pathologic aspects of recurrent placental villitis. **Human Pathology**, v. 16, n. 7, p. 727-731, 1985.

Redline RW, Faye-Petersen O, Heller D, Qureshi F, Savell V, Vogler C. Amniotic infection syndrome: Nosology and reproducibility of placental reaction patterns. **Pediatr Dev Pathol**, v. 6, p. 435-48, 2003.

Roberts DJ. Placental pathology, a survival guide. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 132, p. 641-51, 2008.

Roberts DJ, Celi AC, Riley LE, Onderdonk AB, Boyd TK, Johnson LC, Lieberman E. Acute histologic chorioamnionitis at term: nearly always noninfectious. **PloS ONE**, v. 7, e31819, 2012.

Rode ME, Morgan MA, Ruchelli E, Forouzan I. Candida chorioamnionitis after serial therapeutic amniocenteses: A possible association. **Journal of Perinatology**, v. 20, p. 335-337, 2000.

Romero R, Chaiworapongsa T, Alpay Savasan Z, Xu Y, Hussein Y, Dong Z, Kusanovic JP, Kim CJ, Hassan SS. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in preterm labor with intact membranes and preterm PROM: A study of the alarmin HMGB1. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 24, p. 1444-1455, 2011.

Romero R, Emamian M, Quintero R, Wan M, Hobbins JC, Mazor M, Edberg S. The value and limitations of the Gram stain examination in the diagnosis of intraamniotic infection. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 159, p. 114-119, 1988.

Romero R, Emamian M, Wan M, Yarkoni S, McCormack W, Mazor M, Hobbins JC. The value of the leukocyte esterase test in diagnosing intra-amniotic infection. **American Journal of Perinatology**, v. 5, p. 64-69, 1988.

Romero R, Gonzalez R, Sepulveda W, Brandt F, Ramirez M, Sorokin Y, Mazor M, Treadwell MC, Cotton DB. Infection and labor. VIII. Microbial invasion of the amniotic cavity in patients with suspected cervical incompetence: Prevalence and clinical significance. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 167, p. 1086-1091, 1992.

Romero R, Kadar N, Hobbins JC, Duff GW. Infection and labor: The detection of endotoxin in amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 157, p. 815-819, 1987.

Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Chaemsathong P, Gotsch F, Dong Z, Ahmed AI, Yoon BH, Hassan SS, Kim CJ, Korzeniewski SJ, Yeo L. A novel molecular microbiologic technique for the rapid diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic infection in preterm labor with intact membranes. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 71, p. 330-358, 2014.

Romero R, Miranda J, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Chaemsathong P, Martinez A, Gotsch F, Dong Z, Ahmed AI, Shaman M, Lannaman K, Yoon BH, Hassan SS, Kim CJ, Korzeniewski SJ, Yeo L, Kim YM. Clinical chorioamnionitis at term I: Microbiology of the amniotic cavity using cultivation and molecular techniques. *Journal of Perinatal Medicine*, v. 43, n. 1, p. 19-36, 2015.

Romero R, Reece EA, Duff GW, Coultrip L, Hobbins JC. Prenatal diagnosis of *Candida albicans* chorioamnionitis. *American Journal of Perinatology*, v. 2, p. 121-122, 1985.

Romero R, Scharf K, Mazor M, Emamian M, Hobbins JC, Ryan JL. The clinical value of gas-liquid chromatography in the detection of intra-amniotic microbial invasion. *Obstetrics and Gynecology*, v. 72, p. 44-50, 1988.

Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Diamond MP, Kenney JS, Ramirez M, Fidel PL, Sorokin Y, Cotton D, et al. The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 169, p. 805-816, 1993.

Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Gonzalez R, Diamond MP, Baumann P, Araneda H, Kenney JS, Cotton DB, et al. A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin-6, and gram stain in the detection of microbial invasion in patients with preterm premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 169, p. 839-851, 1993.

Russell, P. Inflammatory lesions of the human placenta. III. The histopathology of villitis of unknown aetiology. *Placenta*, v. 1, p. 227-244, 1980.

Ryu A, Park KH, Oh KJ, Lee SY, Jeong EH, Park JW. Predictive value of combined cervicovaginal cytokines and gestational age at sampling for intra-amniotic infection in preterm premature rupture of membranes. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v. 92, p. 517-524, 2013.

Sarkar S, Bhagat I, DeCristofaro JD, Wiswell TE, Spitzer AR. A study of the role of multiple site blood cultures in the evaluation of neonatal sepsis. *Journal of Perinatology*, v. 26, p. 18-22, 2006.

Shakib J, Buchi K, Smith E, Young PC. Management of newborns born to mothers with chorioamnionitis: Is it time for a kinder, gentler approach? *Academic Pediatrics*, v. 15, p. 340-344, 2015.

Shatrov JG, Birch SC, Lam LT, Quinlivan JA, McIntyre S, Mendz GL. Chorioamnionitis and cerebral palsy: A meta-analysis. ***Obstetrics and Gynecology***, v. 116, p. 387-392, 2010.

Shim SS, Romero R, Jun JK, Moon KC, Kim G, Yoon BH. C-reactive protein concentration in vaginal fluid as a marker for intra-amniotic inflammation/infection in preterm premature rupture of membranes. ***The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine***, v. 18, p. 417-422, 2005.

Spencer MK, Khong TY. Conformity to guidelines for pathologic examination of the placenta. ***Archives of Pathology and Laboratory Medicine***, v. 127, p. 205-207, 2003.

Strunk T, Doherty D, Jacques A, Simmer K, Richmond P, Kohan R, Charles A, Burgner D. Histologic chorioamnionitis is associated with reduced risk of late-onset sepsis in preterm infants. ***Pediatrics***, v. 129, n. 1, p. 1-8, 2012.

Takei H, Ruiz B. Shift in vaginal flora (bacterial vaginosis) and the frequency of chorioamnionitis in a high-risk population. ***Acta Cytologica***, v. 50, p. 410-414, 2006.

Tang Z, Abrahams VM, Mor G, Guller S. Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy. ***Annals of the New York Academy of Sciences***, v. 1221, p. 103-108, 2011.

Taylor JA, Opel DJ. Choriophobia: a 1-act play. ***Pediatrics***, v. 130, p. 342-346, 2012.

Tudela CM, Stewart RD, Roberts SW, Wendel GD, Jr., Stafford IA, McIntire DD, Sheffield JS. Intrapartum evidence of early-onset group B streptococcus. ***Obstetrics and Gynecology***, v. 119, p. 626-629, 2012.

Unluedik E, Alfaidy N, Holloway A, Lye S, Bocking A, Challis J, Gibb W. Expression and regulation of prostaglandin receptors in the human placenta and fetal membranes at term and preterm. ***Reproduction, Fertility and Development***, v. 22, p. 796-807, 2010.

Veille JC. Management of preterm premature rupture of membranes. ***Clinics in Perinatology***, v. 15, p. 851-862, 1988.

Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Heath PT. Neonatal sepsis: An international perspective. ***Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition***, v. 90, p. F220-F224, 2005.

Vigliani M. Chorioamnionitis and intrauterine fetal death after second-trimester amniocentesis. ***Fetal Diagnosis and Therapy***, v. 26, p. 216-218, 2009.

von Chamier M, Allam A, Brown MB, Reinhard MK, Reyes L. Host genetic background impacts disease outcome during intrauterine infection with *Ureaplasma parvum*. ***PloS ONE***, v. 7, p. e44047, 2012.

Wolfs TG, Kallapur SG, Knox CL, Thuijls G, Nitsos I, Polglase GR, Collins JJ, Kroon E, Spierings J, Shroyer NF, Newnham JP, Jobe AH, Kramer BW. Antenatal ureaplasma infection impairs development of the fetal ovine gut in an IL-1-dependent manner. ***Mucosal Immunology***, v. 6, p. 547-556, 2013.

Xie A, Zhang W, Chen M, Wang Y, Wang Y, Zhou Q, Zhu X. Related factors and adverse neonatal outcomes in women with preterm premature rupture of membranes complicated by histologic chorioamnionitis. ***Medical Science Monitor***, v. 21, p. 390-395, 2015.

Young KC, Del Moral T, Claure N, Vanbuskirk S, Bancalari E. The association between early tracheal colonization and bronchopulmonary dysplasia. ***Journal of Perinatology***, v. 25, p. 403-407, 2005.

Zbinden A, Zbinden R, Natalucci G, Zimmermann R, Bucher HU, Krafft A. How useful is routine amniotic fluid and neonatal surface swab microbiology at Caesarean section? ***Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie***, v. 215, p. 205-208, 2011.