

---

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde  
Área de concentração: Clínica Médica**

**Profilaxia Seletiva da Síndrome do  
Desconforto Respiratório do  
Recém-nascido com Surfactante: Uso do Teste  
das Microbolhas Estáveis no  
Aspirado Gástrico**

**Humberto Holmer Fiori**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como pré-requisito para obtenção do grau de doutor

Orientador: Carlos Cezar Fritscher  
Co-orientador: Renato Machado Fiori

**Porto Alegre, novembro de 2004**

---

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

F519p **Fiori, Humberto Holmer**

Profilaxia seletiva da síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido com surfactante: uso do teste de microbolhas estáveis no aspirado gástrico / Humberto Holmer Fiori; orient. Carlos Cezar Fritscher; co-orient. Renato Machado Fiori.. Porto Alegre: PUCRS, 2004.

65f.: il. gráf. tab.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do

Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Médica.

1. SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO DO RECÉM-NASCIDO. 2. SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO DO RECÉM-NASCIDO/prevenção e controle. 3. SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO DO RECÉM-NASCIDO/quimioterapia. 4. RECÉM-NASCIDO. 5. NEONATOLOGIA. 6. SURFACTANTES PULMONARES. 7. MICROBOLHAS. 8. PNEUMONIA ASPIRATIVA. 9. ASPIRAÇÃO DO CONTEÚDO GÁSTRICO. 10. PREMATURO. 11. IDADE GESTACIONAL. 12. ESTUDOS PROSPECTIVOS. I. Fritscher, Carlos Cezar. II. Fiori, Renato Machado. III. Título.

C.D.D. 616.24

C.D.U. 616.24-002:616-053.31(043.2)

*Dedicatória*

*À minha esposa Sheila e aos meus filhos Arthur e Leonardo que colorem  
minha vida.*

---

## AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelo importante apoio na realização do meu curso de doutorado.

Ao Prof. Dr. Carlos Cezar Fritscher, pela sua orientação segura e pela sua disponibilidade.

Ao meu pai, Renato Machado Fiori, meu co-orientador, pelo estímulo e contribuição decisivos na realização desta tese e em outras realizações de minha vida.

Aos colegas e amigos da unidade neonatal do Hospital São Lucas que participaram na implantação e execução da nova rotina.

À equipe de enfermagem do Hospital São Lucas por sua dedicação aos recém-nascidos enfermos.

À unidade neonatal do Hospital Moinhos de Vento pela disponibilização do equipamento necessário para a realização do teste.

Aos profissionais médicos e de enfermagem da unidade neonatal do Hospital Moinhos de Vento pelo interesse e auxílio na assistência aos recém-nascidos

Ao estimado colega Prof. Jorge Hecker Luz pelo incentivo e contribuição nas várias fases da execução deste projeto.

Ao meu estimado irmão Prof. Renato Holmer Fiori pela disponibilidade em revisar o texto.

Ao meu irmão Dr. Alexandre Fiori pelo companheirismo nos “projetos microbolhas” e pela solidariedade.

À minha querida mãe pelo carinho e dedicação a mim e aos meus filhos, permitindo-me maior dedicação às minhas pesquisas.

Às secretárias Ana e Carla, sempre dispostas à colaborar.

---

---

## SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	7
2.1. História da SDR.....	8
2.2 Epidemiologia da SDR .....	9
2.3 Fisiopatologia da SDR.....	10
2.4. Diagnóstico clínico da SDR.....	12
2.5. Terapia da SDR com surfactante exógeno.....	13
2.6. Profilaxia versus terapêutica com surfactante .....	15
2.7. Avaliação da maturidade pulmonar e terapia com surfactante .....	22
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo geral .....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. PACIENTES E MÉTODOS .....	34
4.1. Profilaxia baseada no TME .....	35
4.2. Critérios de inclusão e exclusão .....	36

---

---

4.3. Realização do teste das microbolhas estáveis .....	36
4.4. Comparação com resultados clínicos anteriores .....	37
4.5. Cálculo da amostra.....	38
4.6. Análise estatística.....	38
4.7. Aspectos éticos .....	38
5. RESULTADOS .....	40
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÕES.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
9. ANEXOS.....	66
10. APÊNDICE .....	101

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$\mu\text{b}$	Microbolhas estáveis
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	Relação entre a pressão parcial de oxigênio e a fração inspirada de oxigênio
RN	Recém-nascido
SDR	Síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido
TME	Teste das microbolhas estáveis
UTIN	Unidade de tratamento intensivo neonatal

---



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Características dos 98 recém-nascidos tratados conforme a rotina de profilaxia seletiva com surfactante baseada no TME.....42
- Tabela 2. Características e variáveis de desfecho dos pacientes do período de uso de surfactante profilático com base no teste das microbolhas estáveis e do período do controle histórico em que era utilizada a técnica de resgate.....46
-

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática do fenômeno do clique.....25
- Figura 2. Imagem digitalizada mostrando a visão microscópica de parte da área graduada da câmara de contagem.....26
- Figura 3. Distribuição dos pacientes de acordo com o resultado da contagem de microbolhas e administração de surfactante profilático ou tardio..... 43
- Figura 4. Proporção de pacientes que receberam surfactante de acordo com a idade gestacional.....44
- Figura 5. Proporção de recém-nascidos recebendo surfactante de acordo com o suporte ventilatório requerido em sala de parto.....45
-

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o teste das microbolhas estáveis (TME) como método para selecionar pacientes para a profilaxia da síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido (SDR) com surfactante exógeno.

**Pacientes e métodos:** Secreção gástrica foi obtida logo após o nascimento de prematuros de 23 a 31 semanas de gestação. Recém-nascidos com  $<25$  microbolhas ( $\mu\text{b}/\text{mm}^2$ ) receberam surfactante profilático (Curosurf<sup>®</sup> 200 mg/kg). Em recém-nascidos com contagem  $\geq 25\mu\text{b}/\text{mm}^2$ , surfactante foi administrado posteriormente nos casos em que o diagnóstico clínico-radiológico foi firmado (terapia de resgate).

**Resultados:** Os 98 bebês estudados tiveram uma idade gestacional média de  $28,4\pm 2,1$  semanas. Cinquenta e quatro (55%) tiveram uma contagem baixa de microbolhas e receberam surfactante profilático imediatamente. Dos 44 pacientes com contagem superior a  $25\mu\text{b}/\text{mm}^2$ , somente 3 necessitaram terapia de resgate (valor preditivo negativo de 93%; intervalo de confiança 95%: 81.3-98.6%). A mediana do intervalo entre o nascimento e a administração de surfactante profilático e seu percentil interquartil foi de 20 (17-27) minutos. Surfactante foi usado em 23 de 28 (82%) bebês com menos de 28 semanas de idade gestacional e em 34 de 70 (49%) bebês entre 28 e 31 semanas.

**Conclusões:** O TME é útil para determinar a profilaxia com surfactante ( $<30$  minutos de vida). Esta abordagem provavelmente reduz custos e um número significativo de intervenções desnecessárias, se comparada à profilaxia indiscriminada. A vantagem é mais evidente nos pacientes entre 28 e 31 semanas ao nascer.

---

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the stable microbubble test (SMT) as a method to select candidates for surfactant prophylaxis for respiratory distress syndrome of the newborn (RDS).

**Study design:** Gastric secretions were collected immediately after birth from infants born at 23 to 31 weeks of gestation. Newborns with  $<25$  microbubbles ( $\mu\text{b}$ )/ $\text{mm}^2$  received prophylactic surfactant (Curosurf<sup>®</sup> 200 mg/kg). In newborns with  $\geq 25$   $\mu\text{b}/\text{mm}^2$  surfactant was given only after clinical and radiological confirmation of RDS (rescue therapy).

**Results:** The 98 infants studied had a mean gestational age of  $28.4 \pm 2.1$  weeks. Fifty-four (55%) had a low  $\mu\text{b}$  count and received prophylactic surfactant. Out of 44 infants with a high  $\mu\text{b}$  count three required rescue therapy (negative predictive value 93%; confidence interval 81.3-98.6%). The median interval and interquartile range between surfactant administration and birth in the prophylaxis group was 20 (17-27) minutes. Surfactant was used in 23 of 28 (82%) infants with less than 28 weeks of gestation and in 34 of 70 (49%) infants between 28 and 31 weeks.

**Conclusions:** The SMT is useful to determine surfactant prophylaxis ( $<30$  minutes after birth). This approach probably reduces costs and the number of unnecessary interventions. The advantage was more evident for patients between 28 and 31 weeks.

---

# **1. INTRODUÇÃO**

---

A síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido (SDR) ou, como era mais conhecida no passado, a doença da membrana hialina ainda é uma importante causa de morbidade e mortalidade de recém-nascidos, afetando cerca da metade dos recém-nascidos de muito baixo peso. Houve uma grande evolução do conhecimento sobre a síndrome nas últimas décadas, que culminou no desenvolvimento do surfactante pulmonar exógeno, uma terapia extremamente eficaz e que reduziu significativamente a morbi-mortalidade associada à doença.

A precocidade da administração de surfactante exógeno, sob a forma de profilaxia, mostrou-se importante para a obtenção dos melhores resultados clínicos, uma vez que lesão pulmonar e redução da eficácia do tratamento posterior com surfactante podem ocorrer com a demora na sua administração. A dependência do estabelecimento do diagnóstico clínico-radiológico tende a provocar atraso na instituição da terapia, pois, além da demora para obtenção do filme de tórax, os sinais radiológicos característicos, freqüentemente, tornam-se evidentes tardiamente no curso da síndrome.

Na presença de dificuldade na determinação, logo após o nascimento, de quais pacientes desenvolverão SDR e diante de evidências de melhores resultados com a profilaxia do que com o tratamento da doença estabelecida, generalizou-se o uso indiscriminado de surfactante em grupos de pacientes muito imaturos, com risco elevado de desenvolver a doença. Isto, entretanto, implica intubação endotraqueal e administração de surfactante, uma droga de alto custo, a um grande número de crianças que não tem deficiência de surfactante e, portanto, não necessita esta intervenção.

---

Estas observações levaram-nos, bem como a outros pesquisadores, a buscar testes de maturidade pulmonar que pudessem ser rapidamente realizados após o nascimento em recém-nascidos muito imaturos, identificando quais pacientes desenvolveriam a síndrome e permitindo que somente estes recebessem a profilaxia com surfactante. Os testes biofísicos pareciam ser os mais apropriados a estes propósitos, pois os bioquímicos são mais complexos e requerem um tempo maior para sua realização. O aspirado gástrico parecia um fluido adequado por ser facilmente obtido na sala de parto e possivelmente conter surfactante proveniente dos pulmões do feto.

Em 2003, publicamos no *Journal of Perinatal Medicine* o primeiro estudo comparando dois testes biofísicos realizados no aspirado gástrico: o teste das microbolhas estáveis (TME) e o teste do clique (anexo). O estudo mostrou que o TME era mais acurado e de mais fácil realização. O teste é rápido e praticamente sem custos.

Logo após, decidimos tentar um método computadorizado de análise das bolhas, descrito anteriormente por Berggren e colaboradores, que poderia evitar a influência subjetiva do observador. Em contato com o Diretor do Departamento de Patologia Perinatal do Instituto Karolinska de Estocolmo, Professor Bengt Robertson, foi-nos disponibilizado o equipamento e o *software* para a realização deste estudo. Levamos amostras congeladas de aspirados gástricos para Estocolmo.

Os resultados, publicados na revista escandinava *Acta Paediatrica*, em 2001, confirmaram a acurácia do TME para o diagnóstico de SDR (anexo). Porém, a comparação posterior com os estudos avaliando o TME realizado de

---

forma convencional, levou-nos a concluir que há pouca vantagem na utilização do método computadorizado. Este último método exige a disponibilidade de equipamento mais sofisticado e *software* específico, com custos significativos. Os resultados em termos de acurácia parecem ser semelhantes nos dois métodos, e consideramos que o fato do método computadorizado ser menos dependente do operador não é suficiente para determinar a escolha em relação ao método visual.

Adquirimos grande familiaridade com o TME durante a realização de vários estudos que foram motivo de várias dissertações do Curso de Mestrado em Pediatria da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como os estudos sobre inter e intravariabilidade e o efeito do congelamento sobre o TME (2002) e inibição e restauração da função surfactante avaliados pelo TME (2002), apresentados em congressos internacionais mas ainda não publicados, o efeito do polietilenoglicol e do dextran sobre o TME (*Pediatric Research*, 2004), a função surfactante em quadros respiratórios de bebês a termo e próximo ao termo, publicado no *European Journal of Pediatrics* (2004) e a utilidade do teste em secreção traqueal para o diagnóstico da SDR (*Biology of the Neonate*, em impressão).

Através do conhecimento adquirido com o uso do TME, ficou evidente a sua potencial utilidade para a seleção de pacientes prematuros para a profilaxia com surfactante. Inicialmente, cogitou-se da realização de um ensaio clínico randomizado para a comparação com as clássicas abordagens (terapia de resgate e profilaxia indiscriminada). Entretanto, este tipo de estudo envolve altos custos em sua realização e não nos parece ser justificado exceto se estritamente

---



necessário para a avaliação de uma terapêutica. No caso do presente estudo, consideramos que não havia motivo para a utilização deste desenho. Há evidências suficientes, originadas dos ensaios clínicos randomizados, para se afirmar que a profilaxia indiscriminada em pacientes com menos de 30 a 32 semanas apresenta resultado clínico superior à abordagem de resgate e que, portanto, esta não é uma questão que entre em consideração. As perguntas que permanecem sem definição são as seguintes: é possível se obter na prática clínica o resultado do TME em tempo para se administrar surfactante profilático? O teste permite a identificação de uma proporção significativa de pacientes que não necessitam surfactante? O teste apresenta acurácia suficiente em um contexto clínico para justificar seu uso? Estas possibilidades nunca foram testadas na prática clínica.

Buscando respostas para estas questões, foi formulada a hipótese de que o teste seria viável em um ambiente clínico e que poderia rapidamente, logo após o nascimento, discriminar pacientes que necessitam ou não profilaxia com surfactante. Assim, optou-se pelo estabelecimento de uma nova rotina para administração de surfactante, com a avaliação prospectiva de seus resultados. Esta abordagem foi considerada ideal em um contexto em que qualquer modalidade de administração de surfactante, profilática ou terapêutica (de resgate), que resultasse desta rotina, poderia ser enquadrada, no atual momento, como uma conduta adequada para a faixa de prematuros com menos de 32 semanas de gestação. Os pacientes com teste positivo para SDR (pulmão imaturo) receberiam surfactante como na abordagem de profilaxia indiscriminada enquanto os eventuais pacientes com teste sugerindo maturidade pulmonar, e

---

que viessem a necessitar surfactante, receberiam-no o mais cedo possível, assim que a doença fosse diagnosticada, como na terapia de resgate.

A presente tese constitui-se de três estudos interligados, sendo que dois já foram publicados (anexos). O terceiro estudo, que trata da aplicação na prática clínica do conhecimento gerado pelos dois estudos anteriores, é apresentado de forma mais detalhada em português. A versão em língua inglesa deste último estudo, preparada para ser enviada a um periódico internacional, encontra-se também anexada.

---

---

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

---

## 2.1. História da SDR

A primeira descrição da presença de membranas hialinas em pulmões de prematuros data de 1903. Imaginava-se, naquele período, que a etiologia seria a aspiração de vérnix.<sup>1</sup>

O conhecimento do papel fundamental do surfactante pulmonar na fisiologia respiratória começou com os estudos de Neergaard, em 1929.<sup>2</sup> Ele estudou pulmões retirados de cobaias e mediu as curvas pressão-volume, enchendo-os com ar e com líquido. O uso do líquido reduziu a pressão necessária para obter o mesmo volume pulmonar em relação ao uso de ar. Isto levou Neergaard a deduzir que a tensão superficial era a maior responsável entre as forças envolvidas no esvaziamento pulmonar. Infelizmente, sua publicação não foi muito difundida, e ele não persistiu com as investigações neste campo.

Em 1947, sem o conhecimento do estudo de Neergaard, o patologista Peter Gruenwald, de Nova Iorque, repetiu seu experimento.<sup>3</sup>

Em 1955, Richard Pattle, estudando os efeitos de armas químicas sobre os pulmões, na Inglaterra, observou que a espuma oriunda do edema pulmonar causado por gases tóxicos apresentava vida muito mais longa do que a formada por outros tecidos e, até mesmo, mais do que a formada por detergentes comuns.<sup>4</sup> Ele também verificou que as bolhas originárias dos pulmões de fetos de porcos, retirados prematuramente, não apresentavam estabilidade como as de pulmões de animais recém-nascidos não prematuros.<sup>5</sup> Ele sugeriu que uma das dificuldades que o prematuro tinha que enfrentar após o nascimento era a

---

força de superfície aumentada no seu pulmão imaturo em relação ao pulmão maduro.

John Clements, medindo a tensão superficial de modo mais sofisticado, mostrou que os filmes da superfície pulmonar tinham sua tensão superficial reduzida de 45 para menos de 10 dinas/cm<sup>2</sup> à medida em que a superfície era comprimida a 30% de sua área.<sup>6</sup> Avery acompanhou os trabalhos de Clements e passou a explorar as razões porque os pulmões de bebês que morriam com membranas hialinas nos pulmões nunca apresentavam espuma em suas vias aéreas. Em 1959, Avery e Mead publicaram um estudo clássico mostrando que a doença da membrana hialina era provocada pela deficiência de surfactante.<sup>7</sup> Posteriormente, a doença passou a ser conhecida como síndrome de angústia respiratória ou desconforto respiratório do recém-nascido.

## 2.2 Epidemiologia da SDR

A incidência de SDR é inversamente proporcional à idade gestacional e ao peso de nascimento. Ocorre em aproximadamente 1% de todos os nascimentos e reduz-se para próximo a zero ao redor das 39 semanas.<sup>8</sup>

Recém-nascidos muito imaturos têm um risco muito elevado de desenvolverem SDR. Em prematuros de muito baixo peso (menos de 1500g), Hack et al. encontraram uma incidência de 56%, tendo variado de um máximo de 86% no subgrupo de peso de 501 a 750g até 27% no subgrupo de 1250 a 1500g.<sup>9</sup>

Vários fatores alteram o risco de ocorrência de SDR além da prematuridade. Exemplos de condições que aumentam o risco da síndrome

---

---

incluem diabetes materna, sexo masculino, cesariana sem trabalho de parto, etc.<sup>10</sup> Outros fatores tendem a reduzir o risco para SDR; contudo, o principal fator protetor é o uso de corticosteróides antes do nascimento. A proporção de gestantes tratadas com betametasona ou, alternativamente, com dexametasona tem aumentado muito nos últimos anos, resultando em uma redução da prevalência e/ou gravidade da SDR.<sup>11</sup>

Um fator que dificulta estudos atuais sobre a ocorrência de SDR é o uso de surfactante antes do estabelecimento do diagnóstico da síndrome. Além disto, os critérios diagnósticos tornaram-se muito mais liberais e, obviamente, mais imprecisos, em prematuros muito pequenos. Isto ocorreu devido às vantagens do uso precoce de surfactante. A avaliação do impacto da SDR na mortalidade perinatal também se tornou muito difícil, uma vez que concorrem diversas outras patologias associadas à prematuridade.

### **2.3 Fisiopatologia da SDR**

A combinação da deficiência de surfactante pulmonar com um pulmão estruturalmente imaturo e uma caixa torácica complacente desencadeia um processo que evolui, após o nascimento, para o quadro clínico conhecido como SDR. O surfactante pulmonar é fundamental na redução da tensão superficial nos alvéolos e nas vias aéreas terminais. A tensão superficial alveolar elevada provoca atelectasia progressiva e redução da complacência pulmonar.<sup>12</sup> A capacidade residual funcional vai se reduzindo à medida que a doença progride.<sup>13</sup> Ocorre uma piora progressiva da relação entre ventilação e perfusão, resultando em hipoxemia e acidose. Também pode ocorrer aumento da

---

---

resistência vascular pulmonar, levando à síndrome da hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido. Como consequência destas alterações, produz-se lesão do epitélio alveolar e dos bronquíolos terminais, com perda de fluidos com fibrina e outras proteínas para dentro das vias aéreas, que terminam por formar depósitos proteináceos conhecidos como membranas hialinas.

A produção de surfactante pode ser afetada pela presença de acidose, hipoxemia e outras alterações que foram produzidas inicialmente pela deficiência de surfactante. A função do surfactante também pode ser afetada pela presença das substâncias extravasadas para o alvéolo de modo a piorar ainda mais o quadro clínico. Deste modo, estabelece-se um círculo vicioso.

Obviamente, as terapias instituídas influem na evolução da doença, provocando lesões secundárias à ventilação mecânica e às concentrações elevadas de oxigênio utilizadas. A terapia com surfactante exógeno altera radicalmente a história natural da doença, sendo que a evolução clássica desta raramente é vista nos dias atuais.

Os achados anátomo-patológicos classicamente descritos em prematuros que sucumbiam com a doença mostravam atelectasia difusa, alguns poucos alvéolos dilatados e presença de membranas eosinofílicas. Edema e hemorragia são achados comuns, e a lesão epitelial é evidente nos bronquíolos que se encontram distendidos.<sup>14</sup> As membranas eosinofílicas são a razão porque a SDR costumava ser chamada de doença da membrana hialina. Entretanto, este achado não é exclusivo e nem é a causa da SDR. Por esta razão, esta denominação tendeu a ser abandonada com o passar do tempo.

---

## 2.4. Diagnóstico clínico da SDR

O quadro clínico clássico da SDR inclui a presença de dificuldade respiratória progressiva durante os primeiros 2 ou 3 dias de vida em um recém-nascido pré-termo apresentando sinais clínicos de taquipnéia, batimento de asas de nariz, retrações (esternal, subcostais e intercostais), gemido expiratório e cianose em ar ambiente. A maior parte destes sinais clínicos, porém, é absolutamente inespecífica, podendo estar presente em outras entidades clínicas dos primeiros dias de vida. No paciente muito prematuro, freqüentemente, há dificuldade em estabelecer a ventilação espontânea efetiva logo ao nascer e há a necessidade de intubação e ventilação com pressão positiva. Portanto, para este subgrupo de pacientes, os sinais clássicos da doença comumente não são identificáveis.

A radiografia torácica, tipicamente, caracteriza-se por um infiltrado retículo-granular difuso (que é a expressão das micro-atelectasias difusas) e broncogramas aéreos. Os pulmões apresentam-se pouco insuflados, exceto em prematuros maiores que inicialmente conseguem manter um bom volume pulmonar até que a doença esteja bastante avançada. A utilização de ventilação com pressão positiva também dificulta a avaliação dos sinais radiológicos. Em quadros mais graves, a radiografia torácica pode apresentar-se com opacificação difusa total (pulmão branco) apenas contrastando com a imagem dos brônquios. Muitas vezes, os achados radiológicos característicos aparecem ou tornam-se mais claros apenas com a progressão da doença, pelo aumento da atelectasia alveolar.

---



Algumas condições clínicas podem se apresentar com uma imagem radiológica semelhante, como é o caso da pneumonia por *Streptococcus agalactiae*<sup>15</sup> ou pela *Listeria monocytogenes*.<sup>16</sup> O infiltrado presente na SDR também pode ser confundido com o padrão granular que é encontrado na presença de líquido intra-alveolar.

Apesar das dificuldades para o diagnóstico clínico da SDR, a presença de dificuldade respiratória em conjunto com uma imagem radiológica compatível em um recém-nascido prematuro ainda são as bases do diagnóstico, uma vez que testes laboratoriais que avaliam a maturidade do sistema surfactante pulmonar não são rotineiramente utilizados por razões que serão discutidas posteriormente.

## 2.5. Terapia da SDR com surfactante exógeno

Após ter sido provado que recém-nascidos com SDR eram deficientes de surfactante e após a descoberta da fosfatidilcolina dissaturada (FCDS) como sendo o principal componente deste,<sup>17</sup> iniciaram-se tentativas de nebulização desta substância. O resultado destes estudos não foi encorajador.<sup>18,19</sup> O principal estudo avaliando o efeito da FCDS em aerossol falhou em mostrar benefício e até mesmo sugeriu possível efeito negativo.<sup>20</sup>

Após 1972, Enhorning e Robertson iniciaram a trabalhar com extratos de surfactante retirados de coelhos adultos e administrados a filhotes prematuros, mostrando melhora significativa da mecânica pulmonar.<sup>21,22</sup>

Em 1980, Fujiwara et al. relataram, pela primeira vez, o uso de extrato de pulmão bovino em uma série de 10 pacientes com SDR grave.<sup>23</sup> A seguir, testes

---

---

com diferentes preparados passaram a ser realizados, demonstrando melhora da troca gasosa e da mecânica pulmonar, melhora da sobrevivência e redução das complicações da doença.<sup>24-26</sup>

A terapia com surfactante exógeno passou a ser utilizada amplamente de modo experimental. Um número superior a 30 estudos randomizados, de boa qualidade, foi publicado entre 1985 e 1992. Estes estudos compararam o uso profilático ou terapêutico do surfactante, em relação a controles, e foram agrupados através de cuidadosa metanálise.<sup>27,28</sup> Os resultados tornaram óbvios os efeitos benéficos desta terapêutica. Além da mortalidade, a incidência de escape de ar (pneumotórax e enfisema intersticial pulmonar) é marcadamente reduzida. A ocorrência de doença pulmonar crônica nos sobreviventes, na maioria dos estudos, não se reduziu no grupo de pacientes tratados com surfactante. Entretanto, isto provavelmente se explica pelo aumento, nos grupos tratados, da sobrevivência de pacientes muito imaturos, que apresentam maior risco de displasia broncopulmonar.<sup>29</sup> Outros efeitos como redução da hemorragia intra-ventricular<sup>30</sup> e *ductus arteriosus* patente<sup>31</sup> foram sugeridos por estudos isolados. Contudo, estes efeitos não podem ser claramente atribuídos ao surfactante, quando se estuda o conjunto de publicações.

A partir do início dos anos 90, vários preparados comerciais tornaram-se disponíveis para uso clínico. A administração de surfactante em SDR tornou-se rotina nas unidades neonatais, inclusive no Brasil.

---

## 2.6. Profilaxia versus terapêutica com surfactante

Duas abordagens têm sido propostas para a administração de surfactante pulmonar exógeno a recém-nascidos pré-termo: a abordagem terapêutica (ou terapia de resgate), em que o surfactante é administrado diante do diagnóstico estabelecido de SDR, e a abordagem profilática, em que o surfactante é administrado aos recém-nascidos com risco muito elevado de desenvolverem a síndrome, ou seja, aos muito imaturos.

O fato de que o resultado clínico do uso de surfactante pode ser afetado pelo momento em que a terapia é administrada determinou que esta variável passasse a ser o objeto dos principais estudos randomizados realizados após 1992.

A terapia de resgate pressupõe o diagnóstico prévio de SDR. O diagnóstico é, na prática, feito pela presença de sinais clínicos, evolução e radiografia torácica compatíveis com a síndrome. Como nesta síndrome ocorre uma atelectasia progressiva, muitas vezes leva algum tempo para que o diagnóstico se torne evidente. Com grande frequência, a radiografia torna-se característica apenas quando a doença já está bastante avançada. Quando o diagnóstico clínico é estabelecido, o surfactante é administrado.

A principal vantagem desta modalidade terapêutica é a de que praticamente só os recém-nascidos que realmente necessitam de surfactante são tratados. Obviamente, quanto mais liberais os critérios para estabelecer o diagnóstico, mais diagnósticos incorretos serão firmados, e, portanto, mais tratamentos desnecessários administrados. A modalidade terapêutica é a mais

---

---

utilizada para prematuros mais próximos ao termo, grupo em que o risco de ocorrência da SDR é mais baixo e a morte um desfecho incomum.

A outra forma de administração de surfactante é a profilática. Esta forma teve origem em estudos experimentais em animais, que mostraram que pulmões imaturos, deficientes de surfactante, apresentam lesão pulmonar secundária à ventilação muito precocemente.<sup>32</sup> Além disto, o surfactante distribui-se mais homogeneamente quando instilado na via aérea imediatamente após o nascimento, quando os pulmões ainda estão cheios de líquido.<sup>33</sup>

A profilaxia tem sido utilizada imediatamente após o nascimento, antes da primeira ventilação ou após estabilização inicial, já com alguns minutos de vida. A aplicação imediata tem como objetivo prevenir a lesão provocada pela ventilação com pressão positiva sobre o pulmão deficiente de surfactante. Entretanto, na prática, tem sido sugerido que a profilaxia imediata não apresenta benefício clínico detectável em relação à profilaxia utilizada dentro de um período de 30 minutos do nascimento.<sup>24,34-37</sup> O uso imediato do surfactante pode prejudicar a estabilização inicial do paciente e aumentar a chance de sua administração com o tubo mal posicionado.

A alta incidência de deficiência de surfactante em recém-nascidos muito imaturos, por exemplo, com menos de 30 semanas, é considerada por alguns uma boa justificativa para uma abordagem profilática de uso de surfactante. Nesta modalidade preventiva de uso, no entanto, muitos pacientes são tratados desnecessariamente, sendo submetidos a um procedimento invasivo e caro, com riscos potenciais e, certamente, algum desconforto.

---

---

Vários ensaios clínicos multicêntricos randomizados compararam as abordagens profilática e terapêutica em prematuros com menos de 30 semanas (7 estudos) e com menos de 32 semanas (1 estudo).<sup>38-45</sup>

Kendig et al. publicaram em 1991 um estudo randomizado comparando o uso de surfactante exógeno na forma de profilaxia imediata ou tratamento após o diagnóstico (tratamento de “resgate”). Um total de 479 prematuros com menos de 30 semanas foi incluído no estudo. O desfecho principal do estudo foi a taxa de sobrevivência, que foi maior no grupo de pacientes que recebeu profilaxia (88%) do que no grupo de “resgate” (80%). Este efeito deveu-se, principalmente, à diferença de desfecho no subgrupo de pacientes com 26 semanas ou menos, que foram os mais beneficiados pela profilaxia.<sup>42</sup>

Dunn et al fizeram um estudo comparativo entre profilaxia e tratamento (nas primeiras 6 horas de vida) em 182 recém-nascidos com menos de 30 semanas de gestação. Foram excluídos recém-nascidos com testes que indicassem maturidade pulmonar. Foi usado um surfactante derivado de lavado de pulmão bovino. Todos os recém-nascidos de ambos os grupos poderiam receber até 3 doses adicionais de surfactante. O desfecho, a curto prazo, foi similar em ambos os grupos, sendo a única diferença uma maior frequência de doença pulmonar crônica no grupo profilático.<sup>39</sup>

Merritt et al. compararam a profilaxia com o tratamento com surfactante humano em 446 recém-nascidos pré-termo. A média de peso destes recém-nascidos era de 1000 gramas, e a média de idade gestacional, de 27 para 28 semanas. Aqueles sorteados para receber surfactante tiveram a instilação realizada em média com 3 horas e 40 minutos de vida. O surfactante era

---

administrado se a relação lecitina/esfingomielina fosse igual ou menor do que 2, se não houvesse traços de fosfatidilglicerol no líquido amniótico ou no aspirado inicial das vias aéreas e se os recém-nascidos necessitassem uma  $FiO_2 > 0,50$  e uma pressão média nas vias aéreas igual ou maior do que  $7\text{cmH}_2\text{O}$  duas a doze horas após o nascimento. Até 4 doses podiam ser administradas em ambos os grupos. Os autores não encontraram diferenças significativas no desfecho.<sup>43</sup>

Egberts et al. realizaram estudo comparativo em 147 recém-nascidos pré-termo entre 26 e 29 semanas de gestação: 75 receberam  $200\text{mg/kg}$  intratraqueal de surfactante porcino dentro dos 10 primeiros minutos de vida, e 72 receberam apenas ar, também via tubo endotraqueal. Após 6 a 24 horas de vida, ambos os grupos receberam surfactante quando houve necessidade de ventilação mecânica com uma  $FiO_2$  igual ou maior que 0,60. Com 6 horas de vida, o grupo profilático tinha uma relação  $tcPO_2/FiO_2$  mais elevada e um escore radiológico melhor. Um maior percentual de recém-nascidos do grupo profilático tinha um quadro clínico menos grave. Os autores concluíram que a profilaxia foi mais efetiva, sobretudo nos recém-nascidos com menos de 28 semanas de gestação, do sexo masculino, e cujas mães não tinham recebido corticóide pré-natal.<sup>40</sup>

Kattwinkel et al. randomizaram 1398 recém-nascidos de 29 a 32 semanas de idade gestacional para receberem surfactante derivado de extrato de pulmão de terneiro (CLSE), ou imediatamente ao nascer ou após desenvolverem evidências de SDR. Após exclusões, o número de pacientes ficou em 1248. A profilaxia foi associada com um percentual menor de doença (7% contra 12%), menor necessidade de retratamento (5% contra 9%), menor necessidade de ventilação mecânica ou oxigênio suplementar nos primeiros 4 dias e, finalmente,

---

menor número de mortes ou menor necessidade de oxigênio suplementar aos 28 dias de vida. O grupo que recebeu surfactante como tratamento recebeu a primeira dose em média com 1,5 horas de vida. As maiores diferenças ocorreram nos recém-nascidos de menos de 31 semanas de idade gestacional ou menos de 1500 gramas de peso.<sup>41</sup>

Walti et al. compararam a profilaxia e o tratamento com surfactante porcino em 256 recém-nascidos pré-termo de 25 a 31 semanas de gestação. O uso profilático reduziu a necessidade de oxigênio e de suporte ventilatório, diminuiu a incidência de hemorragia periventricular grave (3% contra 16%) e de retinopatia da prematuridade. Entretanto, os autores não observaram um aumento estatisticamente significativo da sobrevivência sem displasia broncopulmonar (60% contra 46%).<sup>44</sup>

Bevilacqua et al., em 1996, conduziram estudo multicêntrico para avaliar a eficácia do Curosurf<sup>®</sup> administrado ao nascimento para prevenir o desenvolvimento da SDR. Duzentos e oitenta e sete recém-nascidos com idade gestacional de 24-30 semanas foram aleatoriamente selecionados para receber profilaxia com Curosurf<sup>®</sup> (200mg/kg) na sala de parto ou não. Ambos os grupos poderiam receber terapia de resgate com surfactante (200 mg/kg) se desenvolvessem sinais clínicos de SDR e necessitassem ventilação mecânica. Foi observada uma redução de 32% na incidência de SDR graus 3 e 4 no grupo profilático, assim como uma redução na concentração máxima de oxigênio (57% contra 66%), uma redução na incidência de enfisema intersticial pulmonar (7% contra 14%) e uma redução na mortalidade (21% contra 35%).<sup>38</sup>

---

---

Outro estudo randomizado multicêntrico, incluindo bebês com idade gestacional de 26-30 semanas, em unidades da Itália, Bulgária e Romênia, também comparou a profilaxia na sala de parto (200mg/kg de surfactante porcino) com a assistência de rotina (sem o uso de surfactante na sala de parto). Este estudo falhou em demonstrar diferenças significativas nas variáveis de desfecho clínico. Um número inferior ao planejado foi incluído nesse estudo por dificuldades técnicas.<sup>45</sup>

Estes estudos descritos acima foram incluídos em uma metanálise realizada por Sol e Morley.<sup>46</sup> Os resultados mostraram uma redução da incidência de pneumotórax, de enfisema intersticial pulmonar, da mortalidade e da combinação de mortes e displasia broncopulmonar, não havendo complicações relatadas na aplicação da profilaxia.

Apesar destes resultados evidenciarem as vantagens do uso do surfactante profilático, comparado à terapia de resgate, esta última ainda é muito utilizada e aceita no presente momento. Os custos elevados da medicação e a argumentação de que o uso terapêutico muito precoce possivelmente também leva a resultados muito bons têm sido utilizados para justificar a terapia de resgate.

Outro aspecto importante que deve ser salientado é que, na maioria dos estudos incluídos na metanálise, a utilização de corticóide antenatal foi baixa para os padrões atuais, sendo possível que o seu uso mais freqüente viesse a reduzir o benefício da administração profilática de surfactante.

Parece claro que, se fosse possível identificar os recém-nascidos que desenvolveriam SDR logo ao nascer, estes se beneficiariam das vantagens do

---



---

uso imediato de surfactante (profilaxia). A disponibilidade de um diagnóstico preciso, anteriormente ou imediatamente após o nascimento, permitiria o uso mais racional do surfactante. Entretanto, testes com acurácia de 100% para este fim não são disponíveis.

Uma alternativa desejável, em prematuros com menos de 30 ou 32 semanas, seria a utilização de um teste de execução rápida com sensibilidade próxima a 100%, de modo que nenhum (ou quase nenhum) paciente que fatalmente evoluísse para quadro de SDR deixasse de receber surfactante logo após o nascimento. Se este teste tivesse uma especificidade razoável, permitiria reduzir significativamente o número de pacientes “iatrogenicamente” tratados com surfactante profilático.

A abordagem terapêutica em um grupo de pacientes com menos de 30-32 semanas, em que há uma alta prevalência da doença, claramente não faria nenhum sentido se um teste nos permitisse identificar corretamente a SDR na grande maioria dos pacientes. Provavelmente, o principal motivo para o uso da abordagem terapêutica, em vez da profilaxia indiscriminada, seja a redução de custos com a medicação. Na hipótese do uso de um teste que permitisse a identificação de um número significativo de pacientes maduros, os custos com a medicação seriam reduzidos, preservando-se as vantagens da profilaxia. Também deve-se levar em conta que os gastos com o surfactante não compõe a totalidade dos gastos com os recém-nascidos prematuros com SDR e que a utilização de profilaxia pode implicar redução de outros gastos conseqüentes da menor gravidade dos bebês tratados desta forma.

---

## 2.7. Avaliação da maturidade pulmonar e terapia com surfactante

Uma vez conhecidas as vantagens da administração muito precoce de surfactante, a pergunta óbvia que se impõe é a seguinte: existe algum modo de se diagnosticar a SDR rapidamente que permita a utilização mais racional de surfactante logo após o nascimento?

Por muitos anos, antes da disponibilização dos preparados comerciais de surfactante, inúmeros testes diagnósticos que avaliam componentes ou a função do surfactante no líquido amniótico foram utilizados com o objetivo de se estabelecer a maturidade do sistema surfactante fetal e desta forma auxiliar na decisão de interrupção ou não da gestação. A deficiência de surfactante pulmonar associava-se a um risco extremamente alto de má evolução durante o período neonatal.

Os testes mais tradicionais utilizados foram a relação entre lecitina/esfingomielina,<sup>47</sup> a dosagem de fosfatidilglicerol<sup>48,49</sup> e o teste de Clements.<sup>50-52</sup> A tentativa de uso de vários testes diferentes, avaliados ao longo dos anos, reflete uma insatisfação com os seus resultados clínicos pela falta de acurácia ou por dificuldades técnicas relacionadas à sua realização.

Após o uso de surfactante exógeno ter-se tornado rotineiro, a relevância do estado de maturidade do sistema surfactante passou a ser menor na decisão de interrupção da gestação prematuramente, tornando menos freqüente o uso da amniocentese para avaliação da maturidade pulmonar, procedimento que envolve alguns riscos.

O objetivo da avaliação da maturidade pulmonar mudou de foco após o início da década de 90. A necessidade de rapidez no resultado aumentou para

---

---

permitir o uso muito precoce de surfactante, antes que o diagnóstico clínico se tornasse evidente.

A alternativa da obtenção de um resultado diagnóstico antes do nascimento não foi considerada satisfatória. Os principais motivos seriam a dificuldade de obtenção do líquido amniótico para exame, a dificuldade de coordenar o momento da coleta com o momento do nascimento e a falta de tempo hábil para a coleta e realização do teste nos casos de evolução rápida do parto.

Desta forma, testes acurados, rápidos, simples e de baixo custo, que permitissem a obtenção do resultado após poucos minutos do nascimento, passaram a ser ativamente buscados. Testes que claramente preenchem estes critérios de rapidez e simplicidade são os testes biofísicos, que avaliam a função surfactante, ou a contagem de corpos lamelares.

Os testes bioquímicos, como a relação lecitina/esfingomielina (L/E), fosfatidilglicerol, etc. são de realização mais complexa e demorada.

Os corpos lamelares, que são corpúsculos contendo surfactante recém secretado dos pneumócitos do tipo 2, podem ser contados de modo simples no líquido amniótico através do uso de equipamentos para a contagem automática de células sangüíneas, disponíveis em quase todos os laboratórios de análises clínicas.<sup>53-57</sup> Este teste, na secreção gástrica está presentemente sendo avaliado por nosso grupo quanto ao seu potencial para o diagnóstico da SDR.<sup>58</sup>

O teste de Clements (*shake test*), que correlaciona a espuma formada pela criação de bolhas a partir da agitação de uma secreção orgânica (líquido amniótico ou secreção gástrica), adicionada a partes iguais de etanol a 95% com

---

---

a presença de surfactante, mostrou-se, de um modo geral, muito sensível, contudo pouco específico.<sup>59,60</sup>

O teste das microbolhas estáveis e o teste do clique foram reavaliados nos últimos anos, e os resultados sugeriram sua grande potencialidade para diagnosticar a SDR.

O teste do clique foi desenvolvido por Pattle durante o período de seus primeiros estudos sobre as propriedades das bolhas formadas na presença de secreção pulmonar.<sup>61</sup> O teste baseia-se em um fenômeno que ocorre com as bolhas formadas na presença de surfactante pulmonar. Quando em contato com água desaerada, as bolhas achatam seu formato progressivamente até que, subitamente, retornam à forma esférica (fenômeno do clique – figura 1). Este processo repetido pode ser observado sob microscopia óptica e indica a presença de substância tensoativa. Este teste teve sua aplicação estudada em secreção faríngea, traqueal e gástrica.<sup>62-65</sup> Skelton e Jeffery, em 1994, publicaram um estudo com resultados promissores avaliando o teste realizado nas secreções gástrica e traqueal para prever a SDR. Foram colhidas e congeladas as amostras de 181 recém-nascidos entre 24 e 40 semanas. Foram considerados como tendo deficiência de surfactante os pacientes com diagnóstico de SDR e taquipnéia transitória do recém-nascido conjuntamente. Na análise da secreção gástrica, foi obtida uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 84%, considerando-se somente os recém-nascidos pré-termo. Os resultados na secreção traqueal foram ainda melhores (sensibilidade de 94% e especificidade de 100%). O teste modificado de Clements foi realizado simultaneamente, com resultados inferiores. Os autores concluíram que o teste

---

do clique é acurado para o diagnóstico precoce de SDR e que poderia ser útil para selecionar pacientes para receber surfactante exógeno.<sup>65</sup>



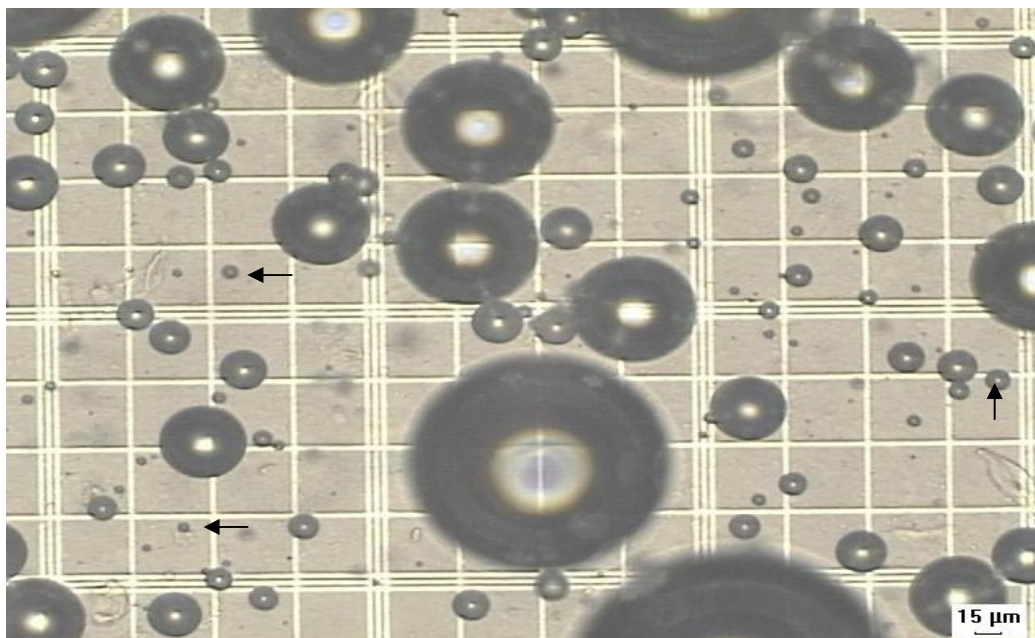
**Figura 1.** Representação do fenômeno do clique.

O teste das microbolhas estáveis (TME) também foi desenvolvido por Richard Pattle e depende da capacidade do surfactante de formar bolhas estáveis muito pequenas (microbolhas).<sup>66</sup> Uma vez agitada a secreção que contém o surfactante, são formadas bolhas grandes, médias e microbolhas. Quando não existe ou existe pouco surfactante pulmonar na interface ar-líquido, a tensão superficial exerce uma força de colapamento muito grande sobre a bolha promovendo a difusão do ar contido no seu interior. Na presença de surfactante em boa quantidade, a tensão superficial cai para próximo de zero com a redução do raio da bolha e da superfície de interface. No momento em que isto ocorre, a bolha estabiliza-se.

Na figura 2 é mostrado um exemplo de campo microscópico com bolhas geradas a partir da agitação da secreção gástrica durante a realização do TME.

O número de microbolhas, definidas por Pattle como as que apresentam diâmetro inferior a 15 micrômetros, guarda proporcionalidade com a concentração e função do surfactante presente no fluido examinado. A aplicação do teste de microbolhas estáveis para predizer a SDR foi proposta inicialmente por Pattle em 1979, que o estudou no líquido amniótico,<sup>66</sup> e somente na década de 90 foi reavaliada por alguns autores no líquido amniótico<sup>67,68</sup> e também nas secreções traqueal<sup>69-71</sup> e gástrica.<sup>68,72,73</sup>

Em 1994, Chida e Fujiwara compararam o resultado do TME no líquido amniótico com vários outros testes. Observaram que uma contagem de microbolhas menor que 5 (acurácia de 83%) apresentava valores preditivos próximos aos obtidos com a relação L/E e com as dosagens da proteína surfactante B, que mostraram acurácias de 88% e 93% respectivamente.<sup>67</sup>



**Figura 2.** Imagem digitalizada mostrando a visão microscópica de parte da área graduada da câmara de contagem. As setas indicam microbolhas com menos de 15 $\mu$ m de diâmetro.

Em outro estudo, Chida et al. avaliaram prospectivamente o líquido amniótico e a secreção gástrica de 105 pacientes com menos de 35 semanas. A secreção gástrica foi colhida dentro dos primeiros 30 minutos, e o teste foi realizado em material fresco. Cinco pacientes foram excluídos por diabetes, gestação múltipla, polidrâmnios ou oligodrâmnios. Foram considerados como tendo SDR os pacientes que apresentassem necessidade de oxigênio maior do que 40% e/ou uma pressão média de vias aéreas maior ou igual a 7cm de H<sub>2</sub>O antes de 6 horas de vida, juntamente com raio-X compatível com o diagnóstico. Os autores encontraram valores preditivos positivos de 100% e 96% e valores preditivos negativos de 91% e 84% para o líquido amniótico e para a secreção gástrica, respectivamente. Concluíram que o teste é bastante acurado e que poderia ser usado como teste de beira de leito para definir pacientes deficientes de surfactante. O ponto de corte para definir deficiência de surfactante foi de 5 microbolhas por milímetro quadrado ( $\mu\text{b}/\text{mm}^2$ ) no líquido amniótico e  $10\mu\text{b}/\text{mm}^2$  na secreção gástrica.<sup>68</sup>

A potencial utilidade do TME e do teste do clique para diagnóstico rápido da SDR estimulou a realização, em nosso meio, de um estudo comparando a acurácia dos dois testes na secreção gástrica de recém-nascidos prematuros com menos de 35 semanas. A opção de utilizar a secreção gástrica em vez de outros fluidos orgânicos deveu-se ao fato de que esta secreção é muito facilmente obtida logo após o nascimento e, também, porque, conforme sugeriam os estudos anteriores, a acurácia era bastante próxima à do líquido amniótico. Além disso, a aspiração gástrica é um procedimento neonatal rotineiro, sobretudo em recém-nascidos pré-termo. A opção de uso de secreção

traqueal é dependente da intubação prévia dos recém-nascidos, limitando assim a utilidade do teste para um grupo mais seletivo de pacientes.<sup>73</sup>

Foi estudado um total de 110 recém-nascidos prematuros entre 24 e 34 semanas que não estavam em ventilação mecânica no momento de sua entrada no estudo. Eles tiveram suas secreções gástricas colhidas e congeladas pouco depois do nascimento. Os pacientes foram seguidos prospectivamente durante o primeiro dia de vida e foram diagnosticados como tendo SDR quando preenchiam os critérios para uso de surfactante vigentes no período do estudo. Esses critérios incluíam a presença de uma radiografia de tórax compatível e uma necessidade de oxigênio igual ou superior a 40% para manter uma saturação entre 90 e 95%, medida por oximetria de pulso. Foram realizados posteriormente, com cegamento, o teste do clique e o TME. Em 6 pacientes o teste do clique não foi realizado por falta de volume suficiente. O TME apresentou uma sensibilidade de 73,9% e uma especificidade de 92% em um ponto de corte menor ou igual a  $10\mu\text{b}/\text{mm}^2$ . À medida em que o ponto de corte era aumentado, a sensibilidade aumentava, chegando a 100%, com uma especificidade de 56,3%, em um ponto de corte de  $35\mu\text{b}/\text{mm}^2$ . O ponto de corte de  $15\mu\text{b}/\text{mm}^2$  foi o ponto de maior acurácia, com sensibilidade de 82,6% e especificidade de 85,1%. O teste do clique é um teste do tipo sim ou não e apresentou sensibilidade e especificidade de 100% e 45,1% respectivamente. Estes resultados, de um modo geral, foram compatíveis com os resultados obtidos anteriormente por Chida et al. com o TME, mas diferentes dos resultados do teste do clique publicados por Skelton e Jeffery. Essas diferenças foram atribuídas à diferença de idade gestacional e critérios para diagnóstico da SDR

---



---

entre os estudos. Concluiu-se, a partir destes resultados, que o TME apresentava vantagens em relação ao teste do clique, como especificidade maior, maior facilidade de execução e menor volume necessário.

Foi também realizado, posteriormente, um estudo em colaboração com o departamento de ciências cirúrgicas do Instituto Karolinska, em Estocolmo, Suécia.<sup>74</sup> O estudo teve o objetivo de avaliar, na secreção gástrica, a sensibilidade e a especificidade de um método computadorizado de análise das bolhas, que havia sido desenvolvido por Berggren et al.<sup>75,76</sup> Amostras descongeladas de secreção gástrica de 80 recém-nascidos prematuros com idades gestacionais entre 24 e 34 semanas foram agitadas através de uma pipeta de Pasteur, e as imagens de campos selecionadas aleatoriamente, digitalizadas para o cálculo e análise do número e proporção de microbolhas (bolhas entre 3 e 20 micrômetros de diâmetro), assim como do diâmetro médio das bolhas. A SDR foi diagnosticada por critérios clínico-radiológicos em 15 pacientes do grupo de bebês dos quais as amostras provinham. A sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, de 87% e 78% para o diâmetro médio das bolhas em um ponto de corte de 45 micrômetros. Os valores foram semelhantes para os outros dois aspectos estudados. Concluiu-se nesse estudo que todas as três medidas das bolhas apresentavam acurácia semelhante e os resultados deveriam encorajar novas pesquisas.

Entretanto, conforme já comentado na introdução, pela simplicidade e pronta disponibilidade de equipamentos e materiais necessários para a realização do TME, optou-se por persistir com a avaliação do TME convencional.

---

Realizou-se também um estudo para avaliar a variabilidade do teste que ocorre por medidas repetidas do próprio observador, por observadores diferentes e pelo efeito do congelamento. Este estudo mostrou que o TME na secreção gástrica apresenta uma variabilidade muito ampla. Entretanto, como existe uma diferença muito grande entre as contagens de microbolhas dos recém-nascidos claramente maduros e dos pacientes imaturos, a concordância entre diferentes observações permanece alta. Executando 300 testes em amostras de 20 recém-nascidos, sendo 10 prematuros e 10 a termo, obteve-se uma concordância das medidas através do Coeficiente Kappa de 0,74 e 0,88 para diferentes observadores em pontos de corte de 15 e 35 $\mu$ b/mm<sup>2</sup>, respectivamente. Os valores para medidas repetidas intra-observador foram semelhantes, entre 0,75 e 0,90.<sup>77</sup>

Outro aspecto importante na avaliação do TME para o diagnóstico de SDR é o efeito da contaminação da secreção estudada por outros fluidos orgânicos. Em outros testes diagnósticos, como a relação lecitina/esfingomielina, sangue e mecônio interferem de modo importante nos resultados. Este efeito ocorre pela alteração das concentrações de lecitina e esfingomielina.

O efeito inibitório destas substâncias sobre o TME também foi estudado. O mecônio é um potente inibidor da função surfactante.<sup>78-81</sup> Algumas observações mostram uma redução muito importante na formação de microbolhas na presença de mecônio, mesmo em concentrações muito baixas.<sup>82-84</sup> Embora isto se constitua em uma grande limitação à utilização do TME, pois mecônio é encontrado no líquido amniótico de cerca de 12,5% dos recém-nascidos,<sup>85</sup> nos pacientes com mais alto risco de desenvolverem SDR

(prematuros muito pequenos) a ocorrência de líquido amniótico meconial é muito menor, tornando o problema de pouca relevância.

O sangue contém várias substâncias inibidoras da função surfactante<sup>86</sup> e, ao contrário do mecônio, encontra-se presente com freqüência no líquido amniótico e na secreção gástrica de prematuros pequenos. No estudo de Pattle et al., onde foi descrito o inicialmente o TME, os autores afirmam que o sangue não afeta o resultado do teste.<sup>66</sup> Em estudo realizado por nós, que avaliou os efeitos do sangue sobre o TME em amostras de soluções contendo surfactante comercial, o efeito inibidor foi muito menos significativo que o do mecônio.<sup>82,84</sup> Em amostras de aspirado gástrico com sangue visível é freqüente a presença de microbolhas estáveis em número compatível com maturidade pulmonar.

Deste modo, o TME parece ter grande potencial para o uso clínico, podendo auxiliar na decisão de administrar surfactante para recém-nascidos prematuros. Entretanto, os resultados da sua aplicação na prática clínica nunca foram testados.

---

---

### **3. OBJETIVOS**

---

**3.1. Objetivo geral**

- Avaliar a utilidade do teste das microbolhas estáveis na seleção de prematuros para o uso profilático de surfactante.

**3.2. Objetivos específicos**

- Determinar o valor preditivo negativo do teste das microbolhas estáveis no diagnóstico de SDR em prematuros com menos de 32 semanas de gestação.
  - Determinar a proporção de pacientes em que o tratamento com surfactante é evitado.
  - Determinar o tempo necessário, após o nascimento, para administração de surfactante nos prematuros com contagem baixa de microbolhas.
  - Comparar os resultados clínicos da terapia profilática direcionada pelo TME com os de um grupo de controle histórico.
-

---

## **4. PACIENTES E MÉTODOS**

---

---

O estudo foi realizado no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e no Hospital Moinhos de Vento, ambos em Porto Alegre. O primeiro é um hospital universitário que presta assistência, principalmente, a pacientes do Sistema Único de Saúde, enquanto o segundo é um hospital privado, que presta assistência a pacientes particulares e usuários de seguradoras privadas, com uma unidade de terapia intensiva neonatal aberta aos pediatras do seu corpo clínico.

Nos dois hospitais, após outubro de 2002, a equipe de neonatologistas do Hospital São Lucas passou a tratar os recém-nascidos pré-termo de menos de 32 semanas sob seus cuidados com uma nova rotina para o uso de surfactante exógeno profilático, com base nos resultados do TME.

#### **4.1. Profilaxia baseada no TME**

Recém-nascidos com 23 a 31 semanas de gestação tinham suas secreções gástricas coletadas tão logo quanto possível na sala de parto, e o TME era realizado na unidade de tratamento intensivo neonatal (UTIN) pelos neonatologistas de plantão ou médicos residentes presentes no momento do nascimento. Se o teste mostrasse uma contagem inferior a  $25\mu\text{b}/\text{mm}^2$ , o recém-nascido recebia profilaxia com surfactante, 200mg/kg de Curosurf<sup>®</sup>, no momento da chegada na UTIN. Se a contagem fosse igual ou superior a  $25\mu\text{b}/\text{mm}^2$ , a criança era observada clinicamente e somente era tratada com surfactante exógeno se o raio-x de tórax fosse compatível com SDR e a relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  fosse  $<175$  mmHg.

---

---

## **4.2. Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos pacientes com 23 a 31 semanas de gestação e pelo menos 500 gramas de peso tratados de acordo com a rotina de profilaxia baseada no TME, nascidos nos dois hospitais no período de outubro de 2002 a dezembro 2003.

A idade gestacional era avaliada pela data do último período menstrual, exceto se um ultra-som realizado antes de 20 semanas de gestação ou um exame New Ballard mostrassem uma diferença maior do que duas semanas. Pacientes nascidos com malformações congênitas graves, incompatíveis com a vida, não foram incluídos.

## **4.3. Realização do teste das microbolhas estáveis**

Um dos neonatologistas ou residentes em neonatologia que deram assistência ao paciente realizou o TME de acordo com o método descrito por Pattle et al.<sup>66</sup> com mínimas modificações. Estes médicos tinham sido previamente treinados para a feitura do teste. Uma alíquota de fluido gástrico foi aspirado até aproximadamente 5cm na haste de uma pipeta de Pasteur de vidro de 230mm (BRAND GMBH + CO, Wertheim, Alemanha), conectada a um pipetador de borracha e colocada sobre a área marcada de uma câmara de contagem (Neubauer Improved Bright-line, sem a lamínula). Mantendo a ponta da pipeta quase tocando a câmara de contagem verticalmente, a alíquota era aspirada e expelida repetida e rapidamente por 20 vezes e, após, expelida sobre a área demarcada da câmara de contagem, a qual era imediatamente invertida e colocada no microscópio, formando uma gota pendente. Depois de 4 minutos, a

---



---

câmara de contagem era examinada com um aumento de 100 vezes, e as microbolhas (bolhas menores que 15 $\mu$ m) eram contadas com a ajuda de uma escala óptica. A contagem era realizada em 5 dos 25 quadrados que formam 1mm<sup>2</sup> (um quadrado em cada quadrante e o central). Em caso de dificuldade para contar as microbolhas nos campos centrais, devido, sobretudo, à concentração alta de bolhas grandes, campos mais periféricos eram contados. O teste foi feito somente uma vez, sem cegamento, devido a razões práticas. Nossos estudos anteriores mostraram um coeficiente de concordância de kappa de 0,88 entre as contagens feitas por diferentes observadores, com um ponto de corte de 35 $\mu$ b/mm<sup>2</sup>.

#### **4.4. Comparação com resultados clínicos anteriores**

No Hospital São Lucas, os dados clínicos dos pacientes da mesma idade gestacional (23-31 semanas) dos dois anos anteriores, quando a rotina era o tratamento de resgate, foram comparados com os dados do período em que a rotina da profilaxia baseada no TME foi implantada. A mortalidade e a ocorrência das principais complicações foram comparadas em bases de “intenção de tratar”, significando que todos os pacientes foram incluídos independentemente da aplicação ou não da rotina proposta para o período. A comparação não incluiu pacientes do Hospital Moinhos de Vento, uma vez que não havia rotina proposta para o período e também porque uma proporção significativa de crianças não foi atendida pelos neonatologistas do Hospital São Lucas.

---

#### **4.5. Cálculo da amostra**

Com uma amostra de 100 pacientes, foi estimado um erro máximo entre 7 e 10% para o cálculo do valor preditivo negativo.

#### **4.6. Análise estatística**

Variáveis quantitativas foram descritas usando a média e o desvio padrão. Na presença de assimetria foram usadas a mediana e o percentil interquartil. Dados categóricos (incluindo proporção de pacientes que receberam surfactante) foram apresentados como percentagens com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos via distribuição binomial.

O nível de significância foi definido como sendo  $\alpha=0.05$ . Para comparação de dois grupos foi usado o teste t de Student para variáveis numéricas e o teste exato de Fisher para a comparação de proporções. Os dados foram analisados e processados como o pacote estatístico SPSS, v11.5.

#### **4.7. Aspectos éticos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. O Hospital Moinhos de Vento não dispunha de comitê para este fim durante o período da coleta dos dados, mas o estudo era do conhecimento da chefia do serviço.

A rotina terapêutica, objeto do presente estudo, foi implantada pelo grupo de neonatologistas após ampla discussão e foi considerada adequada para utilização, independentemente da realização do projeto de pesquisa.

---

Uma vez que as intervenções em estudo eram realizadas por rotina estabelecida, foi dispensada a obtenção do consentimento informado.

---

---

## **5. RESULTADOS**

---

---

Durante o período de outubro de 2002 a dezembro de 2003 os médicos responsáveis pela execução da rotina de profilaxia baseada no TME atenderam um total de 113 pacientes entre 23 e 31 semanas de gestação que eram elegíveis para a aplicação da rotina: 90 no Hospital São Lucas e 23 no Hospital Moinhos de Vento. Entretanto, em 15 pacientes, todos do Hospital São Lucas, a rotina não foi seguida ou foi seguida parcialmente. Assim, um total de 98 pacientes preencheram os critérios para inclusão do estudo. As características destes 98 pacientes são descritas na tabela 1.

As falhas na aplicação da rotina nos 15 pacientes foram a não realização do TME (10 pacientes) ou a decisão do médico assistente de não administrar surfactante imediatamente, apesar da baixa contagem de microbolhas (5 pacientes). Dos pacientes em que o TME não foi realizado, 1 paciente recebeu profilaxia antes da coleta do aspirado gástrico, 1 paciente não foi atendido por médico da equipe de neonatologia logo que nasceu, 4 pacientes tiveram suas amostras de secreção gástrica consideradas impróprias para a realização do teste (líquido muito sanguinolento ou volume insuficiente aspirado) e 4 pacientes tiveram sua sintomatologia respiratória tão leve que o médico assistente considerou desnecessária a realização do teste. Dos 9 pacientes em que o médico assistente tomou a decisão pessoal de não realizar o teste (4 pacientes) ou de não aplicar surfactante (5 pacientes), apesar de indicado pela rotina, 3 acabaram necessitando de surfactante na evolução subsequente.

No Hospital Moinhos de Vento, todos os pacientes que foram atendidos pelos médicos envolvidos com a implantação da nova rotina e que preencheram

---

os critérios de inclusão, foram incluídos no estudo. Os dados de pacientes assistidos por outros médicos não foram obtidos.

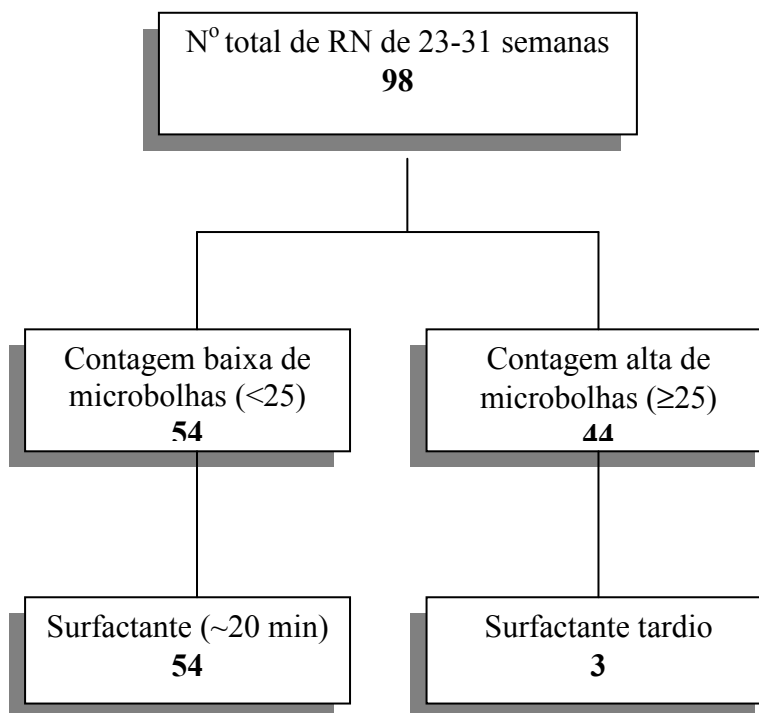
**Tabela 1.** Características dos 98 recém-nascidos tratados conforme a rotina de profilaxia seletiva com surfactante baseada no TME.

Peso ao nascer, g *	1145±376
Idade gestacional, semanas *	28,5±2,1
Sexo masculino, n(%)	54(55,1)
Cesariana, n(%)	66(67,1)
Apgar 1 minuto*	5,7±2,5
Apgar 5 minutos*	7,8±1,6
Bolsa rota >24h, n(%)	19(19,4)
Uso pré-natal antenatal de corticóide, n(%)	87(88,8)
Hipertensão materna, n(%)	23(23,5)
Diabetes materna, n(%)	1(1)

\* Média ± desvio padrão

Quarenta e quatro pacientes (45% - IC95%: 35-55%) tiveram a quantidade de microbolhas  $\geq 25\mu\text{b}/\text{mm}^2$  e, conseqüentemente, não receberam surfactante profilático. Em somente 3 destes pacientes houve necessidade de tratamento de resgate com surfactante. O valor preditivo negativo foi de 93,2% (IC95%: 81,3-

98,6). A distribuição dos pacientes de acordo com o resultado do teste é ilustrada na figura 3. As proporções de uso de surfactante na população estudada e em seus subgrupos, de acordo com a idade gestacional, são mostradas na figura 4.

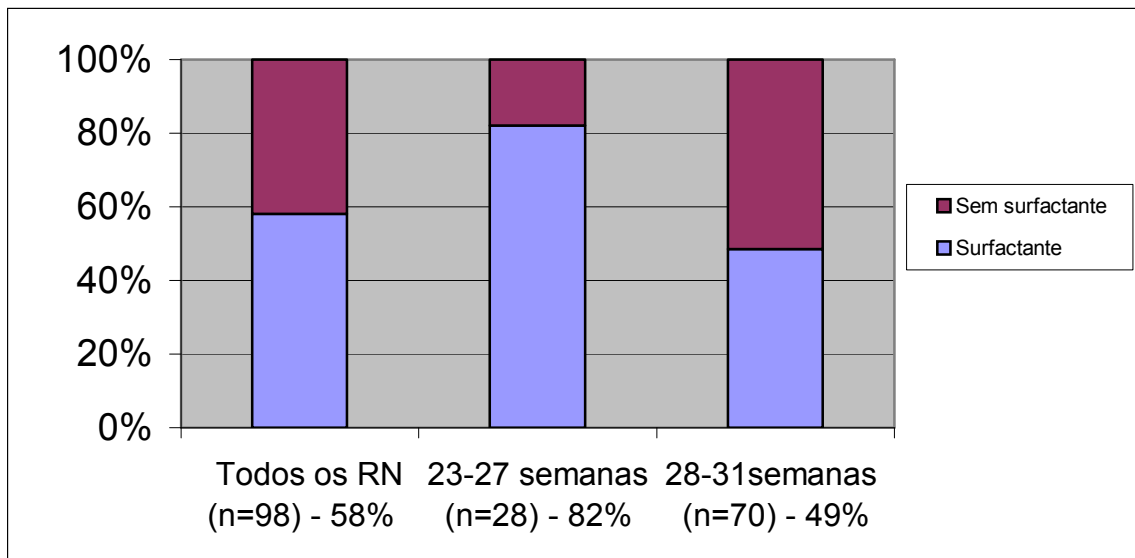


**Figura 3.** Distribuição dos pacientes de acordo com o resultado da contagem de microbolhas e administração de surfactante profilático ou tardio.

O uso de surfactante foi evitado em 41 dos 98 pacientes (42% - IC95%: 32-52%) com menos de 32 semanas, sendo que nos subgrupos de 23-27 semanas e de 28-31 semanas isto ocorreu em 5 dos 28 (18% - IC95%: 7-38%) e em 36 dos 70 (51% - IC95%: 39-63%), respectivamente.

O uso de surfactante, de acordo com a intervenção necessária na sala de parto, foi também estudado. Oitenta e dois por cento dos recém-nascidos intubados, 50% dos que foram ventilados com balão auto-inflável e máscara e

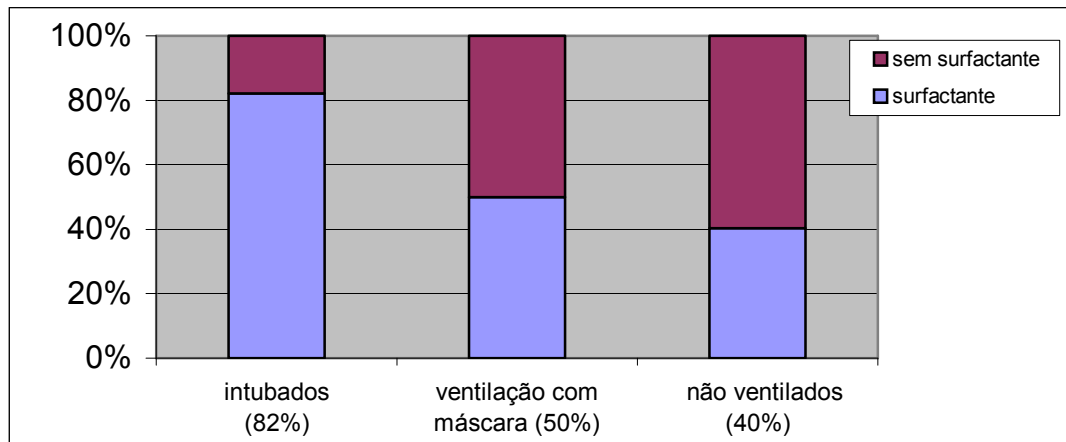
40% dos que não necessitaram ventilação terminaram recebendo surfactante, de acordo a nova rotina proposta (figura 5).



**Figura 4.** Proporção de pacientes que receberam surfactante de acordo com a idade gestacional.

A mediana do tempo gasto entre o nascimento e a administração de surfactante foi de 20 minutos (percentil interquartil 17-27). O tempo mínimo gasto foi de 10 minutos e 90 pacientes (92%) receberam surfactante antes de 30 minutos de vida.





**Figura 5.** Proporção de recém-nascidos recebendo surfactante de acordo com o suporte ventilatório requerido em sala de parto.

No Hospital São Lucas da PUCRS, os dados de todos os pacientes com critério para o uso da nova rotina durante o período do estudo prospectivo (grupo de estudo) foram comparados com os de todos os pacientes com os mesmos critérios nos 2 anos imediatamente anteriores (controle histórico). Pacientes com hipoplasia pulmonar foram excluídos (um do grupo de estudo e 3 do grupo controle). As características dos pacientes e as principais variáveis de desfecho são mostradas na tabela 2. No que se refere ao uso de surfactante exógeno, durante a nova rotina 53 de 58 pacientes (59,3%) receberam a medicação enquanto somente 36 de 96 (37,5%) foram tratados no período anterior ( $p=0.002$ ).

**Tabela 2.** Características e variáveis de desfecho dos pacientes do período de uso de surfactante profilático com base no teste das microbolhas estáveis e do período do controle histórico em que era utilizada a técnica de resgate.\*

	Grupo de estudo (n = 89) <sup>†</sup>	Controle histórico (n = 96) <sup>†</sup>	Valor de P
Peso ao nascer, gramas ‡	1125±398	1171±399	0,43
Idade gestacional, semanas ‡	28,3±2,3	28,8±2,5	0,11
Corticosteróide pré-natal, n(%)	73(82)	69(71,9)	0,12
Mortalidade, n(%)	18(20,2)	27(28,1)	0,23
Mortalidade nos < 1000g, n(%)	17/43(38,6)	22/37(59,5)	0,08
Pneumotórax, n(%)	4(4,5)	6(6,3)	0,75
Oxigênio aos 28 dias, n(%)	20(22,5)	9(9,4)	0,02

\* Refere-se somente aos pacientes tratados no Hospital São Lucas da PUCRS;

† Exceto para a mortalidade dos < 1000g; DP = desvio padrão; NS = estatisticamente não significativo; ‡ Média ± desvio padrão

## **6. DISCUSSÃO**

---

O presente estudo representa, tanto quanto é do nosso conhecimento, a primeira comunicação do uso de um teste, em vez de apenas idade gestacional, para a indicação de profilaxia com surfactante (<30 minutos) em recém-nascidos pré-termo. Os resultados são compatíveis com prévios achados e confirmam a hipótese de que o TME pode ser usado como uma alternativa à profilaxia baseada somente na idade gestacional.

O ponto de corte de  $25\mu\text{b}/\text{mm}^2$  foi escolhido porque desejávamos ter uma frequência baixa de falsos negativos. Em nossa experiência prévia, a sensibilidade neste ponto de corte foi superior a 90% para diagnosticar a SDR em recém-nascidos pré-termo de menos de 35 semanas de gestação não intubados. Nossos atuais resultados são compatíveis com os achados anteriores, embora no estudo presente a sensibilidade não possa ser calculada.

Em nossa população, quase metade dos recém-nascidos pré-termo de menos de 32 semanas foi corretamente identificada como madura, e somente 3 pacientes de um total de 98 terminaram por necessitar terapia de resgate com surfactante, de acordo com os critérios estabelecidos. O valor preditivo negativo foi elevado. Comparada com a abordagem profilática para todos os recém-nascidos com a mesma idade gestacional, a presente abordagem evitou a administração de um grande número de doses de surfactante.

Os 3 pacientes que terminaram por receber tratamento de resgate tiveram SDR leve, e todos sobreviveram. Dois deles atingiram critério para o uso de surfactante muitas horas mais tarde, e nenhum deles necessitou mais de uma dose sugerindo que, provavelmente, tivessem alguma produção de surfactante endógeno. É possível que estes pacientes com contagem limítrofe de

---

microbolhas e que eventualmente desenvolvem SDR tenham um bom prognóstico sendo tratados com profilaxia ou com tratamento de resgate.

Em nosso estudo, a mediana do tempo até a administração de surfactante foi de 20 minutos. Isto é ainda considerado profilaxia. Embora a profilaxia imediata resulte teoricamente em menor lesão pulmonar, há algumas evidências de que a demora de alguns minutos não reduz seu benefício clínico da profilaxia. Kendig e colaboradores publicaram um estudo comparando a profilaxia imediata com a administração de surfactante aos 10 minutos de vida. Estes autores sugerem que não há vantagem no seu uso imediato.<sup>87</sup> No presente estudo, o surfactante foi usado tão precocemente quanto 10 minutos de vida. É muito provável que o tempo mediano pudesse ter sido reduzido para algo próximo dos 10 minutos se o teste e a administração de surfactante fossem realizados na sala de parto, em vez de na unidade de tratamento intensivo neonatal.

O uso do TME evitou uma desnecessária administração de surfactante numa proporção significativa de recém-nascidos, especialmente nos de 28 a 31 semanas de gestação. Na maioria dos recém-nascidos mais imaturos (menos de 28 semanas) há uma tendência geral para o uso de profilaxia com surfactante porque a SDR é altamente prevalente. Na presente experiência, somente cerca de 20% destes pacientes foram poupados de receber surfactante. Poderia ser levantado que a pequena proporção de recém-nascidos com pulmões maduros, identificados pelo teste nesta faixa de idade gestacional, não é suficiente para justificar a realização do TME. A maioria deles necessita de intubação traqueal na sala de parto e, portanto, já se dispõe da via para a administração da droga. A ventilação mecânica com pressão positiva utilizada, mesmo que breve, poderia

---

ser lesiva aos pulmões do recém-nascido. Por outro lado, os poucos pacientes que não necessitassem de intubação e ventilação mecânica inicialmente poderiam ser mais claramente beneficiados por ter o resultado do teste em apenas alguns minutos.

Osborn et al. realizaram o teste do clique em aspirados traqueais de recém-nascidos com até 36 semanas, tendo como alvo um tratamento de resgate precoce. Estes autores comunicaram uma redução no número de crianças de menos de 28 semanas que receberam surfactante. Comparando a nova abordagem usando o teste do clique com a anterior, que definia o uso de surfactante por critérios clínicos e radiológicos, observaram que a necessidade de surfactante caiu de 79% para 48%. Da mesma forma houve uma redução da mediana de tempo para a administração de surfactante de 159 para 50 minutos.<sup>88</sup> O teste do clique, bem como o TME, é um teste para avaliação da função surfactante. A redução da necessidade de surfactante em recém-nascidos muito imaturos foi mais significativa no estudo daqueles autores do que no presente estudo. O fluido traqueal é provavelmente mais representativo da produção alveolar de surfactante do que o suco gástrico e poderia ser usado em pacientes que são imediatamente intubados na sala de parto para definir a profilaxia com surfactante. O TME tem-se mostrado altamente acurado quando realizado no aspirado traqueal.<sup>69,71</sup> Os maiores problemas desta técnica são a necessidade de intubação endotraqueal e a maior complexidade na obtenção da amostra.

No grupo de pacientes de 28 a 31 semanas, a profilaxia baseada somente na idade gestacional é muito menos freqüentemente usada. Mas mesmo nesta

---

faixa de idade gestacional, há alguns dados que sugerem que a abordagem da profilaxia indiscriminada é clinicamente superior à da terapia de resgate.

Kattwinkel et al. publicaram um ensaio clínico randomizado e controlado comparando a profilaxia com o tratamento de resgate em crianças nascidas entre 29 e 31 semanas de gestação. Foram analisados dados de 1248 pacientes. Mesmo nesta população mais madura, estes autores encontraram uma redução da mortalidade e da necessidade de oxigênio suplementar aos 28 dias de vida, embora a maior parte das diferenças pudesse ser atribuída ao grupo com menos de 31 semanas.<sup>41</sup>

Há uma gama de diferentes abordagens na administração de surfactante em prematuros na faixa de idade gestacional alvo do presente estudo. Alguns acreditam que o uso precoce, baseado no exame físico, é a melhor abordagem. Outros aguardam até que um diagnóstico mais claro possa ser estabelecido. É sabido que muitos recém-nascidos pré-termo têm desconforto respiratório inicial e dificuldades ventilatórias, mas melhoram e normalizam a respiração em um curto intervalo de tempo. Além disto, a radiografia de tórax pode inicialmente mostrar um padrão granuloso devido à presença de fluido intra-alveolar, que pode também tornar difícil a diferenciação com SDR. Assim o TME pode ser muito útil, permitindo um tratamento profilático numa população selecionada, com grande chance de desenvolver SDR. A profilaxia seletiva pode mesmo mostrar-se superior à profilaxia indiscriminada e outras modalidades de terapia de resgate. Se a demora na administração de surfactante baseado no TME é pequena, não há motivo para acreditar-se que a profilaxia indiscriminada resulte em melhor desfecho clínico. Adicionalmente, poderíamos especular que,

---

deixando de intervir “iatrogenicamente” em pacientes que não necessitam procedimentos como intubação endotraqueal e ventilação mecânica, poderia ser possível a obtenção melhores resultados clínicos neste subgrupo específico.

Os pacientes nascidos no Hospital São Lucas durante o período de profilaxia seletiva com base no TME foram comparados com um grupo de pacientes nascidos no mesmo hospital no período imediatamente anterior. Neste período, a rotina consistia na terapia de resgate, utilizando-se os mesmos critérios para administrar surfactante usados para os pacientes com contagem de microbolhas  $\geq 25\mu\text{b}/\text{mm}^2$  no período da nova rotina (radiografias de tórax características de SDR e uma relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 175\text{mmHg}$ ). A redução na mortalidade observada durante o período da nova rotina, apesar de percentualmente relevante, não foi estatisticamente significativa. A significância foi limítrofe no subgrupo de prematuros com menos de 1000g. O tamanho relativamente pequeno da amostra, assim como os diferentes períodos comparados, limitam quaisquer conclusões.

Em uma revisão sistemática dos ensaios randomizados, Morley estimou que a profilaxia salvou 7 vidas adicionais para cada 100 pacientes tratados.<sup>89</sup> Em um ambiente de alta mortalidade é possível que a profilaxia possa ter maior impacto na sobrevivência. Não foram observadas diferenças em outras potenciais complicações associadas à SDR, exceto pela maior proporção de bebês em oxigenoterapia suplementar aos 28 dias. Isto provavelmente se deveu a um maior número de recém-nascidos muito imaturos sobreviventes pequenos durante o período da nova rotina.

---



## **7. CONCLUSÕES**

---

1. O TME pode ser usado clinicamente para determinar a administração de surfactante ainda em bases profiláticas (dentro dos primeiros 30 minutos de vida).
  2. Um alto valor preditivo negativo foi obtido com o TME utilizando-se o ponto de corte de  $25\mu\text{b}/\text{mm}^2$  ou mais para a exclusão de SDR na população em estudo.
  3. O teste identificou uma significativa proporção de pacientes que não necessitavam de surfactante exógeno (42%), e este efeito foi mais marcado no subgrupo de pacientes entre 28 e 31 semanas de idade gestacional.
  4. O tempo transcorrido entre o nascimento e a administração de surfactante foi inferior a 30 minutos em quase todos os pacientes, permitindo, portanto, a utilização de surfactante dentro de um período usualmente considerado como profilaxia.
  5. Embora tenha havido uma redução na mortalidade no grupo de recém-nascidos com menos de 1000g no período da nova rotina, em relação ao grupo controle histórico de mesmo peso, não é possível definir o papel da nova rotina sobre a diferença observada.
-

---

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

1. Avery ME, Fletcher BD. The lung and its disorders in the newborn infant. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders;1974.
  2. Obladen M. History of surfactant research. In: Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ, editors. Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice. Amsterdam: Elsevier Science; 1992. p. 1-18.
  3. Gruenwald P. Surface tension as a factor in the resistance of neonatal lungs to aeration. Am J Obstet. Gynecol 1947;53:996-1007.
  4. Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. Nature 1955;175:1125-6.
  5. Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. Proc R Soc Lond 1958;148:217-40.
  6. Clements JA. Surface tension of lung extracts. Proc. Soc. Biol. Med 1957;95:1702.
  7. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. Am J of Dis Child 1959;97:517-23.
  8. Hansen T, Corbet A. Disorders of Transition. In: Taeusch HW, Ballard RA, editors. Avery's diseases of the newborn. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998. p.602-29.
  9. Hack M, Wright LL, Shankaran S, Tyson JE, Horbar JD, Bauer CR, et al. Very-low-birth-weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development NEONATAL Network. Am J Obstet Gynecol 1995;172:457-64.
  10. Stark A, Frantz ID 3<sup>rd</sup>. Respiratory distress syndrome. Pediatr Clin North Am 1986;33:533-44.
  11. Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome . Pediatrics 1972;50:515-25.
-

12. Auld PA, Nelson NM, Cherry RB, Rudolph AJ, Smith CA. Measurement of thoracic gas volume in the newborn infant. *J Clin Invest* 1963;43:476-83.
  13. Richardson P, Bose CL, Carlston JR. The functional residual capacity of infants with respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1986;75:267-71.
  14. Finlay-Jones JM, Papadimitriou JM, Barter RA. Pulmonary hyaline membrane: Light and electron microscopic study of the early stage. *J Pathol* 1974;112:117-24.
  15. Ablow RC, Gross I, Effmann EL, Uauy R, Driscoll S. The radiographic features of early onset Group B streptococcal neonatal sepsis. *Radiology* 1977;124:771-7.
  16. Hansen T, Corbet A. Neonatal pneumonias. In: Taeusch HW, Ballard RA, editors. *Avery's diseases of the newborn*. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998. p.648-60.
  17. Gross I. Respiratory distress syndrome. In: Oski AS, Deangelis CD, Feigin RD, et al. *Principle and practice of Pediatrics* 2a ed. Philadelphia, J. B. Lippincott; 1994. p. 369-74.
  18. Robillard E, Alarie Y, Dagenais-Perusse P, Baril E, Guilbeault. Microaerosol administration of synthetic beta-gamma-dipalmitoyl-l-alpha-lecithin in the respiratory distress syndrome: a preliminary report. *Can Med Assoc J*. 1964;90:55-7.
  19. Shannon DC, Bunnell JB. Dipalmitoyl lecithin aerosol in RDS [abstract]. *Pediatr Res* 1976;10:467.
  20. Chu J, Clements JA, Cotton EK, Klaus MH, Sweet AY, Tooley WH, et al. Neonatal pulmonary ischemia. I. Clinical and physiological studies. *Pediatrics* 1967;40:709-82.
  21. Enhörning G, Robertson B. Lung expansion in the premature newborn rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics* 1972;50:55-66.
-

- 
22. Robertson B, Enhörning G. The alveolar lining of the premature newborn rabbit after pharyngeal deposition of surfactant. *Lab Invest* 1974;34:54-9.
  23. Fujiwara T, Maeta H; Chida S; Morita T; Watabe Y; Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet* 1980;1:55-9.
  24. Hallman M, Merritt TA, Jarvenpaa AL, Boynton B, Mannino F, Gluck L, et al. Exogenous human surfactant for treatment of severe respiratory distress syndrome: a randomized clinical trial. *J Pediatr* 1985;106:963-9.
  25. Enhörning G, Shennan A, Possmayer F, Dunn M, Chen CP, Milligan J. Prevention of neonatal respiratory distress syndrome by tracheal instillation of surfactant: a randomized clinical trial. *Pediatrics* 1985;76:145-53.
  26. Shapiro DL, Notter RH, Morin FC 3d, Deluga KS, Golub LM, Sinkin RA, et al. Double-blinded, randomized trial of calf lung surfactant extract administered at birth to very premature infants for prevention of the respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1985;76:593-9.
  27. Soll RF: Synthetic surfactant treatment of RDS. In Sinclair JL, et al: Neonatal module of Cochrane Database of Ststematic Reviews. The Cochrane Collaboration: Issue 1. Oxford: Update software, 1997.
  28. Soll RF: Natural surfactant extract treatment of RDS. In Sinclair JL, et al: Neonatal module of Cochrane Database of Ststematic Reviews. The Cochrane Collaboration: Issue 1. Oxford: Update software, 1997.
  29. Egberts J, de Winter JP. Meta-analyses of surfactant and broncopulmonary displasia revisited [letter]. *Lancet* 1994;344:882.
  30. Fujiwara T, Konishi M, Chida S, Okuyama K, Ogawa Y, Takeuchi Y, et al. Surfactant replacement therapy with a single postventilatory dose of a reconstituted bovine surfactant in preterm neonates with respiratory distress syndrome: final analysis of a multicenter, double-blind, randomized trial and comparison with similar trials. *Pediatrics* 1990;86:753-64.
-

- 
31. Long W, Corbet A, Cotton R, Courtney S, McGuinness G, Walter D, et al. A controlled trial of synthetic surfactant in infants weighing 1250 g or more with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1991;325:1696-703.
  32. Robertson B: Pathology and pathophysiology of neonatal surfactant deficiency. In Robertson B, et al (eds) Amsterdam, Elsevier Science Publisher 1984, p. 384-418.
  33. Jobe A, Ikegami M, Glatz T, Yoshida Y, Diakomanolis E, Padbury J. Duration and characteristics of treatment of premature lambs with natural surfactant. *J Clin Invest* 1981;67:370-5.
  34. Gortner L, Bernsau U, Hellwege HH, Hieronimi G, Jorch G, Reiter HL. A multicenter randomized controlled clinical trial of bovine surfactant for prevention of respiratory distress syndrome. *Lung* 1990;168:864-9.
  35. Merritt TA, Hallman M, Bloom BT, Berry C, Benirschke K, Sahn D et al. Prophylactic treatment of very premature infants with human surfactant. *N Engl J Med* 1986;315:785-90.
  36. Shapiro DL, Notter RH, Morin FC 3rd, Deluga KS, Golub LM, Sinkin RA, et al.. Double-blind, randomized trial of a calf lung surfactant extract administered at birth to very premature infants for prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1985;76:593-9.
  37. Fujiwara T, Robertson B. Pharmacology of Exogenous surfactant. In: Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ. Pulmonary surfactant from molecular biology to clinical practice. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1992, p. 561-92.
  38. Bevilacqua G, Parmigiani S, Robertson B and the Italian Collaborative Multicentre Study Group. Prophylaxis of respiratory distress syndrome by treatment with modified porcine surfactant at birth: a multicentre prospective randomized trial. *J Perinat Med* 1996;24:1-12.
-

- 
39. Dunn MS, Shennan AT, Zyack D, Possmayer F. Bovine surfactant replacement therapy in neonates of less than 30 weeks' gestation: a randomized controlled trial of prophylaxis vs treatment. *Pediatrics* 1991;87:377-86.
  40. Egberts J, DeWinter JP, Sedin G, deKleine MJK, Broberger U, VanBel F, et al. Comparison of prophylaxis and rescue treatment with Curosurf in neonates less than 30 weeks gestation: a randomized trial. *Pediatrics* 1993;92:768-74.
  41. Kattwinkel J, Bloom BT, Delmore P, Davis CL, Farrell E, Friss H, et al. Prophylactic administration of calf lung surfactant extract is more effective than early treatment of respiratory distress syndrome in neonates of 29 through 32 weeks' gestation. *Pediatrics* 1993;92:90-8.
  42. Kendig JW, Notter RH, Cox C, Reubens LJ, Davis JM, Maniscalco WM, et al. A comparison of surfactant as immediate prophylaxis and as rescue therapy in newborns of less than 30 weeks' gestation. *N Engl J Med* 1991;324:865-71.
  43. Merritt TA, Hallman M, Berry C, Pohjavuori M, Edwards DK, Jaaskelainen J, et al. Randomized, placebo-controlled trial of human surfactant given at birth vs rescue administration in very low birthweight infants with lung immaturity. *J Pediatr* 1991;118:581-94.
  44. Walti H, Paris - Llado J, Breart G, Couchard M, and the French Collaborative Multicentre Study Group. Porcine surfactant replacement therapy in newborns of 25-31 weeks' gestation: a randomized multicentre trial of prophylaxis versus rescue with multiple low doses. *Acta Paediatr* 1995;84:913-21.
  45. Bevilacqua G, Chernev T, Parmigiani S, Iarokova N, Gaioni L, Volante E, et al. Use of surfactant for prophylaxis versus rescue treatment of respiratory distress syndrome: experience from an Italian-Bulgarian trial. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 1997;68:47-54.
  46. Soll RF, Morley, CJ. Prophylactic versus selective use of surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 1999. Oxford: Update Software.
-



- 
47. Gluck L, Kulovich MV, Borer Jr RC, Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1971;109:440-5.
  48. Garite TJ, Yabusaki KK, Moberg LJ, Symons JL, White T, Itano M, et al. A new rapid slide agglutination test for amniotic fluid phosphatidylglycerol: laboratory and clinical correlation. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:681-686
  49. Eisenbrey AB, Epstein E, Zak B, McEnroe RJ, Artiss JD, Kiechle FL. Phosphatidylglycerol in amniotic fluid. Comparison of a "ultrasensitive" immunologic assay with TLC and enzymatic assay. *Am J Clin Pathol* 1989;91:293-7.
  50. Clements JA, Platzker AC, Tierney DF, Hobel CJ, Creasy RK, Margolis AJ, et al. Assessment of risk of the respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in the amniotic fluid. *N Engl J Med* 1973;286:1077-81.
  51. Roux JF, Nakamura J, Brown E. Assessment of fetal maturation by the foam test. *Am J Obstet Gynecol* 1973;117:280-3.
  52. Merolla JC, Johnson LM, Bolognese RJ, Corson SL. Determination of fetal pulmonary maturity by amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratio and rapid shake test. *Am J Obstet Gynecol* 1974;1119:243-52.
  53. Roiz-Hernandez J, Navarro-Solis E, Carreon-Valdez E. Lamellar bodies as a diagnostic test of fetal lung maturity. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;77:217-21.
  54. Fakhoury G, Daikoku NH, Benser J, Dubin NH. Lamellar body concentrations and the prediction of fetal pulmonary maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:72-6.
  55. Ashwood ER, Palmer SE, Taylor JS, Pingree SS. Lamellar body counts for rapid fetal lung maturity testing. *Obstet Gynecol* 1993;81:619-24.
  56. Neerhof MG, Dohnal JC, Ashwood ER, Lee IS, Anceschi MM. Lamellar body counts: a consensus on protocol. *Obstet Gynecol*. 2001;97:318-20.
-

- 
57. Neerhof MG, Haney EI, Silver RK, Ashwood ER, Lee IS, Piazze JJ. Lamellar body counts compared with traditional phospholipid analysis as an assay for evaluating fetal lung maturity. *Obstet Gynecol* 2001;97:305-9.
  58. Colvero AP, Fiori HH, Luz JH, dos Santos EF, Munhoz TP, Fiori RM. Lamellar body counts in gastric aspirates of term and preterm newborn infants [abstract]. *Pediatr Res* 2004;55:515A.
  59. Smith ML, Curnock D, Forshaw F. Value of the gastric aspirate shake test. *Arch Dis Child* 1981;56:230-1.
  60. Halmann M. Antenatal diagnosis of lung maturity. In: Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, editors. *Pulmonary surfactant from molecular biology to clinical practice*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1992.
  61. Pattle RE. The cause of the stability of the bubbles derived from the lung. *Physics Med Biol* 1960;5:11-26.
  62. Todd D, John E. Evaluation of bubble clicking in gastric aspirate in the newborn. *Aust Paediatr J* 1983;19:104-6.
  63. Parkinson CE, Supramaniam G, Harvey D. Bubble clicking in pharyngeal aspirates of newborn babies. *Br Med J* 1978;1:758-9.
  64. Parkinson CE, Harvey D, Talbert D. Bubble clicking in amniotic fluid. *Lancet*.1973;1:1264.
  65. Skelton R, Jeffery H. "Click test": Rapid diagnosis of respiratory distress syndrome. *Pediatric Pulmonology*. 1994;17:383-9.
  66. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, et al. Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol*. 1979;86:615-22.
  67. Chida S, Fujiwara T. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: I. Comparisons with other predictors of fetal lung maturity in amniotic fluid. *Eur J Pediatr* 1993;152:148-51.
-

- 
68. Chida S, Fujiwara T, Konishi M, Sasaki M. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: II. Prospective evaluation of the test on amniotic fluid and gastric aspirate. *Eur J Pediatr* 1993;152:152-6.
69. Boo NY, Cheong KB, Cheong SK, Lye MS, Zulfiqar MA. Usefulness of stable microbubble test of tracheal aspirate for the diagnosis of neonatal respiratory distress syndrome. *J Paediatr Child Health* 1997;33:329-34.
70. Friedrich W, Haufe M, Schmalisch G, Wauer RR : The stable microbubble test on tracheal aspirate samples from newborn babies for diagnosis of surfactant deficiency and/or surfactant malfunction. *Biol Neonate* 1998;73:10-8.
71. Seitz EE, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM. Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Biol Neonate*. In press 2004.
72. Teeratakulpisarn J, Taksaphan S, Pengsaa K, Wiangnon S, Kosuwon W. Prediction of idiopathic respiratory distress syndrome by the stable microbubble test on gastric aspirate. *Pediatr Pulmonol* 1998;25:383-9.
73. Fiori HH, Varela I, Justo AL, Fiori RM. Stable microbubble test and click test to predict respiratory distress syndrome in preterm infants not requiring ventilation at birth. *J Perinat Med* 2003;31:509-14.
74. Fiori HH, Linderholm B, Fiori RM, Robertson B. Computerized image analysis of bubbles in gastric aspirate for prediction of respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr* 2001;90:1402-4.
75. Berggren P, Eklind J, Linderholm B, Robertson B. Bubbles and computer aided image analysis for evaluation of surfactant inhibition. *Biol Neonate* 1992;61:15-20.
76. Berggren P, Linderholm B, Ebbesen F, Verder H, Eschen C, Robertson B. Evaluation of lung maturity in newborn babies by microbubble stability test [abstract]. *Biol Neonate* 1999;76:44.
-

- 
77. Pereira MR, Fiori HH, Luz JH Fiori RM. Inter- and intra-observer agreement and the effect of freezing on the stable microbubble test performed in gastric aspirates of newborns [abstract]. Proceedings of the 17th International Workshop on Surfactant Replacement , Cagliari, Italy, May, p 23.
  78. Chen CT, Toung TJ, Rogers MC. Effect of intra-alveolar meconium on pulmonary surface tension properties. *Crit Care Med* 1985;13:233-6.
  79. Sun B, Curstedt T, Robertson B. Surfactant inhibition in experimental meconium aspiration. *Acta Paediatr* 1993;82:182-9.
  80. Moses D, Holm BA, Spitale P, Liu MY, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:477-81.
  81. Bae CW, Takahashi A, Chida S, Sasaki M. Morphology and function of pulmonary surfactant inhibited by meconium. *Pediatr Res* 1998;44:187-91.
  82. Luz JH, Fiori HH, Pereira MR, Piva J, Fiori RM. Stable Microbubble test for evaluation of surfactant inhibition by meconium, human albumin and blood and restoration of surfactant activity by dextran [abstract]. Proceedings of the 17th International Workshop on Surfactant Replacement, Cagliari, Italy, May, p.16.
  83. Oh MH, Bae CW. Inhibitory effect of meconium on pulmonary surfactant function tested in vitro using the stable microbubble test. *Eur J Pediatr*. 2000;159:770-4.
  84. Fiori AH, Luz JH, Fiori HH, Fiori RM. Effect of polyethyleneglycol and dextran on the stable microbubble test in surfactant containing solutions [abstract]. *Pediatr Res* 2004;55:541A.
  85. Cleary GM, Wiswell TE. Meconium-stained amniotic fluid and the meconium aspiration syndrome an update. *Pediatr Clin North Am* 1998;45:511-29.
  86. Holm BA, Notter RH. Effects of hemoglobin and cell membrane lipids on pulmonary surfactant activity. *J Appl Physiol* 1987;63:1434-42.
-

87. Kendig JW, Ryan RM, Sinkin RA, Maniscalco WM, Notter RH, Guillet R, Cox C, et al. Comparison of two strategies for surfactant prophylaxis in very premature infants: a multicenter randomized trial. *Pediatrics* 1998;101:1006-12.
88. Osborn DA, Jeffery HE, Bredemeyer SL, Polverino JM, Reid S. Targeted early rescue surfactant in ventilated preterm infants using the click test. *Pediatrics*. 2000;106:E30.
89. Morley CJ. Systematic review of prophylactic vs rescue surfactant. *Arch Dis Child* 1997;77:70F-74F.
-

---

## **9. ANEXOS**

---

## **ANEXO 1**

**Artigo para publicação em língua inglesa**

---

---

---

**Selective Surfactant Prophylaxis in Preterm Infants Born at  $\leq 31$  Weeks of Gestation Using the Stable Microbubble Test in Gastric Aspirates**

Humberto H Fiori, MD,<sup>1</sup> Carlos C Fritscher, MD, Ph.D.<sup>2</sup> and Renato M Fiori, MD, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Pontificia Universidade Católica, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil and <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Pontificia Universidade Católica, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

**Correspondence:**

Dr. Humberto H. Fiori

Department of Pediatrics, Pontificia Universidade Católica Rio Grande do Sul  
UTI Neonatal

Av. Ipiranga, 6690

90610-000 Porto Alegre, RS

Brazil

**Phone:** 55-51-33154188 **Fax:** 55-51-33396474 **Email:** fiori@pucrs.br

**Keywords:** pulmonary surfactant; respiratory distress syndrome, newborn; fetal maturity, functional.

---



**ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate the stable microbubble test (SMT) as a method to select candidates for surfactant prophylaxis for respiratory distress syndrome (RDS).

**Study design:** Gastric secretions were collected immediately after birth from infants born at 23 to 31 weeks of gestation. Newborns with  $<25$  microbubbles (MB)/mm<sup>2</sup> (low count) received prophylactic surfactant (Curosurf<sup>®</sup> 200 mg/kg). In newborns with  $\geq 25$  MB/mm<sup>2</sup> (high count) surfactant was given only after clinical and radiological confirmation of RDS (rescue therapy).

**Results:** The 98 infants studied had a mean gestational age of  $28.4 \pm 2.1$  weeks. Fifty-four (55%) had a low MB count and received prophylactic surfactant. Out of 44 infants with a high MB count three required rescue therapy (negative predictive value 93%; confidence interval 81.3-98.6%). The median interval and interquartile range between surfactant administration and birth in the prophylaxis group was 20 (17-27) minutes. Surfactant was used in 23 of 28 (82%) infants with less than 28 weeks of gestation and in 34 of 70 (49%) infants between 28 and 31 weeks.

**Conclusions:** The SMT is useful to determine surfactant prophylaxis (<30 minutes after birth). This approach probably reduces cost and the number of unnecessary interventions. The advantage was more evident for patients between 28 and 31 weeks.

**Abbreviations:** MB microbubbles - RDS respiratory distress syndrome - SMB stable microbubbles - SMT stable microbubble test

---

## INTRODUCTION

Since its introduction 20 years ago, exogenous surfactant treatment has improved the outcome of preterm infants with respiratory distress syndrome (RDS).(1) Although the efficacy of this treatment is well established at the present, some questions have not been fully answered as yet, including the optimal timing for surfactant administration.

However, it seems clear that early surfactant administration to infants with RDS requiring assisted ventilation leads to decreased risk of acute pulmonary injury and reduces neonatal mortality or chronic lung disease as compared to delayed rescue surfactant treatment.(2)

Two major strategies for the use of surfactant in RDS have been proposed: rescue therapy (treatment of established disease), and prophylaxis (immediate administration after birth to infants at high risk for developing RDS). The rationale for the prophylactic approach was first provided by studies in animals. A more homogeneous distribution of surfactant was observed when the substance was administered to fluid-filled lungs.(3) Additionally, acute lung injury was shown to occur after short periods of mechanical ventilation in surfactant-deficient animal models,(4)(5) while lungs with normal amounts of surfactant tolerate long periods of mechanical ventilation without significant damage.(6) Some damage to the lungs of surfactant-deficient animals was observed as early as 5 minutes after the onset of ventilation.(7) It has also been shown that mechanical ventilation in surfactant-deficient lungs decreases the response to surfactant therapy.(8)

---

Many randomized controlled trials have compared the effects of prophylactic surfactant administration with rescue therapy in preterm babies with RDS.(9-15) Data from these trials were reviewed in a meta-analysis, which concluded that prophylactic surfactant administration was associated with a significant decrease in the risk of pneumothorax, pulmonary interstitial emphysema and death in infants born at less than 30-32 weeks of gestation.(16)

Although giving surfactant very soon after birth to these infants based only on the high risk of developing RDS seem more efficacious than rescue therapy, a great proportion of preterm infants with less than 30-32 weeks of gestational age have enough surfactant in the lungs and do not need to be treated. Exogenous surfactant use requires tracheal intubation and mechanical ventilation, which carries potential risks and costs that cannot be ignored. Thus, the potential usefulness of a test to diagnose RDS immediately after birth is clear, as it could limit surfactant prophylaxis to a group of infants at higher risk of developing the disease. Nevertheless, there are no consistent reports of lung maturity testing to guide prophylaxis.

The stable microbubble test (SMT), first proposed by Pattle et al,(17) is based on the ability of surfactant-containing solutions to form stable microbubbles (SMB) when agitated through a Pasteur pipette. The test is simple and quick. It can be performed in very small samples of amniotic, tracheal or gastric fluid.(18-21) In gastric fluid, which is easy to obtain, it is accurate enough to be helpful in selecting patients for surfactant prophylaxis.(18-19)

In a previous study, we showed that the best cut-off point for the SMT diagnosis of RDS in non intubated preterm babies born at less than 35 weeks of

---

gestation was 15 microbubbles (MB)/mm<sup>2</sup>. The sensitivity of the SMT was above 90% for a cut-off point of 25 MB/mm<sup>2</sup>.<sup>(19)</sup> Thus, we hypothesized that the use of the SMT in gastric aspirates immediately after birth would discriminate a significant proportion of patients not needing surfactant therapy while at the same time would allow surfactant administration very early after birth to a population at very high risk for RDS. The objective of the present study was to evaluate the practical results of surfactant prophylaxis based on the SMT.

## **METHODS**

The study was conducted at Hospital São Lucas (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) and at Hospital Moinhos de Vento. The first is a university hospital providing care mainly to patients from the public health system, and the second is a private hospital with a neonatal intensive care unit open to pediatricians of the community. Both are located in the city of Porto Alegre, Brazil. The study was approved by the research ethics committee at the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

After October 2002, the group of neonatologists working at the university hospital's neonatal intensive care unit started to treat preterm babies born at less than 32 weeks of gestation with prophylactic surfactant based on the result of the SMT. These patients were prospectively followed. The same physicians introduced this routine to their patients at the private hospital, and those patients were included in the study.

---

---

**SMT-based routine for prophylaxis**

Inborn infants at 23 - 31 weeks of gestation had their gastric secretion collected as soon as possible in the delivery room. The SMT was performed in the intensive care unit by the neonatologists on duty or neonatology residents previously trained on the technique, present at the time of birth. If the microbubble count was below 25 MB/mm<sup>2</sup> the infant was elected to receive surfactant prophylaxis (200 mg/kg of Curosurf<sup>®</sup>) upon arrival in the intensive care unit. If the count was equal or above 25MB/mm<sup>2</sup>, the infant was clinically followed and was eligible to receive rescue surfactant therapy if the chest film was compatible with RDS and PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio was <175 mmHg. All patients were eligible for further doses of 100mg/kg of surfactant if the PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio was <200 mmHg.

**Inclusion and exclusion criteria**

Patients born at 23-31 weeks of gestation and weighing at least 500g, treated with prophylactic surfactant according to the SMT-based routine from October 2002 to December 2003 were included. Gestational age at delivery was determined according to the date of the last menstrual period, unless the gestational age indicated by an ultrasound obtained before 20 weeks of gestation or by the New Ballard examination differed from that determined from the last menstrual period by more than 2 weeks. Patients with major malformations incompatible with life were not included.

**Stable microbubble test**

The SMT was performed according to the method described by Pattle et al. with minor modifications. An aliquot of gastric aspirate was drawn 5 cm into the stem of a Pasteur pipette (11.5 cm stem, 1 mm diameter, 2 ml rubber cap)

---

---

and placed over the marked area of a count chamber (Neubauer Improved Bright-Line, without the coverslip). With the pipette in a vertical position and the tip almost touching the count chamber, the aliquot was suctioned in and expelled quickly for 20 times, and then expelled over the count chamber, which was immediately inverted and placed under a microscope, forming a hanging drop. After 4 minutes, the count chamber was examined under a magnification of 10x10 and the microbubbles (bubbles with a diameter smaller than 15  $\mu\text{m}$ ) were counted with the help of an optical scale. Five of the 25 squares forming 1  $\text{mm}^2$  were counted (one square on each quadrant and the central square). If counting was not possible in the central square, mostly because of a high concentration of bigger bubbles, additional peripheral fields were counted.

The test was done as a single measurement without blinding, for practical reasons. Our previous studies have shown a Kappa coefficient of agreement of 0.88 for different observers performing the SMT at a cutoff of 35MB/ $\text{mm}^2$ .(22).

### **Comparison with previous clinical results**

In the University Hospital, clinical data from patients of the same gestational age (23-31weeks) born in the previous two years period, when rescue therapy was the current routine, were compared with data from the period of the new routine. The mortality rate and occurrence of main complications were compared using intention to treat analysis, meaning that all the patients, independently of the application or not of the proposed routine for the period, were included. The comparison was not performed for patients from Hospital Moinhos de Vento, since there was no proposed routine before the introduction of

---

prophylactic surfactant therapy, and also because a significant proportion of patients had not been assisted by University Hospital neonatologists.

### **Statistical analysis**

Quantitative variables were described using mean and standard deviation. In the presence of asymmetry, we used the median and interquartile range – IQR (percentile 25 –75). Categorical data (including proportion of patients receiving surfactant) were presented as percentages. The significance level was set to  $\alpha = 0.05$ . When comparing the two groups, t-test was used for numeric variables and Fisher's exact test for the comparison of proportions. Data were analyzed and processed with SPSS v11.5.

### **RESULTS**

From October 2002 to December 2003 the physicians responsible for the routine of prophylaxis based on the SMT took care of a total of 113 patients between 23 and 31 weeks gestation who were eligible to be submitted to the routine: 90 in Hospital São Lucas and 23 in Hospital Moinhos de Vento. However, in 15 patients, all from Hospital São Lucas, the routine was not followed or it was partially followed. So, a total of 98 patients filled the criteria to be included in the study. The characteristics of these 98 patients are shown in Table 1. The routine failed to be applied in those 15 cases because either the SMT was not done (10 patients) or the decision of the attending physician was not to administer surfactant immediately after birth in spite of the low microbubble count (5 patients). Of the patients in whom the SMT was not performed 1 received

---

---

prophylaxis before the collection of gastric aspirate, 1 was not cared by the team of neonatologists, 4 had their samples considered improper to do the test (very bloody secretion or insufficient volume) and 4 patients had very mild symptoms so that the attending physician considered unnecessary to perform the test. Of the 9 patients in whom the attending physician took the personal decision of not doing the test (4 patients) or not to administer surfactant (5 patients), in spite of the established routine, 3 ended up needing surfactant.

Of the 98 patients submitted to the proposed routine, 44 (45%) did not receive prophylactic surfactant because the SMT result was  $\geq 25\text{MB}/\text{mm}^2$ . Only 3 of these patients ended up needing rescue surfactant treatment. The negative predictive value of the SMT to detect RDS was 93.2% (CI95% 81.3 – 98.6). The distribution of the patients according to the result of the test is illustrated in figure 1. The proportion of surfactant use in the study population according to gestational age is presented in figure 2.

The use of surfactant according to the type of respiratory support required in the delivery room was also studied. Eighty-two percent of the intubated babies, 50% of the bag and mask ventilated babies and 40% of the babies who did not require ventilation ended up receiving surfactant according to the proposed routine.

The median time between delivery and surfactant administration was 20 minutes (IQR 17 – 27). The minimum interval was 10 minutes, and 90 patients (92%) received surfactant before 30 minutes of life.

At the University Hospital, data from all patients meeting the inclusion criteria for the new routine of SMT-based prophylaxis (study group) were

---



compared to all patients meeting the same criteria during the 2 years before the introduction of the new routine (historical control group). Patients with pulmonary hypoplasia were excluded (one in the study group and 3 in the control group). The characteristics of the patients and the main outcome variables are shown in table 2.

Concerning the use of exogenous surfactant, during the study period 53 of 89 patients (59.3%) received the medication, as compared to 36 out of 96 (37.5%) in the previous period ( $p=0.002$ ).

## **DISCUSSION**

The present study represents, to our knowledge, the first report of results obtained with the use of a bedside laboratory test instead of gestational age alone to support the decision to give prophylactic surfactant (<30 minutes from birth). The overall results are compatible with previous findings on accuracy of the SMT in gastric aspirates to detect RDS and confirm the hypothesis that the test can be used as an alternative to surfactant prophylaxis based only on gestational age.

The cut-off point of 25 MB/mm<sup>2</sup> was chosen because we wanted to ensure a low false-negative rate. In our previous experience, the sensitivity of this cut-off was more than 90% to predict RDS in non-intubated preterm babies born at less than 35 weeks of gestation (19). Although the present sensitivity cannot be calculated we can infer that probably it is in the same range.

In our population, almost half of the preterm babies born at less than 32 weeks were correctly identified as being mature, and only 3 patients out of 98

---

required rescue surfactant therapy. The negative predictive value of the SMT was high. Compared with a hypothetical approach of giving prophylactic surfactant to all babies of the same gestational age, the amount of surfactant administered would probably be much lower with the proposed routine.

The three patients that required rescue treatment had mild RDS, and all survived. Two of them achieved the criteria for surfactant use very late (many hours after birth). None of the three babies needed more than one dose of surfactant, suggesting that they probably had some endogenous surfactant production. It is possible that the prognosis of patients with borderline microbubble count and who eventually develop RDS is good with both prophylaxis and rescue therapy.

In our study the median time for administration of surfactant was 20 minutes after birth. This interval usually still qualifies treatment as prophylactic. Although immediate prophylaxis theoretically results in less lung damage, there is evidence that a delay of a few minutes does not reduce the clinical benefit of prophylaxis. Kendig et al. (23) published a study comparing prophylactic surfactant administration immediately after birth and after at 10 minutes. Those authors suggest that there is no advantage to the immediate use of surfactant. In the present report, surfactant was used as early as 10 minutes after birth. It is very likely that the median interval could be reduced to close to 10 minutes if the test and the surfactant administration were carried out in the delivery room, instead of the neonatal unit.

---

The use of the SMT prevented unnecessary administration of surfactant in a significant proportion of babies, especially in patients born between 28 to 31 weeks of gestation.

In the most immature babies (less than 28 weeks) there is a general tendency to use surfactant prophylaxis because RDS is highly prevalent and because the majority of infants need intubation during delivery room resuscitation. In the present experience, only around 20% of these patients were spared from receiving exogenous surfactant. It might be argued that the small proportion of surfactant-sufficient infants identified by the SMT would not justify performing the test in all patients. If the baby is intubated and positive pressure-ventilated, waiting for SMT results, even if only for a few minutes, may not lead to the best possible clinical outcome. On the other hand, it could be argued that sparing babies, even only a few of them, from being intubated or mechanically ventilated, may be advantageous, and thus the wait for SMT results would be worth.

Osborn et al. (24) performed the click test on tracheal aspirates of ventilated infants born at up to 36 weeks of gestation to target early rescue surfactant treatment. In infants < 28 weeks, those authors reported a reduction in the proportion receiving surfactant, from 79 to 48% when compared to the usual clinical and radiographic criteria, as well as a decrease in the median time of surfactant administration, from 159 to 50 minutes. Like the SMT, the click test is a quick method for evaluating surfactant function. The reduction in surfactant use within this very immature gestational age range was more prominent in the study by Osborn et al. than in the present report. Tracheal fluid is probably more

---

representative of alveolar surfactant production than gastric fluid, and thus it could be more useful to guide the administration of surfactant prophylaxis in patients who are intubated in the delivery room immediately after birth. The SMT also seems highly accurate when performed in tracheal fluid.(20,25) The main limitations of using tracheal fluid are the need to intubate and the higher complexity to obtain the sample.

In the group of patients born between 28 and 31 weeks of gestation, prophylaxis based only on gestational age is less frequently used. But even within this gestational age range, it has been suggested that indiscriminate prophylactic therapy is clinically superior to rescue therapy.

Kattwinkel et al. published a randomized controlled trial comparing prophylaxis versus rescue surfactant treatment in 1,248 infants born between 29 and 32 weeks of gestation. Even in this more mature population, the investigators were able to detect a reduction in mortality or need of supplemental oxygen at 28 days, although most of the reduction occurred in babies born at less than 31 weeks of gestation.(12) In this age group, surfactant administration is based on a wide range of criteria, from mild clinical signs to the presence of severe disease (e.g., mechanical ventilation plus characteristic chest film). It is known that many preterm infants have initial respiratory distress and difficulties in establishing spontaneous ventilation, but that they improve and normalize breathing after a short time. Additionally, chest films taken right after birth often show a granular pattern representing intra-alveolar fluid, which may closely resemble the radiographic RDS pattern. The SMT could be very useful in this subgroup of patients, allowing prophylactic treatment to be given to a very

---

selected population at high risk of developing RDS. This selective prophylactic approach may even prove superior to broad prophylaxis and to other modalities of rescue therapy. If the delay in surfactant administration is short, there is no reason to believe that the broad prophylaxis would result in better clinical outcome.

The patients who were born in the University Hospital during the selective SMT-based prophylaxis period were compared to a group of patients born in the same hospital in the two years before the prophylactic routine was introduced. In pre-prophylaxis period, rescue therapy was the routine; patients were selected to receive surfactant based on the same criteria used for the patients with high MB count in the period of the SMT-based prophylaxis (characteristic chest films and  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  ratio  $< 175$  mmHg) A reduction in mortality rate was observed for patients born between 23-31 weeks of gestation in the prophylaxis period, which was not statistically significant. In the group of patients weighing less than 1,000g the mortality was also lower, with borderline significance. In a systematic review of randomized trials, Morley estimated that prophylaxis saves 7 extra lives for every 100 patients treated. (26) In a high mortality setting, it is possible that the impact of prophylaxis on survival might be even greater.

The higher incidence of supplemental oxygen requirement at 28 days in the period of the SMT-based prophylaxis may be explained by the survival of a higher number of the more immature patients in the period of the new routine.

Our conclusions concerning this comparison are limited by the insufficient number of patients studied and by the periods of observation.

---

In conclusion, we have shown that the SMT can be used in clinical settings to determine surfactant administration still in a prophylactic basis (within 30 minutes of birth). In comparison to indiscriminate prophylaxis, this approach reduces the number of patients receiving unnecessary surfactant and probably reduces costs. The advantage is clear for patients born between 28 and 31 weeks of gestation.

---

---

## References

1. Soll RF, McQueen MC. Respiratory distress syndrome. In: Sinclair JC, Bracken MN, editors. *Effective care of the newborn infant*. Oxford: Oxford University Press; 1992. p 325-58.
  2. Yost CC, Soll RF. Early versus delayed selective surfactant treatment for neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD001456. Review.
  3. Jobe A, Ikegami M, Jacobs H, Jones S. Surfactant and pulmonary blood flow distributions following treatment of premature lambs with natural surfactant. *J Clin Invest*. 1984;73:848-56.
  4. Ikegami M, Wada K, Emerson GA, Rebello CM, Hernandez RE, Jobe AH. Effects of ventilation style on surfactant metabolism and treatment response in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:638-44.
  5. Jobe AH, Ikegami M. Mechanisms initiating lung injury in the preterm. *Early Hum Dev*. 1998;53:81-94.
  6. Jonson B. Ventilation patterns, surfactant and lung injury. *Biol Neonate*. 1997;71 Suppl 1:13-7.
  7. Nilsson R, Grossmann G, Robertson B. Bronchiolar epithelial lesions induced in the premature rabbit neonate by short periods of artificial ventilation. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*. 1980;88:359-67.
  8. Bjorklund LJ, Ingimarsson J, Curstedt T, John J, Robertson B, Werner O, Vilstrup CT. Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. *Pediatr Res*. 1997;42:348-55.
  9. Bevilacqua G, Parmigiani S, Robertson B. Prophylaxis of respiratory distress syndrome by treatment with modified porcine surfactant at birth: a multicentre prospective randomized trial. *J Perinat Med*. 1996;24:609-20.
  10. Dunn MS, Shennan AT, Zayack D, Possmayer F. Bovine surfactant replacement therapy in neonates of less than 30 weeks' gestation: a randomized controlled trial of prophylaxis versus treatment. *Pediatrics*. 1991 ;87:377-86.
  11. Egberts J, de Winter JP, Sedin G, de Kleine MJ, Broberger U, van Bel F, Curstedt T, Robertson B. Comparison of prophylaxis and rescue treatment
-

- with Curosurf in neonates less than 30 weeks' gestation: a randomized trial. *Pediatrics*. 1993;92:768-74.
12. Kattwinkel J, Bloom BT, Delmore P, Davis CL, Farrell E, Friss H, Jung AL, King K, Mueller D. Prophylactic administration of calf lung surfactant extract is more effective than early treatment of respiratory distress syndrome in neonates of 29 through 32 weeks' gestation. *Pediatrics* 1993;92(1):90-8.
  13. Kendig JW, Notter RH, Cox C, Reubens LJ, Davis JM, Maniscalco WM, Sinkin RA, Bartoletti A, Dweck HS, Horgan MJ, et al. A comparison of surfactant as immediate prophylaxis and as rescue therapy in newborns of less than 30 weeks' gestation. *N Engl J Med*. 1991;28;324:865-71.
  14. Merritt TA, Hallman M, Berry C, Pohjavuori M, Edwards DK 3rd, Jaaskelainen J, Grafe MR, Vaucher Y, Wozniak P, Heldt G, et al. Randomized, placebo-controlled trial of human surfactant given at birth versus rescue administration in very low birth weight infants with lung immaturity. *J of Pediatr*. 1991;118(4 ( Pt 1)):581-94.
  15. Walti H, Paris-Llado J, Breart G, Couchard M. Porcine surfactant replacement therapy in newborns of 25-31 weeks' gestation: a randomized, multicentre trial of prophylaxis versus rescue with multiple low doses. The French Collaborative Multicentre Study Group. *Acta Paediatr*. 1995;84:913-21.
  16. Soll RF, Morley CJ. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(2):CD000510. Review.
  17. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, Currie JO, Parsons JH, Sutherland PD: Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 1979;86:615-22.
  18. Chida S, Fujiwara T: Stable microbubbles test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: II. Prospective evaluation of the test on amniotic fluid and gastric aspirate. *Eur J Pediatr* 1993;152:152-56.
-



- 
19. Fiori HH, Varela I, Justo AL, Fiori RM: Stable microbubble test and click test to predict respiratory distress syndrome in preterm infants not requiring ventilation at birth. *J Perinat Med* 2003;31:509-14.
  20. Boo NY, Cheong KB, Cheong SK et al: Usefulness of stable microbubble test of tracheal aspirate for the diagnosis of neonatal respiratory distress syndrome. *J Paediatr Child Health* 1997;33:329-34.
  21. Friedrich W , Haufe M , Schmalisch G et al: The stable microbubble test on tracheal aspirate samples from newborn babies for diagnosis of surfactant deficiency and/or surfactant malfunction. *Biol Neonate* 1998;73:10-8.
  22. Pereira MR, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM. Inter- and intra-observer agreement and the effect of freezing in the stable microbubble test performed in gastric aspirates of newborns [abstract]. *Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Workshop on Surfactant Replacement*; 2002 May 24-26; Cagliari, Italy.
  23. Kendig JW, Ryan RM, Sinkin RA, Maniscalco WM, Notter RH, Guillet R, et al. Comparison of two strategies for surfactant prophylaxis in very premature infants: a multicenter randomized trial. *Pediatrics* 1998;101:1006-12.
  24. Osborn DA, Jeffery HE, Bredemeyer SL, Polverino JM, Reid S. Targeted early rescue surfactant in ventilated preterm infants using the click test. *Pediatrics*. 2000;106(3):E30.
  25. Seitz EE, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM. Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome [abstract]. *Pediatr Res* 2004;55(4):557A.
  26. Morley CJ. Systematic review of prophylactic vs rescue surfactant. *Arch Dis Child* 1997 77(1): 70F-74F.
-

**Table 1.** Characteristics of 98 infants of the SMT-based surfactant prophylaxis period

---

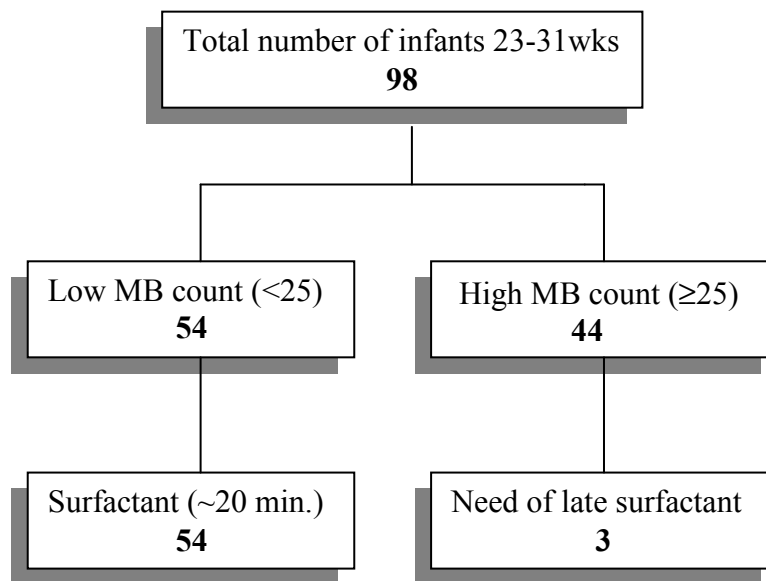
Birth weight, grams*	1145±376
Gestational age, weeks*	28.5±2.1
Male Sex, n(%)	54(55.1)
Cesarian section, n(%)	66(67.1)
Apgar 1 minute*	5.7±2.5
Apgar 5 minutes*	7.8±1.6
PROM <sup>†</sup> >24h, n(%)	19(19.4)
Any antenatal steroid, n(%)	87(88.8)
Maternal hypertension, n(%)	23(23.5)
Maternal diabetes, n(%)	1(1)

---

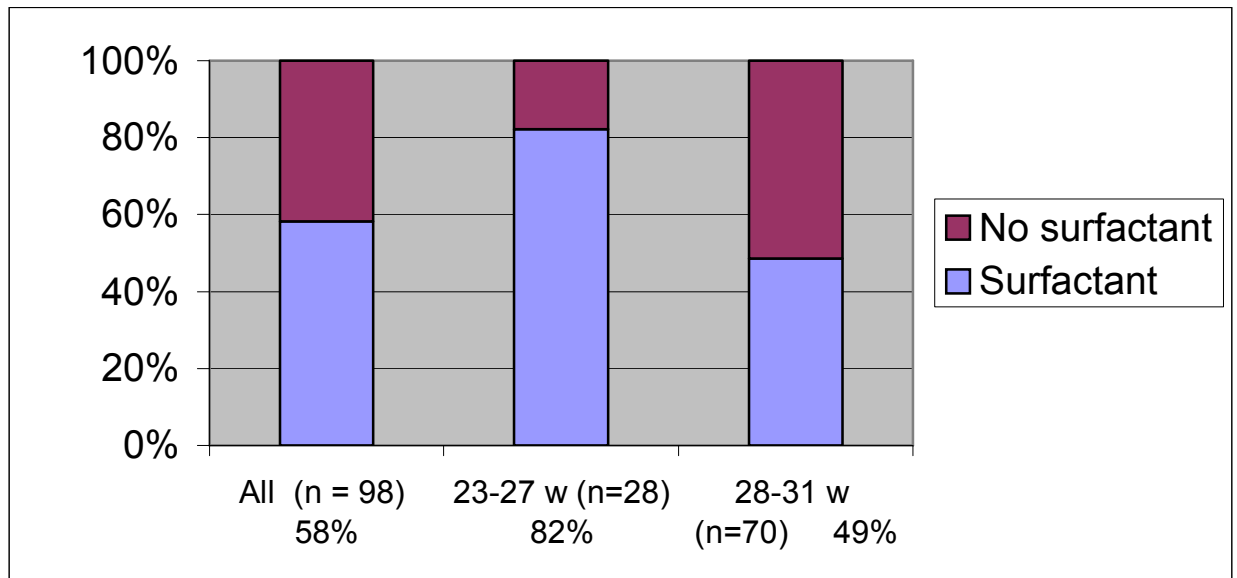
\* Mean ± standard deviation

† PROM = prolonged rupture of membranes

---



**Figura 1.** Distribution of the patients according the MB count.



**Fig 2.** Proportion of patients receiving surfactant according to gestational age.

**Table 2.** Baseline characteristics and outcome variables of the patients of the SMT-based surfactant prophylaxis period and the patients of the historical control period receiving rescue surfactant therapy\*

	Study group (n = 89) †	Historical control (n = 96) †	P value
Birth weight, grams‡	1125±398	1171±399	0,43
Gestational age, weeks‡	28.3±2.3	28.8±2.5	0,11
Any antenatal steroid, n(%)	73(82)	69(71.9)	0,12
Mortality, n(%)	18(20.2)	27(28.1)	0,23
Mortality in < 1,000 g, n(%)	17/43(38.6)	22/37(59.5)	0,08
Pneumothorax, n(%)	4(4.5)	6(6.3)	0,75
Oxygen at 28 days, n(%)	20(22.5)	9(9.4)	0,02

\* Refers only to patients receiving care at the University Hospital; † Except for mortality < 1,000g; SD = Standard deviation; NS = statistically not significant; ‡ Mean ± standard deviation.

**ANEXO 2**

**Artigo Journal of Perinatal Medicine, 2003**

---

## Original articles – Newborn

J. Perinat. Med.  
31 (2003) 509–514

## Stable microbubble test and click test to predict respiratory distress syndrome in preterm infants not requiring ventilation at birth

Humberto H. Fiori<sup>1</sup>, Ivana Varela<sup>2</sup>, Alexandre L. Justo<sup>3</sup>, and Renato M. Fiori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), and Hospital Mãe de Deus, Porto Alegre, <sup>2</sup>Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre, <sup>3</sup>Hospital São Rafael, Novo Hamburgo, and Hospital Centenário, São Leopoldo, Brazil

### 1 Introduction

Pulmonary surfactant deficiency is known to be associated with respiratory distress syndrome (RDS) in premature infants. The absence or presence of surfactant in low amounts in organic fluids such as the amniotic fluid and gastric and tracheal secretions has been shown to have a good correlation with the future development of RDS. Among the most common tests for assessing surfactant function are the Clements' test [3], the lecithin/sphingomyelin ratio [7] and the phosphatidylglycerol dosage [6], measured mainly in amniotic fluid. Two additional tests, the click test (CT) [11] and the stable microbubble test (SMT) [12, 13] have the advantage of being fast and easy to perform, requiring simple equipment.

Prophylactic or early surfactant treatment has been recommended for babies based on gestational age alone [4, 5, 8, 9, 10, 16]. However, ideally, surfactant should be administered very early after birth only to premature babies with immature lungs. Clinical studies have suggested that performing the CT and SMT in amniotic fluid and gastric aspirates may be useful to predict RDS, thus preventing the administration of surfactant to infants who do not require this treatment [1, 2, 15].

The objective of this study was to determine the usefulness of the SMT and CT in gastric aspirates obtained soon after birth to predict RDS in preterm babies not requiring ventilation and to compare the predictive value of these two tests.

### 2 Patients and methods

A prospective study was carried out with a cohort of preterm babies born in five hospitals in the greater Porto Alegre area, southern Brazil, from March 1998 to October 1999. Infants with gestational age between 24 and 34 weeks, not requiring mechanical ventilation at birth, were admitted in the study. Gastric secretion was collected during routine aspiration in the first hour of life. Newborns with severe congenital malformation, hydrops fetalis, and those who received surfactant before sampling were excluded. Gastric secretions were kept under refrigeration for up to 24 hours and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for later analysis. The process of freezing has been previously used and does not seem to affect the results of the CT and SMT [14, 15]. The same samples were used for both tests.

The babies were followed for 24 hours. RDS diagnosis was made when the infant developed tachypnea, chest retractions, grunting and required a fraction of inspired oxygen ( $F_i\text{O}_2$ ) of 0.40 or more to achieve transcutaneous oxygen saturation between 90 and 95%, and in the presence of a characteristic chest film with reticular granularity and air bronchograms.

The author performing the CT and SMT (HHF) was blinded to the clinical data of the patients.

#### 2.1 Stable microbubble test

The SMT was adapted from Pattle et al. [13].

Samples were thawed at room temperature and gently mixed for homogenization. One 40  $\mu$ l aliquot of gastric secretion was suctioned into a Pasteur pipette (Pirex, Corning Laboratories Science Co, New York, USA). Using a 2 ml rubber cap, the aliquot was suctioned and expelled over an objective micrometer slide with a 10  $\mu$ m scale (Olympus, Tokyo, Japan). This was repeated about 20 times in quick succession (around 6 seconds). The slide was immediately inverted to form a hanging drop. After 4 minutes, the number of microbubbles measuring less than 15  $\mu$ m in each  $\text{mm}^2$  was counted, using a magnification of 100 x. Microbubbles were difficult to count in 10% of the samples due to the large number of big bubbles. In this case it was necessary to count the bubbles on more peripheral fields.

## 2.2 Click test

The CT was adapted from Skelton and Jeffery [15]. One 0.2 ml aliquot was suctioned into a test tube (12 x 75mm) using an autopipette. In about half of the samples, the secretion was too thick to be suctioned, and a few drops of normal saline were added. The same volume of 95% ethanol was added into the tube and the mixture was vigorously shaken for 15 seconds or until bubbles were formed. Using a Pasteur pipette, a small sample of bubbles was gathered, placed on a coverslip, and immediately inverted into air-free water on a

cavity slide. The bubbles were observed under a magnification of 100 and 400 x. The absence of clicking (bubbles shrinking and expanding repeatedly) was considered as indicative of surfactant deficiency. All negative click tests were repeated.

## 2.3 Statistical analysis

Sensitivity and specificity and 95% confidence intervals (95% CI) were determined. A receiver operating characteristic (ROC) curve was obtained for different cut-off points of the SMT. The chi-square or t-test were used to compare the variables. P values < 0.05 were considered to be significant. The study was approved by the Ethics Committee at Hospital São Lucas (PUCRS), Porto Alegre, Brazil, and by the directors of the hospital units participating in the study.

## 3 Results

A total of 115 patients who initially fulfilled the inclusion criteria had their gastric secretions collected and stored. From those, five were excluded: two received surfactant before a diagnosis of RDS could be established; in one patient the material collected was not sufficient to perform at least one of the tests; and the gestational age of two patients was above 34 weeks, according to the physical examination. Therefore, 110 patients were analyzed, 40 with gestational age < 32 weeks and 70 with

**Table I.** Characteristics of the infants with and without respiratory distress syndrome\*

Characteristic	RDS (n = 23)	Non RDS (n = 87)	P value
Gestational age (weeks)	30.7 (24–34)	32.2 (26–34)	0.001**
Birth weight (grams)	1440 $\pm$ 282	1642 $\pm$ 451	0.04**
Apgar score 1 minute	6.6 $\pm$ 1.8	7.0 $\pm$ 1.9	0.61
Apgar score 5 minutes	8.2 $\pm$ 1.2	8.5 $\pm$ 1.1	0.29
Male gender	17 (73.9%)	43 (49.4%)	0.04**
Cesarean section	14 (60.9%)	62 (71.3%)	0.34
Antenatal corticosteroids	4 (17.4%)	37 (42.5%)	0.048**
Intrauterine growth retardation	1 (4.3%)	15 (17.2%)	0.21
Oligohydramnios	5 (21.7%)	20 (23.0%)	0.88
Maternal diabetes mellitus	0	3 (3.4%)	0.49
Hypertension***	6 (26.1%)	22 (25.3%)	0.94

\* Gestational age is expressed as mean and range. Other results are expressed as mean $\pm$ standard deviation or number (%) of patients. RDS = respiratory distress syndrome.

\*\*Statistically significant difference.

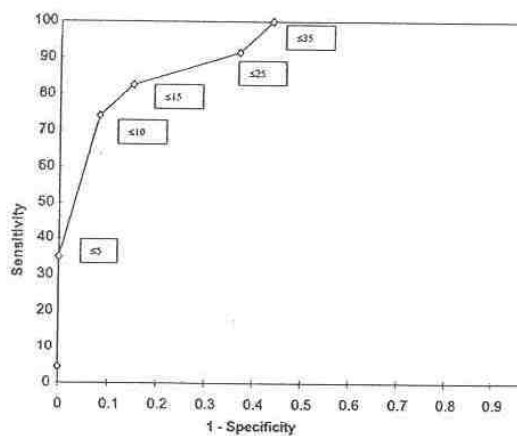
\*\*\* Includes preeclampsia and eclampsia.



**Table II.** Performance of the click test and the stable microbubble test in gastric aspirates to predict RDS\*

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)
Click test (n = 104)	100 (81.5–100)	45.1 (34.2–56.5)	32.8 (22.1–45.5)	100 (88.3–100)
SMT $\leq$ 10 mb/mm <sup>2</sup>	73.9 (51.3–88.9)	92.0 (83.6–96.4)	70.8 (48.8–86.6)	93.0 (84.9–97.1)
SMT $\leq$ 15 mb/mm <sup>2</sup>	82.6 (60.5–94.3)	85.1 (75.4–91.5)	59.4 (40.8–75.8)	94.9 (86.7–98.3)
SMT $\leq$ 20 mb/mm <sup>2</sup>	82.6 (60.5–94.3)	69.0 (58.0–78.2)	41.3 (27.3–56.7)	93.8 (84.0–98.0)
SMT $\leq$ 25 mb/mm <sup>2</sup>	91.3 (70.5–98.5)	59.1 (48.4–69.1)	35.6 (23.9–49.2)	96.5 (86.8–99.4)
SMT $\leq$ 35 mb/mm <sup>2</sup>	100 (82.2–100)	56.3 (45.3–66.8)	37.7 (25.9–51.1)	100 (90.9–100)

\* Values are shown in percent and (95 % confidence intervals). SMT = stable microbubble test.



**Figure 1.** Stable microbubble test. Receiver operating characteristic curve relating sensitivity and specificity (rate of false-positive results) for different cut-off points.

gestational age between 32 and 34 weeks. In six of the 110 patients, only the SMT could be performed, since the CT requires a larger volume of gastric secretion.

Twenty-three patients (20.9 %) fulfilled the criteria for diagnosis of RDS. The main characteristics of the study population are shown in table I.

A total of 82 samples (75.4 %) of gastric fluid were clear; 21 (19.1 %) were stained with blood; 6 (5.5 %) by meconium and 1 (0.9 %) contained pus.

Table II shows the performance of CT and SMT for predicting RDS. The ROC curve for SMT is shown in figure 1. The best cut-off point to detect RDS was SMT  $\leq$  15 mb/mm<sup>2</sup> if equal weight was given to false-positive and false-negative results. The area under the curve was 91.7 % (95 % CI:

85.8 %–97.6 %). The p value for 50 % comparative significance was  $<$  0.0001.

There were no statistical differences in the separate analysis of the subgroups of babies with gestational age  $<$  32 and 32–34 weeks when comparing sensitivity and specificity of the CT with the total group (sensitivity: 100 % for both subgroups; specificity: 41.7 and 46.6 respectively).

The same was also true for the SMT in these two subgroups. Of the 14 infants with gestational weight  $<$  32 weeks who developed RDS, 11 had an SMT  $\leq$  10 mb/mm<sup>2</sup> (sensitivity: 78.6 %) and 13 had an SMT  $\leq$  15 mb/mm<sup>2</sup> (sensitivity: 92.9 %). Among the 26 infants younger than 32 weeks who did not develop RDS, three had SMT  $\leq$  10 mb/mm<sup>2</sup> (specificity: 88.5 %) and four had SMT  $\leq$  15 mb/mm<sup>2</sup> (specificity: 84.6 %). For the subgroup of patients between 32 and 34 weeks gestation, taking the cut points of 10 mb/mm<sup>2</sup> and 15 mb/mm<sup>2</sup>, sensitivity of the SMT was 66.7 % for both and specificity was 93.4 % and 85.2 % respectively.

For the statistical comparison between CT and SMT, only the 104 patients in whom both tests were performed were considered. For a cut-off value  $\leq$  10 mb/mm<sup>2</sup>, SMT was less sensitive than CT (72.7 % vs. 100 %, respectively;  $p = 0.01$ ), but more specific (91.5 % vs. 45.1 %, respectively;  $p <$  0.001). When 35 mb/mm<sup>2</sup> was used as the cut-off point, both tests had the same sensitivity (100 %) and the difference in specificity (56.1 % for SMT; 45.1 % for CT) was not significant ( $p = 0.16$ ). The overall accuracy of the SMT was significantly better than that of the CT (87.5 % vs. 64.4 %;  $p <$  0.001).

In most patients presenting clicking, the SMT

count was above 50 mb/mm<sup>2</sup>. Only three out of 37 patients with an SMT count  $\leq$  35 mb/mm<sup>2</sup> presented clicking. Results were not affected if the samples stained by meconium, blood or pus were excluded.

#### 4 Discussion

The aim of this study was to assess the usefulness of two tests that have been suggested as potentially helpful to predict RDS. Preterm infants with respiratory failure immediately after birth, requiring intubation and ventilatory support in the delivery room frequently receive surfactant before the diagnosis of RDS is confirmed. However, this would make the evaluation of the proposed endpoint impossible. Therefore, only babies who had not been ventilated soon after birth were included in our study. As expected, this inclusion criterion reduced the number of very premature infants, imposing a limitation. However, it is possible that most babies in this category would in fact benefit from surfactant therapy, and that a diagnostic test for lung immaturity, such as the CT or SMT, would be of limited value in very premature babies. On the other hand, infants who do not require immediate ventilatory support after birth, such as the ones included in the present study, may benefit immensely from a quick and reliable test of lung maturity to support the decision concerning surfactant administration.

In our study, the specificity of the CT was unexpectedly low, 45.1 % (34.2–56.5).

In a previous study, Skelton and Jeffery [15] reported a sensitivity and specificity of 87 % for the CT to predict RDS in infants with gestational age between 24 and 42 weeks. This variation in specificity may be attributed to differences in population and methodology. In the study by Skelton and Jeffery, a considerable number of more mature babies were included, as well as ventilated babies. The inclusion of term babies may have increased the specificity, since the occurrence of borderline surfactant production is not expected in this subset of patients. Also, in that study, patients with transient tachypnea of the newborn (TTN) were included. The inclusion of TTN patients complicates the establishment of a correlation between tests such as the CT and SMT and the need for exogenous surfactant therapy, since even in the pres-

ence of some degree of surfactant deficiency, newborns with TTN do not require surfactant. Our data show that the CT in gastric aspirates has high sensitivity but low specificity, which could lead to a large number of patients being erroneously diagnosed as requiring surfactant therapy.

Our results with the SMT were more consistent with previous reports. Chida et al. [1] evaluated the performance of the SMT in gastric secretions of preterm babies with gestational age below 35 weeks and reported a sensitivity of 63 % and a specificity of 99 % for predicting RDS based on a pre-defined cut-off value of 10 mb/mm<sup>2</sup>. They suggested the usefulness of the SMT test to establish the need for exogenous surfactant. Using the same cut-off point, we observed a sensitivity of 73.9 % and a specificity of 92 %. It is important to note that Chida et al. [1] included patients who had been ventilated at birth, which was not the case in the present study.

Although the sensitivity and specificity of the CT and SMT in the subgroups of babies of less than 32 weeks and between 32 and 34 weeks gestation were not significantly different from the total group of infants the data are not conclusive due to the small number of patients in the subsets.

As shown in our ROC curve, none of the babies with SMT > 35 mb/mm<sup>2</sup> developed RDS while specificity was around 50 %. The ROC curve also shows that the best cut-off point in our sample was  $\leq$  15  $\mu$ b/mm<sup>2</sup>. The decision concerning what cut-off point to use will depend on the expected prevalence of the disease in a given population and on what is acceptable in terms of erroneous administration of surfactant. Considering the group of patients with gestational age  $\leq$  31 weeks, which has received indication for prophylactic administration of surfactant [8, 16], the use of the SMT at a cut-off point of  $\leq$  15 mb/mm<sup>2</sup> to determine the need for surfactant would result in only 1 out of 14 infants being intubated to receive surfactant therapy without requiring it. Treatment would be delayed in only 3 out of 26 infants. On the other hand, if the decision to give prophylactic or very early treatment in these infants were based on gestational age alone, 23 out of 40 infants would have been intubated and given surfactant unnecessarily.

Although there is a possibility of an effect of the corticosteroid administration on the performance

of the CT and SMT its influence on the stable microbubble test could not be evaluated as only 4 patients whose mothers received this prophylaxis developed RDS (data not shown).

CT and SMT are both simple and quick to perform, at a cost close to zero. The better accuracy of the SMT observed in this study may be considered of clinical relevance. The SMT allows the use of different cut-off points, depending on the group of patients considered. Another advantage is that the SMT requires less volume of gastric aspirate to be performed. The CT tended to indicate lung maturity only when the SMT showed a high number of microbubbles. Using the two tests together

did not result in a significant increase in the accuracy to predict RDS.

In conclusion, both the CT and SMT, if performed immediately after birth in gastric aspirates of preterm infants, may be useful to help the decision to administer surfactant very early on in non-ventilated infants with gestational age < 35 weeks. The SMT is more useful to predict RDS in these infants. The SMT seems warranted for preterm babies who are breathing effectively soon after birth. The applicability of the SMT should be tested in controlled studies comparing surfactant prophylaxis in selected patients by the test with prophylaxis based only on gestational age.

#### Abstract

**Aims:** To determine the usefulness of the stable microbubble test (SMT) and of the click test (CT) on gastric aspirates obtained soon after birth to predict respiratory distress syndrome (RDS) in preterm babies not requiring ventilation at birth.

**Patients and methods:** The study was carried out with a cohort between 24 and 34 weeks of gestational age. Gastric secretions were collected before 1 hour of life and frozen for further analysis.

**Results:** 110 neonates were studied. For a cut-off value  $\leq 10$  microbubbles/mm<sup>2</sup> (mb/mm<sup>2</sup>) the sensitivity and specificity to predict RDS were 73.9% and 92%, respec-

tively, in the SMT. The best SMT cut-off point to predict RDS was  $\leq 15$  mb/mm<sup>2</sup> (sensitivity = 82.6%; specificity = 85.1%) if equal weight was given to false-positive and false-negative results. CT (104 samples) showed a sensitivity of 100% and a specificity of 45.1% to predict RDS. The overall accuracy of the SMT was better than the overall accuracy of the CT (87.5% vs. 64.4%;  $p < 0.001$ ) to predict RDS.

**Conclusions:** The SMT is more accurate than the CT to predict RDS in infants below 35 weeks of gestational age and may be helpful to select patients to receive surfactant.

**Keywords:** Infant, newborn; infant, premature; respiratory distress syndrome.

#### References

- [1] Chida S, T Fujiwara, M Konishi, M Sasaki: Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: II. Prospective evaluation of the test on amniotic fluid and gastric aspirate. *Eur J Pediatr* 152 (1993) 152
- [2] Chida S, T Fujiwara: Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: I. Comparisons with other predictors of fetal lung maturity in amniotic fluid. *Eur J Pediatr* 152 (1993) 148
- [3] Clements JA, AC Platzker, DF Tierney, CJ Hobel, RK Creasy, AJ Margolis, DW Thibeault, WH Tooley, W Oh: Assessment of risk of the respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in the amniotic fluid. *N Engl J Med* 286 (1972) 1077
- [4] Dunn MS, AT Shennan, D Zyack, F Possmayer: Bovine surfactant replacement therapy in neonates of less than 30 weeks' gestation: a randomized controlled trial of prophylaxis vs. treatment. *Pediatrics* 87(1991) 377
- [5] Egberts J, JP Dewinter, G Sedin, MJK Dekleinc, U Broberger, F Vanbel, T Curstedt, B Robertson: Comparison of prophylaxis and rescue treatment with Curosurf in neonates less than 30 weeks gestation: a randomized trial. *Pediatrics* 92 (1993) 768
- [6] Garite TJ, KK Yabusaki, LJ Moberg, JL Symons, T White, M Itano, RK Freeman: A new rapid slide agglutination test for amniotic fluid phosphatidylglycerol: laboratory and clinical correlation. *Am J Obstet Gynecol* 147 (1983) 681
- [7] Gluck L, MV Kulovich, RC Borer Jr, PH Brenner, GG Anderson, WN Spellacy: Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 119 (1971) 440
- [8] Kattwinkel J, BT Bloom, P Delmore, CL Davis, E Farrell, H Friss, AL Jung, K King, D Mueller: Prophylactic administration of calf lung surfactant extract is more effective than early treatment of respiratory distress syndrome in neonates of 29 through 32 weeks' gestation. *Pediatrics* 92 (1993) 90

- [9] Kendig JW, RH Notter, C Cox, LJ Reubens, JM Davis, WM Maniscalco, RA Sinkin, A Bartoletti, HS Dweck, MJ Horgan, H Roseberg, DL Phelps, DL Shapiro: A comparison of surfactant as immediate prophylaxis and as rescue therapy in newborns of less than 30 weeks' gestation. *N Engl J Med* 324 (1991) 865
- [10] Merritt TA, M Hallman, C Berry, M Pohjavuori, DK Edwards, J Jaaskelainen, MR Grafe, Y Vaucher, P Wozniak, G Heldt, J Rapola: Randomized, placebo-controlled trial of human surfactant given at birth vs. rescue administration in very low birth-weight infants with lung immaturity. *J Pediatr* 118 (1991) 581
- [11] Parkinson CE, D Harvey, D Talbert: Bubble clicking in the amniotic fluid. *Lancet* (1973) 1264
- [12] Pattle RE, CC Kratzing, CE Parkinson, L Graves, RD Robertson, GJ Robards, JO Currie, JH Parsons, PD Sutherland: Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 86 (1979) 615
- [13] Pattle RE, GJ Robards, PD Sutherland: Method for demonstrating difference between surface properties of sheep and human amniotic fluids, and attempting to predict human respiratory distress syndrome. *J Physiol* 263 (1976) 110
- [14] Pereira MR, HH Fiori, JH Luz, RM Fiori: Inter and intra-observer agreement and the effect of freezing in the stable microbubble test performed in gastric aspirates of newborns. *Proceedings of 17<sup>th</sup> International Workshop on Surfactant Replacement*. Cagliari, Italy, May 2002, p. 23
- [15] Skelton R, H Jeffery: "Click test": Rapid diagnosis of respiratory distress syndrome. *Pediatr Pulmonol* 17 (1994) 383
- [16] Walti H, J Paris-Llado, G Breart, M Couchard, And The French Collaborative Multicentre Study Group: Porcine surfactant replacement therapy in newborns of 25–31 weeks' gestation: a randomized multicentre trial of prophylaxis versus rescue with multiple low doses. *Acta Paediatr* 84 (1995) 913

Received December 23, 2003. Revised April 28, 2003. Accepted May 4, 2003.

Humberto H. Fiori, MD  
Hospital São Lucas  
Av. Ipiranga 6690, 5º andar  
CEP 90.610-000, Porto Alegre, RS  
Brazil  
Fax: +55-51-33304796  
e-mail: fiori@puers.br

**ANEXO 3**  
**Artigo Acta Paediatrica, 2001**

---

## Computerized image analysis of bubbles in gastric aspirate for prediction of respiratory distress syndrome

HH Fiori, B Linderholm<sup>1</sup>, RM Fiori and B Robertson<sup>1</sup>

Department of Pediatrics, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil; Laboratory of Surfactant Research<sup>1</sup>, Department of Surgical Sciences, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Fiori HH, Linderholm B, Fiori RM, Robertson B. Computerized image analysis of bubbles in gastric aspirate for prediction of respiratory distress syndrome. *Acta Pædiatr* 2001; 90: 1402–1404, Stockholm. ISSN 0803-5253

Gastric aspirates were obtained from 80 newborn babies (gestational age 24–34 wk). Fifteen of these babies developed respiratory distress syndrome (RDS). Bubbles were generated in the samples by vigorous suctioning and the number and size distribution of the bubbles were determined in random fields by computer-aided image analysis. Sensitivity and specificity for prediction of RDS were 87% and 78% for average diameter of bubbles (cut-off points  $>45\ \mu\text{m}$ ) and similar for the proportion and total number of microbubbles (diameter  $<20\ \mu\text{m}$ ).

**Conclusion:** Computerized image analysis of bubbles in gastric aspirate can be used for non-biased prediction of RDS in newborn babies.

**Key words:** Computer-assisted, image processing, infant, newborn, pulmonary surfactants, respiratory distress syndrome, stomach contents

HH Fiori, Division of Neonatal Medicine, Hospital São Lucas, PUCRS, Av. Ipiranga, 6690, 5<sup>o</sup> andar, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90610-000 (Fax: +55 51 330 4796, e-mail. [fiori@pucrs.br](mailto:fiori@pucrs.br))

There is a renewed interest in quick tests for the assessment of lung maturity in newborn babies, as there is now evidence that very immature infants may benefit from the administration of surfactant soon after birth (1). However, prophylactic administration of surfactant based on gestational age only means that some chronologically preterm infants with accelerated lung maturation will undergo tracheal intubation and receive surfactant without really needing it. To differentiate these babies, Berggren et al. (2,3) developed a computerized program to assess the size distribution of bubbles formed in surfactant-containing fluids. The present study evaluated the sensitivity and specificity of such automatic measurements for the prediction of respiratory distress syndrome (RDS) in gastric aspirates from newborn babies of less than 35 wk gestation.

### Patients and methods

Eighty-two newborn infants with gestational age 24–34 wk born at the Hospital São Lucas, Porto Alegre, Brazil, and not ventilated before being included in the study, had gastric aspirates collected before 30 min of life. Twenty-six babies were below 32 wk and 11 below 30 wk of gestation. The babies were followed up to 24 h and were diagnosed as having RDS if they needed an inspiratory oxygen fraction ( $F_{iO_2}$ ) of 0.40 or more to reach a transcutaneous oxygen saturation between 90 and 95%, and had a characteristic chest film with

reticulogranularity and air bronchograms. Fifteen babies fulfilled these criteria and 13 of these were treated with surfactant.

The gastric aspirates were stored in a freezer at  $-20^\circ\text{C}$ , thawed once for other measurements not reported in the present paper, and then refrozen until examined for size distribution of bubbles by image analysis. Repeated freezing of the samples does not, in the authors' experience, alter surfactant activity to any significant degree (unpublished observations). The samples were coded so that the operator was not aware of the source of the material.

The study was approved by the ethics committee of Hospital São Lucas, PUCRS University, Porto Alegre, Brazil.

### Computerized image analysis of bubbles

A Quantimet image analyser (Leica Cambridge, Cambridge, UK), with a specially designed program for measuring size distribution of bubbles, was used [modified from Berggren et al. (2)]. Three drops of gastric aspirate were sampled through a Pasteur pipette and then suctioned and expelled vigorously for 6 s. The drops were covered with a microscope slide and the image of each field was transmitted to a computer at a screen magnification of  $\times 230$ . At this setting of the microscope, the program recognizes bubbles with a diameter  $>3\ \mu\text{m}$ . A total of 15 fields was chosen at random, 5 from each drop, together representing a

Table 1. Sensitivity and specificity with 95% confidence intervals (CI) and Youden's Index for data obtained by computerized image analysis of bubbles.

Test	Cut-off point	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Youden's Index
No. of microbubbles (<20 µm)	<8/15 fields <sup>a</sup>	80 (51–95)	88 (77–94)	0.68
Proportion of microbubbles (<20 µm)	<24%	67 (39–87)	91 (81–96)	0.58
Average diameter of bubbles	>45 µm	87 (58–98)	78 (65–87)	0.65
Combined measurements <sup>b</sup>		93 (66–99)	85 (73–92)	0.78

<sup>a</sup> Total sample area = 4.4 mm<sup>2</sup>.

<sup>b</sup> No. of microbubbles if total count <60 and proportion of microbubbles if total count ≥60.

sample area of 4.4 mm<sup>2</sup>. The program counted the bubbles contained in each field and calculated the size distribution and mean size of the bubbles. Bubbles overlapping the margin of the field were not counted. Microbubbles were defined as bubbles with a diameter <20 µm (3).

#### Statistics

Values are given as mean ± SD or 95% confidence intervals (CI). Receiver-operating characteristic (ROC) curves were obtained for three parameters of the computerized counting: number of microbubbles, proportion of microbubbles and mean bubble size. The areas under the curves were assessed as described by Hanley and McNeil (4). The sensitivity and specificity of the test were determined for different cut-off values. The best cut-off points were defined as the points where the sum of false negatives and false positives was lowest. Youden's Index was calculated by the formula: sensitivity + specificity – 1 (5).

#### Results

A total of 82 patients was studied. Two of them were excluded as the samples were clearly contaminated by pus. Eighty patients were left for analysis, including nine whose samples were stained by blood and four by meconium. Mean ± SD values for gestational age and birthweight were 32 ± 2 wk and 1629 ± 429 g, respectively.

Table 1 shows the sensitivity and specificity at the best cut-off points for the whole material (*n* = 80). The areas under the ROC curve were similar for the total number of microbubbles, proportion of microbubbles and average bubble diameter: 0.85 (CI 0.75–0.95), 0.84 (CI 0.72–0.96) and 0.83 (CI 0.71–0.95), respectively (Fig. 1). The sensitivity and specificity of the automatic test were increased by combining two of the parameters evaluated. The proportion of microbubbles was a more accurate parameter in samples with a total count of ≥60 bubbles and the number of microbubbles was more accurate if the total count was <60 bubbles. Using the proportion of microbubbles when the total count was ≥60 and the total number of microbubbles when the

count was <60, a sensitivity of 93% and a specificity of 85% were obtained.

Results were similar for the 26 babies <32 wk gestation. In this subgroup, the sensitivity for the four parameters listed in Table 1 ranged from 78 to 89%, and specificity from 82 to 94%. For the 11 babies <30 wk gestation, the corresponding figures for sensitivity and specificity were 80% (4/5 in all three tests) and 83–100%, respectively. The general pattern of the results did not change if the 13 babies with blood- or meconium-stained samples were excluded from the statistics (data not shown).

#### Discussion

The computerized method used in this study not only counts the number of microbubbles but also measures other aspects of the bubbles such as proportion of microbubbles and average bubble size. The sensitivity and specificity for prediction of RDS were similar for

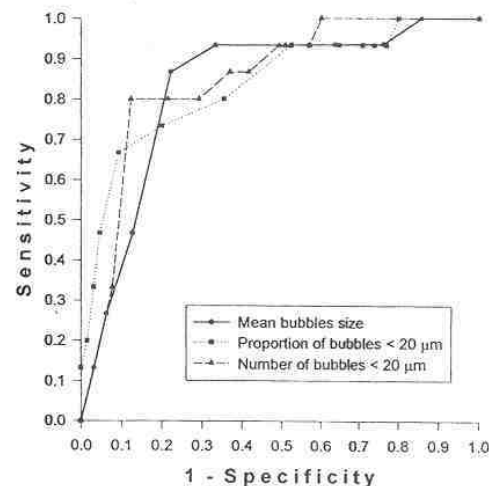


Fig. 1. Receiver-operating characteristic curves for three parameters evaluated by automated image analysis of bubble profiles in gastric aspirates.

1404 HH Fiori et al.

ACTA PEDIATR 90 (2001)

the number of microbubbles counted automatically and corresponding data obtained by the standard stable microbubble test done with a regular microscope (6).

The total number of bubbles was low in many samples. Fewer than 20 bubbles of any size were counted in 15 fields in 14 samples. In those samples the random variability of just a few microbubbles has a great impact on the proportions and average size of the bubbles, reducing the precision of the measurements. This problem could be circumvented at least to some extent by combining data on number of bubbles and proportion of microbubbles (Table 1).

In a previous report on this method (3) the gastric aspirates were centrifuged before analysis, to remove mucus and other non-surfactant material. The mucus probably alters bubble distribution in the sample and seems to retain some surfactant (7). The ideal way to deal with this problem remains to be defined. Contamination of the samples with blood or meconium did not appear to interfere with the results. The proportion of true and false results was similar to that in non-contaminated samples. It seems that these samples are valid for clinical purposes.

In conclusion, all three computerized bubble measurements (number of bubbles, proportion of microbubbles and average bubble size) had similar accuracy for determining the presence of surfactant in gastric aspirates. The computerized technique requires more expensive equipment and is about as time-consuming as the standard stable microbubble test described by Chida et al. (6). Counts of the number of microbubbles with computerized or conventional techniques give equivalent results (6). The main advantage of the computerized method applied to random fields is that measurements are obtained with a minimum of bias. Furthermore, since the measurements are stored

directly in the computer, the data are immediately available for analysis with a variety of statistical programs. These data should encourage further clinical evaluation of microbubble measurements in gastric aspirates for early diagnosis of RDS in newborn infants.

*Acknowledgements.*—This work was supported by the Swedish Medical Research Council (Project No. 3351) and Konung Oscar II:s Jubileumsfond. The authors wish to thank Dr Nivaldo Almeida Fonseca for his advice on the comparison of areas of the ROC curves.

## References

1. Verder H, Albertsen P, Ebbesen F, Greisen G, Robertson B, Agertoft L, et al. Nasal continuous positive airway pressure and early surfactant therapy for respiratory distress syndrome in newborns of less than 30 weeks' gestation. *Pediatrics* 1999; 103: e24
2. Berggren P, Eklind J, Linderholm B, Robertson B. Bubbles and computer aided image analysis for evaluation of surfactant inhibition. *Biol Neonate* 1992; 61 Suppl 1: 15–20
3. Berggren P, Linderholm B, Ebbesen F, Verder H, Eschen C, Robertson B. Evaluation of lung maturity in newborn babies by microbubble stability test (Abstract). *Biol Neonate* 1999; 76 Suppl 1: 44
4. Hanley JA, McNeil BJ. A method comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983; 148: 839–43
5. Hilden J, Glasziou P. Regret graphs, diagnostic uncertainty and Youden's Index. *Stat Med* 1996; 15: 969–86
6. Chida S, Fujiwara T, Konishi M, Sasaki M. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: II. Prospective evaluation of the test on amniotic fluid and gastric aspirate. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 152–6
7. Gebhardt DOE, Ruys JH. A pitfall in the shake test on gastric aspirate (Letter). *N Engl J Med* 1975; 294: 225

Received Dec. 6, 2000; revision received June 8, 2001; accepted Sept. 4 2001



**APÊNDICE**  
**BANCO DE DADOS**

---

Dados dos Pacientes Submetidos à Profilaxia Baseada no TME

Table with 30 columns (A-AB, B-BC, C-CD, D-DE, E-F, F-G, G-H, H-I, I-J, J-K, K-L, L-M, M-N, N-O, O-P, P-Q, Q-R, R-S, S-T, T-U, U-V, V-W, W-X, X-Y, Y-Z, Z-AA, AA-AB, AB-AC, AC-AD, AD-AE, AE-AF, AF-AG, AG-AH) and 53 rows of patient data including medical conditions and counts.











**ABREVIATURAS DO BANCO DE DADOS**

Período - 1 = período da nova rotina; 2 = período do controle histórico  
Num – número do paciente  
Hosp – Hospital 1 = HSL; 2 = HMV  
IG – idade gestacional em semanas  
Peso – peso em gramas  
Sexo – 1 = masculino; 0 = feminino  
AIG - 1 = adequado para idade gestacional; 2 = pequeno para idade gestacional, 3= grande para idade gestacional  
Hipert – hipertensão materna: 1 = sim; 0 = não  
Diabetes – diabetes materna: 1 = sim; 0 = não  
Infecção – corioamnionite: 1 = sim; 0 = não  
ITU – infecção de trato urinário materno: 1 = sim; 0 = não  
br>24h - bolsa rota > 24 horas: 1 = sim; 0 = não  
LA – volume de líquido amniótico: 1 = normal; 2 = oligodrâmnios; 3 = polidrâmnios  
LASANG – líquido amniótico sanguinolento: 1 = sim; 0 = não  
LAMEC – líquido amniótico meconial: 1 = sim; 0 = não  
LAPUR – líquido amniótico purulento: 1 = sim; 0 = não  
PNATAL - alguma consulta pré-natal: 1 = sim; 0 = não  
CORTIC – corticóide antenatal: 1 = sim; 0 = não  
VENTSP – ventilação com pressão positiva em sala de parto: 1= com tubo et; 2= com balão e máscara; 3= não  
APGAR1 – Apgar 1'  
APGAR5 – Apgar 5'  
Parto – 1 = vaginal; 0 = cesariana  
TME – número de microbolhas do teste de microbolhas estáveis  
SURFACT – surfactante: 1 = sim; 0 = não  
Surfmin – tempo para administração de surfactante com microbolhas baixas  
DOSES – número de doses de surfactante  
OX28d – oxigênio suplementar com 28 dias de vida  
PNEUMT - pneumotórax: 1 = sim; 0 = não  
DUCTUS – *ductus arteriosus*: 1 = sim; 0 = não  
HIV(grau) – hemorragia IV: número equivale ao grau; 9=não realizada ecografia  
ECN – enterocolite necrosante: 1 = sim; 0 = não  
obito 28d – óbito antes dos 28 dias  
OBITO – óbito (até a alta)  
IDADE OBITO – idade no óbito

---



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)