

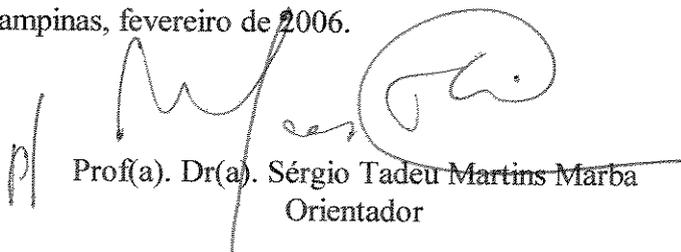
03

JAMIL PEDRO DE SIQUEIRA CALDAS

**A UTILIDADE DO LEUCOGRAMA,
PROTEÍNA C-REATIVA, INTERLEUCINA-6 E
FATOR DE NECROSE TUMORAL-ALFA NO
DIAGNÓSTICO DA SEPSE NEONATAL TARDIA**

Este exemplar corresponde à versão final do exemplar da Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Pediatria.

Campinas, fevereiro de 2006.


Prof(a). Dr(a). Sérgio Tadeu Martins Marba
Orientador

2006

JAMIL PEDRO DE SIQUEIRA CALDAS

**A UTILIDADE DO LEUCOGRAMA,
PROTEÍNA C-REATIVA, INTERLEUCINA-6 E
FATOR DE NECROSE TUMORAL -ALFA NO
DIAGNÓSTICO DA SEPSE NEONATAL TARDIA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Saúde da Criança, área de concentração Pediatria*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Martins Marba

CO-ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Maria Heloísa Souza Blotta Lima

CAMPINAS

2006

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Jamil Pedro de Siqueira Caldas

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Martins Marba

Co-orientador: Profª Drª Maria Heloísa Souza Lima Blotta

Membros:

1- Profª Drª Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo

2- Profª Drª Roseli Calil

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

Data: 21/02/2005

DEDICO ESTE TRABALHO

***A meus pais, IRENE e MANOEL (in memoriam) e
a meus irmãos, OSVALDO, ADEVANIR, JUSCELINO, FÁTIMA e ELZE***

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA, pelo apoio integral e sincero em todo o transcorrer do trabalho.

À Professora Dr^a. MARIA HELOÍSA SOUZA LIMA BLOTTA, pela colaboração inestimável na descrição e no preparo das técnicas laboratoriais.

À Sr^a ÉDINA SUELI DOS SANTOS, técnica de Enfermagem, pela dedicação na coleta dos exames e por sua grandiosidade como pessoa.

Ao Sr RÔMULO TADEU DIAS DE OLIVEIRA, biólogo e aluno da pós-graduação, pela organização dos exames e pela realização dos mesmos.

Aos médicos-assistentes do Setor de Neonatologia do CAISM-UNICAMP, ANA CRISTINA PINTO, ANA PAULA CALDAS MACHADO, ANDRÉA ELIANA LOVATO CASSONE, ELIZETE APARECIDA P. PRESCINOTI ANDRADE, FERNANDA C. MILLEN ZIMMERMAN, GISELE MARAFON L. LIMA, JUSSARA LIMA E SOUZA, LÚCIA HELENA BUENO, LUÍS EDUARDO F. VINAGRE, MARIA OTÍLIA NUNES BIANCHI, MÔNICA APARECIDA PESSOTO, ROSELI CALIL, SÍLVIA MARIA MONTEIRO COSTA E STEFÂNIA LUCIZANI PACÍFICO, pela amizade constante e apoio.

Aos docentes do Setor de Neonatologia ABIMAEI ARANHA NETTO, FERNANDO PERAZZINI FACHINI, FRANCISCO MEZZACAPPA FILHO, IZILDA RODRIGUES MACHADO ROSA, MARIA APARECIDA BRENELLI, e em especial à prof^a. Dr^a. MARIA APARECIDA M. S. MEZZACAPPA, pelo apoio ao longo destes anos de convivência.

À Sr^a SIRLEI SIANI MORAIS, pela análise estatística.

Ao Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Unicamp, pelo processamento e armazenamento do material.

There are no diagnostic magic bullets, nor are there “magic methods”.

There are, however, better methods.

Gabriel J. Escobar

	<i>Pág.</i>
RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxxi
1- INTRODUÇÃO	35
2- OBJETIVOS	51
2.1- Objetivo Geral	53
2.2- Objetivos Específicos	53
3- SUJEITOS E MÉTODOS	55
3.1- Desenho do estudo	57
3.2- Tamanho amostral	57
3.3- Casuística	57
3.4- Metodologia	58
3.5- Aspectos Éticos	66
4- RESULTADOS	67
5- DISCUSSÃO	91
6- CONCLUSÕES	111
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
8- ANEXOS	131

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Acur	acurácia
°C	graus Celsius
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
dl	decilitro
Esp	especificidade
et al.	e outros (as)
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
IL1	primeira medida da interleucina-6
IL2	segunda medida da interleucina-6
IL3	terceira medida da interleucina-6
Leuc	leucograma
mg	miligrama
ml	mililitros
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
p	p valor
pg	picograma
PCR	proteína C-reativa
PCR1	primeira medida da proteína C-reativa
PCR2	segunda medida da proteína C-reativa
PCR3	terceira medida da proteína C-reativa

PIG	pequeno para idade gestacional
RN	recém-nascido
ROC	<i>receiver operator characteristic</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Sens	sensibilidade
TNF-α	<i>tumour necrosis factor</i> - fator de necrose tumoral - alfa
TNF1	primeira medida do fator de necrose tumoral-alfa
TNF2	segunda medida do fator de necrose tumoral-alfa
TNF3	terceira medida do fator de necrose tumoral-alfa
VPP	valor preditivo positivo
VPN	valor preditivo negativo

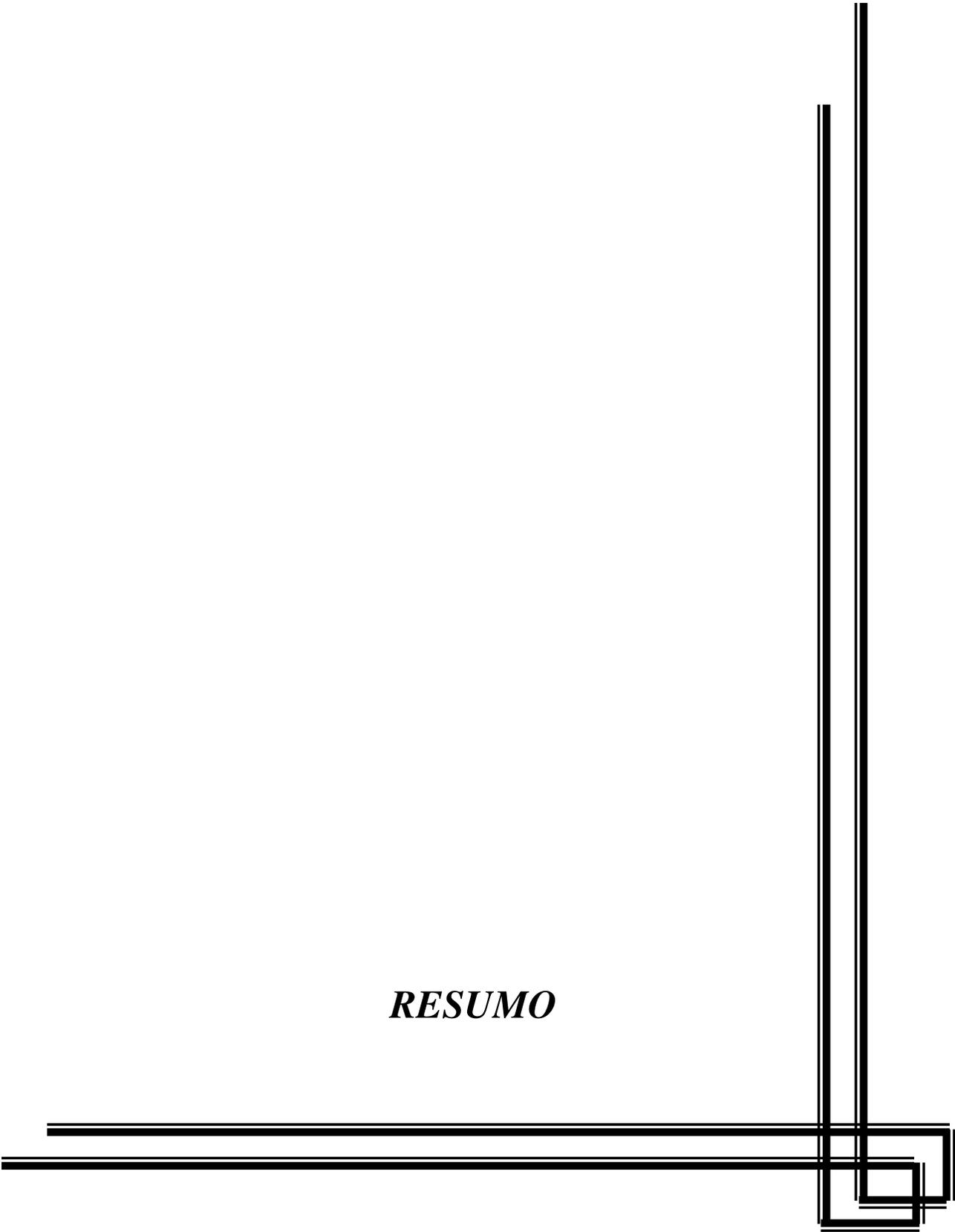
	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Características gerais dos recém-nascidos dos grupos com sepse com provada e não infectados.....	70
Tabela 2 Características gerais dos recém-nascidos dos grupos com sepse clínica e não infectados.....	70
Tabela 3 Maturidade e estado nutricional dos recém-nascidos estudados.....	71
Tabela 4 Sintomatologia encontrada nos grupos com sepse comprovada e clínica e recém-nascidos não infectados.....	72
Tabela 5 Diagnósticos encontrados nos recém-nascidos do grupo de crianças não infectadas.....	74
Tabela 6 Agentes microbiológicos isolados nas culturas.....	75
Tabela 7 Leucograma nos grupos com sepse comprovada e sepse clínica e nos recém-nascidos não infectados.....	76
Tabela 8 Valores de mediana da PCR nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados.....	77
Tabela 9 Valores de mediana da PCR nos grupos de sepse clínica e de recém-nascidos não infectados.....	77
Tabela 10 Valores de mediana da Il-6 nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados.....	79
Tabela 11 Valores de mediana da Il-6 nos grupos de sepse clínica e de recém-nascidos não infectados.....	79
Tabela 12 Valores de mediana do TNF- α nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados.....	81

Tabela 13	Valores de mediana do TNF- α nos grupos de sepse clínica e de recém-nascidos não infectados.....	81
Tabela 14	Ocorrência de choque e óbito nos grupos estudados.....	83
Tabela 15	Valores de mediana dos marcadores séricos e ocorrência de choque e óbito no grupo de recém-nascidos com sepse comprovada.....	84
Tabela 16	Limites de corte para os três marcadores séricos.....	85
Tabela 17	Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – PCR.....	85
Tabela 18	Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – Il-6.....	86
Tabela 19	Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – TNF- α	86
Tabela 20	Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – leucograma.....	87
Tabela 21	Associação de marcadores e valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia - primeiras medidas da PCR, Il-6 e TNF- α	87
Tabela 22	Associação de marcadores e valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – leucograma e marcadores séricos.....	88
Tabela 23	Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia da PCR com o limite de corte de 1,0 mg.....	88
Tabela 24	Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia da associação de marcadores - outros momentos da primeira aferição.....	89

Tabela 25	Comparação entre as medianas dos marcadores entre os grupos de recém-nascidos de termo e pré-termos.....	90
Tabela 26	Características gerais dos recém-nascidos dos grupos com Infecção comprovada e provável, associados, e dos recém-nascidos não infectados.....	137
Tabela 27	Sintomatologia mais freqüente encontrada nos grupos de recém-nascidos com infecção comprovada e provável, associados, e nos recém-nascidos não infectados.....	138
Tabela 28	Leucograma nos grupos com sepse comprovada e infecção provável, e nos recém-nascidos não infectados.....	139
Tabela 29	Valores de mediana da pCR, IL-6 e TNF- α nos grupos com sepse comprovada e infecção provável, associados, e nos recém-nascidos não infectados.....	139
Tabela 30	Ocorrência de choque e óbito nos grupos de recém-nascidos com sepse comprovada e provável e não infectados.....	140
Tabela 31	Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e acurácia para os quatro exames estudados.....	141

	<i>Pág.</i>
Gráfico 1 Valores de mediana da PCR nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados.....	77
Gráfico 2 Valores de mediana da PCR nos grupos de infecção provável e de recém-nascidos não infectados.....	78
Gráfico 3 Valores de mediana da Il-6 nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados.....	79
Gráfico 4 Valores de mediana da Il-6 nos grupos de infecção provável e de recém-nascidos não infectados.....	80
Gráfico 5 Valores de mediana do TNF- α nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados.....	82
Gráfico 6 Valores de mediana do TNF- α nos grupos de infecção provável e de recém-nascidos não infectados negativo e acurácia.....	82

RESUMO



O objetivo do estudo foi avaliar as propriedades diagnósticas de quatro exames laboratoriais na sepse neonatal tardia: leucograma, proteína C-reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Analisaram-se 82 recém-nascidos com idade entre três e 30 dias, em um período de 20 meses. Nos quadros suspeitos de sepse foram colhidas três amostras de sangue: à suspeita, 24 e 48 horas depois. O leucograma foi avaliado no dia da suspeita clínica e foi considerado alterado quando o índice neutrofílico e o número total de neutrófilos estivessem alterados. Os marcadores séricos foram dosados por quimioluminescência e o limite de corte obtido pela construção da curva ROC. De acordo com a evolução clínica, os recém-nascidos foram classificados em três grupos: sepse comprovada por cultura, sepse clínica (culturas negativas e quadro clínico muito sugestivo de infecção) e não infectados. Os grupos foram comparáveis quanto ao peso ao nascer, idade gestacional, sexo, idade cronológica e índice de Apgar. Nos grupos sépticos, choque ocorreu em 36,2% e óbito em 8,6% das crianças. O leucograma alterou-se em 64,3% naqueles com sepse comprovada, 68,8% naqueles com sepse clínica e 25,0% nos não infectados. A mediana da PCR mostrou-se mais elevada nos grupos sépticos em relação ao não infectado, em todos os momentos, com diferença estatisticamente significativa. A IL-6 alterou-se nos três momentos, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos sépticos e o de crianças não infectadas. Nos grupos sépticos, a mediana da IL-6 mostrou-se mais elevada na primeira aferição, caindo a seguir. No grupo sem infecção, a mediana da IL-6 permaneceu inalterada. A mediana do TNF- α alterou-se nos três momentos no grupo com sepse comprovada, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não infectado, mas não entre este e aquele com sepse clínica. O leucograma revelou a acurácia mais baixa dos quatro exames (68,2%). A PCR mostrou a acurácia mais elevada dos testes, especialmente na segunda medida (89,4%). A IL-6 mostrou-se mais útil na primeira aferição, com acurácia de 81,0% (próxima àquela da PCR na primeira medida – 81,8%) e sua acurácia caiu a seguir (71,2% e 68,2%). O TNF- α manteve uma acurácia praticamente constante (77,2 – 77,0 – 74,1%). Quando os marcadores foram associados, a acurácia aumentou significativamente: leucograma e segunda medida da PCR - 97,5%, segunda medida da PCR e primeira IL-6 - 92,3% e segunda medida da PCR e segunda do TNF- α - 95,1%. Para a associação leucograma e segunda medida da PCR, a sensibilidade e o valor preditivo negativo atingiram 100%.

Na ocorrência de choque não houve diferença nas medianas dos exames. Quanto ao óbito, houve diferença significativa na terceira medida dos três marcadores séricos e na primeira da IL-6. Em conclusão, observou-se que a PCR mostrou a melhor acurácia dos quatro testes, com desempenho superior ao da IL-6 e TNF- α , e o leucograma mostrou a pior performance. A associação dos exames aumenta consideravelmente a precisão diagnóstica na sepse neonatal tardia. A manutenção dos níveis séricos elevados dos três marcadores alerta para a possibilidade de evolução para óbito.

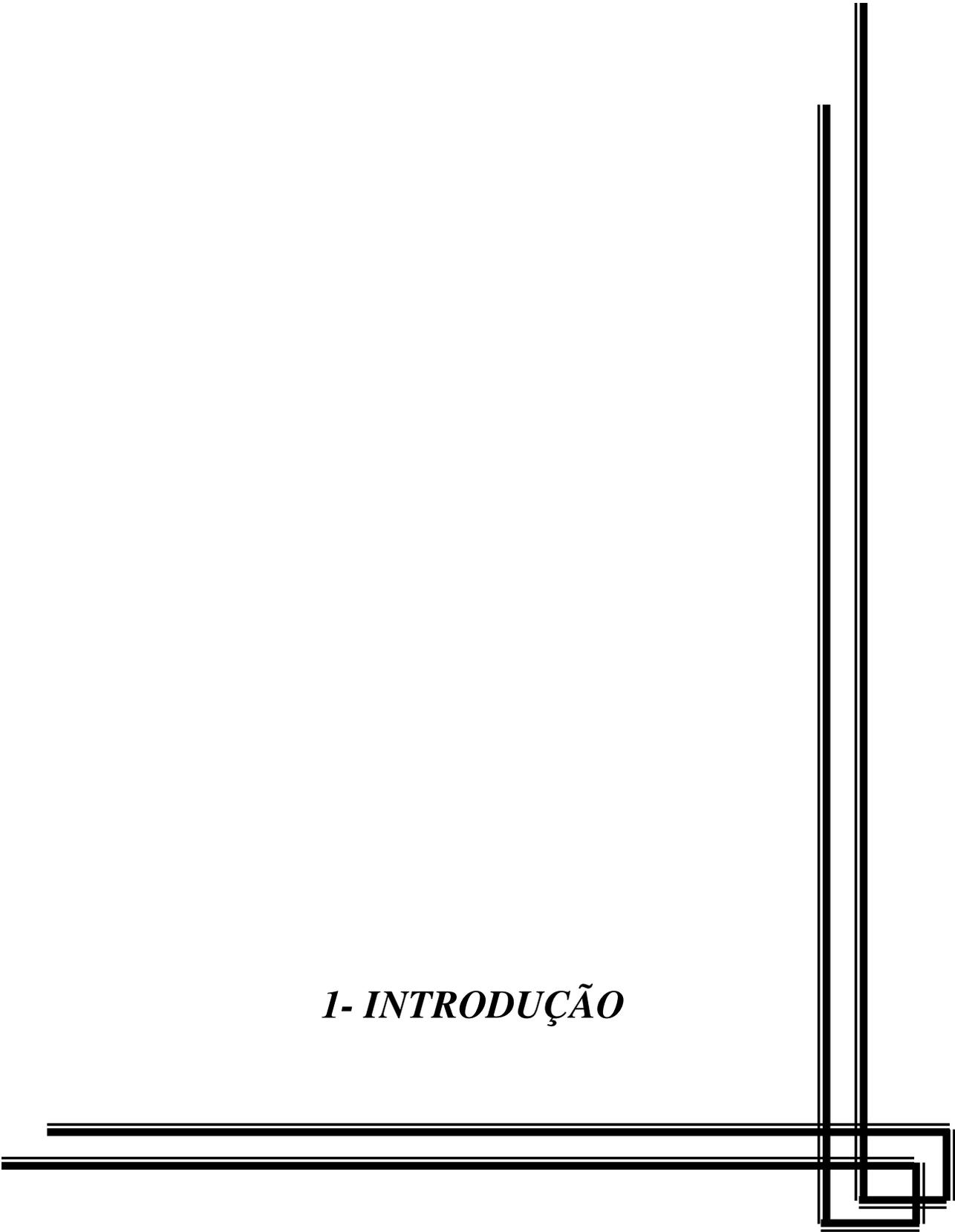
ABSTRACT



This study evaluated the diagnostic properties of four laboratorial tests used in late neonatal sepsis. The tests were: white blood cell count (WBC), C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). It analyzed 82 newborns aged 3 and 30 days in 20 months. Three blood samples were obtained, at three moments: at clinical suspicion, 24 hour and 48 hour after. WBC was evaluated once a time, at the clinical suspicion. Sera markers were made by chemiluminescence's essay and the cut-off values were obtained by ROC curve. WBC was considered altered when neutrophilic index and total neutrophilic, both, were abnormal. In according to clinical evolution, newborns were classified in three groups: definite sepsis (comproved by culture), clinical sepsis (suggestive clinical aspect but negative cultures), and non-infected infants. Groups were comparable in relation to birth weight, gestational age, gender or Apgar score and age at clinical suspicion. Shock and infection-related death happened in 32,6% and 8,6% in septic groups, respectively. WBC was abnormal in 64,3% in proved septic group, 68,8% in clinical sepsis group, and in 25% non-infected infants. CRP medians were more elevated in both septic groups than in non-infected infants, in all the moments (statistically significant difference). CRP was abnormal since the first measurement. In the non-infected group, CRP median presented low and quite constant values. IL-6 was abnormal at the three moments, and there was statistically significant difference between septic and non-infected groups. Septic group IL-6 medians were more elevated at the first measurement and then it felt progressively. In the non-infected group, IL-6 median presented with no elevation. TNF- α was elevated at the three measurements in the definite septic group, and there was statistically difference for non-infected group medians. For the clinical septic group and the non-infected one there was no significant difference. WBC showed the lowest diagnostic accuracy of the four tests (68,2%). CRP presented the most elevated accuracy, especially for the second measurement (89,4%). IL-6 obtained its best performance at the first determination (81,0% - quite equal to first CRP accuracy - 81,8%). Then, its accuracy felt to 71,2% and 68,2%. TNF- α presented accuracy constant (77,2% - 77,0% - 74,1%). When the four markers were associated, accuracy elevated markedly, and the best values were obtained for: WBC + second CRP (97,5%), second CRP and first IL-6 (92,3%) and second CRP and TNF- α (95,1%). For WBC and second CRP association, sensibility and negative predictive values reached 100%.

In relationship to shock, there were no significant differences in the medians of no markers. To death, it was shown that it was accompanied by high medians of the third measurements of the three markers, and in the first median of IL-6. In summary, it was found that WBC showed regular accuracy, and it was overcome by CRP (measured serially), by IL-6 (when it was measured at the moment of clinical suspicion) and by TNF- α . Tests association increased diagnostic accuracy markedly in the late neonatal sepsis. Sustained high blood levels of such markers may be a prognostic indicator (death).

1- INTRODUÇÃO



A sepse continua a ser uma das doenças mais freqüentes no período neonatal, apesar do desenvolvimento extraordinário da Neonatologia nos últimos anos e permanece como uma importante causa de mortalidade e morbidade (KLEIN e MARCY, 1991; MESSER et al., 1996; STOLL et al., 1998; LEMONS et al., 2001). As taxas de sobrevivência de recém-nascidos prematuros, especialmente daqueles com muito baixo peso ao nascer, têm se elevado consideravelmente nas últimas décadas. Como conseqüência, em vista de suas necessidades especiais, muitas destas crianças são submetidas a tratamentos e dispositivos invasivos, os quais, associados à imaturidade relativa do sistema imune, favorecem o aparecimento de quadros infecciosos (KÄLLMAN et al., 1999; CALIL et al., 2001; ZAFAR et al., 2001; ADAMS-CHAPMAN e STOLL, 2002; BALTIMORE, 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, ocorrem cerca de cinco milhões de óbitos neonatais por ano no mundo, dos quais 98% acontecem nos países subdesenvolvidos e naqueles em desenvolvimento. Na América Latina e Caribe, estima-se a incidência da doença entre 3,5 a 8,9/1000 nascidos-vivos e a infecção foi responsável por cerca de 32% das mortes neonatais no período de 2000-2003 (WHO, 2005; VERGNANO et al., 2005). Nos Estados Unidos, de 1992 a 1994, 7,2% dos óbitos neonatais foram relacionados à sepse, e a incidência da doença tem variado de 1-8/1000 nascidos-vivos, sendo que as maiores taxas são encontradas para os prematuros de muito baixo peso ao nascer e inversamente relacionada com a idade gestacional e ao peso ao nascer (STOLL et al., 1998; LEMONS, 2001; STOLL et al., 2002; ESCOBAR, 2003).

No Brasil, a taxa de mortalidade infantil foi estimada em 25,0 por 1000 nascidos vivos no ano de 2002 e a taxa de mortalidade neonatal representa cerca de 66% das mortes entre crianças no primeiro ano de vida (BRASIL, 2004). PESSOA-SILVA et al. (2004) relataram que 22% dos pacientes de um estudo multicêntrico com 4878 recém-nascidos apresentaram pelo menos um episódio de infecção associada a cuidados hospitalares (incluindo aquelas de origem materna), com uma densidade de incidência global de 24,9/1000 pacientes-dia. As infecções nosocomiais responderam por 72% dos quadros e as taxas foram inversamente proporcionais ao peso de nascimento (51,9% naqueles com peso menor ou igual a 1000g e 12,3% naqueles com peso maior que 2500g). A taxa de morte relacionada à infecção foi de 40%.

Uma das explicações para as taxas elevadas de infecção nos recém-nascidos, além da exposição a fatores de risco, é que o RN tem sido considerado como imunodeficiente relativo. Os processos de desenvolvimento do sistema imune estão em andamento (imaturidade funcional) e são descritos níveis baixos de componentes do sistema complemento e de imunoglobulinas, além de alterações na função leucocitária. A produção de leucócitos inicia-se por volta de 14-16 semanas de gestação e no segundo trimestre o tamanho da reserva de neutrófilos é extremamente pequena e vai aumentando gradativamente. No entanto, quando solicitada por estímulo infeccioso, essa reserva se esgota rapidamente e parece haver uma deficiência de produção de fator estimulante de formação de colônia granulocítica. Defeitos funcionais nos leucócitos polimorfonucleares como alterações na aderência, agregação, fagocitose e mecanismo de morte intracelular, têm sido relatados em prematuros e crianças de termo (HILL, 1987; MAHESHWARI e CHRISTENSEN, 2004).

Classicamente, a sepse neonatal tem sido classificada em quadros precoces e tardios, de acordo com a época de aparecimento dos sintomas e relacionada com os fatores de risco maternos e ambientais.

Os quadros precoces são aqueles adquiridos por transmissão vertical ou por disseminação hematogênica a partir de uma infecção materna, imediatamente antes ou durante o nascimento. Em geral, elas têm relação com complicações obstétricas como bolsa rota prolongada, corioamnionite, infecção urinária ou colonização materna por estreptococo do grupo B. Os agentes mais frequentemente encontrados costumam ser aqueles do trato genital feminino como *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella sp* e *Enterococcus sp*. Em geral os sintomas aparecem em até 72 horas de vida, sendo que 80 a 90% têm seu início nos primeiros dois dias de vida e, a menos que evidências importantes sugiram o contrário, infecções que surgem antes de 48 horas de vida são consideradas como de origem materna (GAYNES, 1996; RUGOLO, 2000; BALTIMORE, 2003; KAUFMAN e FAIRCHILD, 2004; HAQUE, 2005).

A sepse neonatal de aparecimento tardio relaciona-se com o ambiente pós-natal e os procedimentos invasivos, adquiridos por transmissão horizontal nas unidades de internação, sendo, portanto, infecções nosocomiais. Os agentes infecciosos variam de

acordo com as condições locais de cada unidade e são comuns: estafilococos coagulase-negativos (especialmente o *S. epidermidis*), *S. aureus*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* e outros Gram-negativos entéricos, e *Candida sp*. Normalmente, são consideradas tardias aquelas que aparecem a partir de 48 horas de vida, embora haja discordância quanto a isso na Literatura (RUGOLO, 2000; BALTIMORE, 2003; KAUFMAN e FAIRCHILD, 2004).

À medida que as medidas de suporte de vida e cuidados gerais do recém-nascido melhoram, cresce o número de crianças prematuras e de baixo peso e elas acabam por serem submetidas a inúmeros tratamentos e dispositivos invasivos. São considerados como fatores de risco para infecção neonatal tardia: prematuridade, baixo peso ao nascer, ventilação mecânica, cateteres intravasculares, nutrição parenteral total, retardo na introdução da alimentação enteral, uso de antibióticos de largo espectro, displasia broncopulmonar, uso de corticoesteróide pós-natal, enterocolite necrosante, permanência hospitalar prolongada e procedimentos cirúrgicos (CALIL et al., 2001; ZAFAR et al., 2001; STOLL et al., 2002; BALTIMORE, 2003; STOLL e HANSEN, 2003)

A sepse neonatal apresenta em geral um início insidioso, com sinais e sintomas na maioria das vezes bastante inespecíficos e confundidos com condições próprias da idade, como taquipnéia transitória do recém-nascido, distermias ambientais, apnéia de prematuridade e exacerbações agudas da displasia broncopulmonar (SILVA, et al., 1995; BALTIMORE, 2003; JACKSON et al., 2004; NG, 2004).

Observa-se que, para cada recém-nascido verdadeiramente séptico, um grande número deles é tratado por suspeita clínica presumida e não confirmada de infecção (SILVA, et al., 1995; GERDES, 1991). Na realidade, quando a doença se instala de um modo mais evidente, ela já pode estar em uma fase bastante avançada e freqüentemente fatal (ESCOBAR, 2003; NG, 2004). Deste modo, a condição exige um diagnóstico e um tratamento precoces uma vez que estes são críticos para melhorar o prognóstico (GERDES, 1991; MESSER et al., 1996; GONZALES et al., 2003).

Apesar de a observação clínica ser bastante subjetiva, uma vez que ela depende basicamente do julgamento clínico do observador, ela ainda continua ser um importante ponto de referência na suspeita da doença. FISCHER et al. (2004), ao analisar o julgamento

clínico de médicos de Unidades de Terapia Intensiva Pediátricas e Neonatais nos Estados Unidos e na Suíça, observaram que os médicos estavam suficientemente alertas para sinais inespecíficos de sepse, embora esse julgamento isoladamente tenha sido incapaz de identificar aquelas crianças que posteriormente se mostraram verdadeiramente infectadas. Quando esse julgamento é associado a um marcador biológico, a probabilidade de acerto aumenta e traz mais segurança ao médico em iniciar, retardar ou suspender o uso de antimicrobianos. Isso se é um fato importante na prática clínica pois iniciar um tratamento antibiótico com base apenas em base clínicas e análise de fatores de risco resultará provavelmente em um número grande de tratamentos desnecessários (PANERO, et al., 1997; NG, 2004; VOLANTE et al., 2004).

Além disso, o uso de antimicrobianos de amplo espectro de forma indiscriminada, ao interferir com a flora normal residente, tem sido implicado no risco de desenvolvimento de patógenos multi-resistentes, bem como contribui para o aumento dos custos e da permanência hospitalares e propiciar o aparecimento de efeitos colaterais que podem gerar problemas outros além da infecção (CALIL, 2001; STOVER, et al. 2001; STOLL e HANSEN, 2003; BALTIMORE, 2003).

Com a finalidade de auxiliar no diagnóstico da condição, vários exames laboratoriais foram propostos. Preconiza-se que algumas características sejam levadas em conta para que um exame laboratorial seja considerado como um marcador de infecção ideal (MESSER et al., 1996; FLETCHER et al., 1996; SILVEIRA e PROCIANOY, 1999; MEHR e DOYLE, 2000; DØLLNER et al, 2001; NG 2004; GERDES, 2004). Entre elas estão:

- 1- Um valor de corte ótimo que seja comparável entre diferentes unidades de terapias intensivas. Tais limites deveriam ser obtidos através da construção da curva ROC (*receiver operator characteristic*). Ela é um meio particularmente valioso de comparar testes para o mesmo diagnóstico e acurácia total de um teste pode ser descrita percentualmente como a área sob a curva e quanto maior esta área, melhor o teste;
- 2- Capaz de diferenciar patógenos (vírus x bactérias);

- 3- Índices de sensibilidade e de valor preditivo negativo os mais altos possíveis, para garantir que as crianças verdadeiramente infectadas sejam identificadas e tratadas e permitir que o médico esteja suficientemente seguro de que o tratamento antibiótico de uma criança com um teste negativo seja realmente desnecessário;
- 4- Especificidade e valor preditivo negativo maiores que 85%;
- 5- É imprescindível que estes marcadores biológicos apareçam rapidamente no curso da doença, e assim, permitam um diagnóstico mais precoce;
- 6- Guiar a duração do tratamento antibiótico;
- 7- Monitorizar o tratamento, visando detectar complicações (como formação de abscessos e coleções);
- 8- Ter algum aspecto prognóstico;
- 9- Em relação às características laboratoriais: composto estável, relação temporal estável para permitir a coleta adequada (aumento ou decréscimo mantido por pelo menos 48 horas após o início das manifestações clínicas), medidas quantitativas, requerer pequeno volume de sangue para dosagem, método de dosagem fácil, tempo de execução rápido, resultados comparáveis entre laboratórios e baixo custo.

O isolamento de microrganismos em líquidos orgânicos normalmente estéreis é considerado o teste mais apropriado para o diagnóstico da sepse neonatal, especialmente a hemocultura, à qual é considerada o padrão-ouro. No entanto, algumas considerações podem ser feitas sobre o método. Primeiramente, é importante que duas amostras sejam colhidas (desde que isso não implique em retardo importante no tratamento) a fim de que resultados positivos concordantes indiquem uma maior probabilidade de sepse, já que o isolamento de um agente em apenas uma amostra poderia ser sugestivo de um contaminante de flora cutânea no momento da coleta. Além disso, existe um intervalo de tempo para que as culturas estejam disponíveis, o que mesmo nos sistemas modernos de culturas demanda cerca de 48 horas para o isolamento da maioria dos patógenos (HURST e YODER, 1995; SCHELONKA e MOSER, 2003; GONZALES et al., 2003; GERDES, 2004).

E apesar da hemocultura ser considerado padrão-ouro dos quadros sépticos, o índice de positividade do exame varia amplamente, de 50 a 87%. No Serviço estudado, a taxa de positividade da hemocultura nos quadros de sepse neonatal tardia foi de 63,4% e 63,9% nos anos de 2001 e 2002, respectivamente. Ressalta-se ainda que as culturas de sangue podem ser negativas mesmo em presença de pneumonia, meningite ou quadros sépticos comprovados por necropsia (GERDES 1991; GAYNES, 1996; MESSER et al., 1996; PANERO et al., 1997; KUSTER et al., 1998; RUGOLO, 2000; BALTIMORE, 2003; KAUFMAN e FAIRCHILD, 2004; GERDES, 2004).

A obtenção de líquido cefalorraquidiano para análise citobioquímica e cultura também é importante na avaliação de um recém-nascido séptico devido à possibilidade de invasão do sistema nervoso central a partir de um ponto de bacteremia. A coleta é considerada obrigatória nos casos de sepse tardia, mesmo sem sinais neurológicos evidentes. Caso a condição clínica da criança não permita, a coleta deve ser realizada posteriormente, após a melhora clínica e sem implicar em atraso no início do uso de antimicrobianos (permitindo ao menos a análise citobioquímica neste caso). O isolamento de um microrganismo no líquido cefalorraquidiano é considerado como evidência de meningite, independente de alteração citobioquímica e um número significativo (até 30%) de recém-nascidos prematuros e de muito baixo peso podem ter sepse com cultura de líquido positiva, apesar da hemocultura negativa (RUGOLO, 2000; BALTIMORE, 2003; KAUFMAN e FAIRCHILD, 2004; GERDES, 2004; STOLL et al., 2004).

A cultura de urina não tem indicação nos casos de sepse precoce, porém, é muito importante nos casos de sepse tardia, uma vez que a apresentação de sepse e infecção urinária são similares e a manifestação inicial de um quadro de malformação de vias urinárias pode ser a de infecção. A amostra deve ser obtida por punção suprapúbica ou por cateterização uretral, já que o espécime colhido por saco coletor pode apresentar contaminação de coleta. Como a amostra percutânea não é fácil de ser obtida devido ao tamanho pequeno da bexiga e ausência de diurese nos casos graves de sepse, o tratamento não pode ser adiado até que se obtenha a amostra (BALTIMORE, 2003; GERDES, 2004; KAUFMAN e FAIRCHILD, 2004).

Em virtude do tempo de espera dos resultados das culturas, houve contínuo interesse em se encontrar um teste diagnóstico que auxilie na detecção de recém-nascidos sépticos, até que se espere o resultado das culturas.

No entanto, alguns exames como alfa1-antitripsina, fibronectina, haptoglobina, lactoferrina, neopterina, velocidade de hemossedimentação e orosomucóide, foram suplantados por outros exames melhores e mais sofisticados ou abandonados por apresentarem uma série de inconvenientes, tais como acurácia diagnóstica limitada, exigirem manuseio especial e não poderem ser encontrados nos laboratórios clínicos rotineiros (BALTIMORE 2003; NG 2004; GERDES, 2004).

Dos exames acima merece destaque a velocidade de hemossedimentação, à qual é uma medida indireta da quantidade de fibrinogênio sérico, uma das proteínas que aumentam durante a reação de fase aguda. O exame é usado desde a década de 1920 como um indicador de reação inflamatória. Ele apresenta uma série de desvantagens que o afastam do marcador ideal: exige sangue recentemente colhido (não pode ser armazenado); a elevação é lenta (não é marcador precoce); o retorno ao valor de normalidade é lento mesmo com melhora clínica evidente e o valor do teste é bastante influenciado pelo tamanho, forma e número de hemáceas como um falso aumento na anemia e um falso valor menor na policitemia (JAYE e WAITES, 1997; GABAY e KUSHNER, 1999).

Como a sepse induz potente reação inflamatória, alguns dos mediadores presentes, no fenômeno, sejam humorais ou celulares, são utilizados como marcadores diagnósticos. Podem ser citados, entre outros, a interleucina-8, o leucograma, a proteína C-reativa, a interleucina-1 β , a interleucina-6, o fator de necrose tumoral- α e a procalcitonina.

A interleucina-8 é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, macrófagos e células endoteliais e está envolvida no recrutamento e ativação de leucócitos nos sítios de inflamação. Ela foi avaliada em alguns estudos de sepse tardia, e apesar de seu importante papel na fisiopatologia da doença, a citocina não tem se mostrado um bom marcador diagnóstico.

CECCON (2002) demonstrou que a citocina apresentou os menores valores de sensibilidade e especificidade em quadros de sepse tardia neonatal quando comparada àqueles apresentados pela IL-6 e PCR. GONZALES et al. (2003) demonstraram que os níveis da IL-8 em pacientes com sepse neonatal confirmada por cultura não diferiram daqueles apresentados pelos recém-nascidos não infectados, em dois momentos de coleta.

BENTLIN (2003) avaliou o uso da IL-8 sérica e urinária em quadros de sepse tardia e a mediana dos valores sanguíneos do marcador não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos séptico e não infectado. Ao contrário, a IL-8 urinária mostrou-se altamente sensível e específica.

O leucograma foi o primeiro exame e ainda é o mais largamente utilizado para o diagnóstico de sepse neonatal. Nos Estados Unidos, cerca de 400000 a 600000 recém-nascidos são avaliados anualmente devido à suspeita de sepse, através de coleta de hemograma e hemocultura (ESCOBAR, 2003; GERDES, 2004). No entanto, sua avaliação correta esbarra em dois pontos principais: a definição dos valores de normalidade e problemas em relação à leitura das lâminas.

A definição dos valores de normalidade do leucograma para o período neonatal ainda não foi perfeitamente definida. Os valores estabelecidos por MANROE et al. (1979) são os mais utilizados mundialmente, embora críticas possam ser feitas pois a população hoje atendida nas unidades de terapias intensivas é bastante diversa à daquela época. Outros autores estabeleceram outros padrões de contagem neutrofílica, notando-se uma tendência normal dos recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer, “normais” e “saudáveis” sob outros aspectos, a se mostrarem “neutropênicos”, isto é, com valores de neutrófilos totais menores que os apresentados pelo trabalho citado acima (LLOYD e OTO, 1982; MOUZINHO et al., 1984).

A própria obtenção de uma população “saudável” e “normal” de recém-nascidos, especialmente entre os prematuros, já é uma situação clínica difícil, uma vez que a própria prematuridade já traz em si alguma complicação que levou à interrupção da gestação. Deste modo, inúmeros distúrbios da gravidez, do trabalho de parto e complicações neonatais alteram a dinâmica leucocitária em maior ou menor extensão,

especialmente nos primeiros dias de vida. São citados como modificadores da dinâmica e contagem leucocitária: hipertensão materna, trabalho de parto prolongado, ruptura prolongada de membranas, febre materna, asfixia perinatal, pneumotórax, crises de apnéia, hemorragia intracraniana e estado pós-operatório (MANROE et al., 1979; LLOYD e OTO, 1982; RODWELL et al., 1993; MOUZINHO et al., 1984; SILVA, et al., 1995; GERDES, 2004).

A leitura da lâmina do leucograma também pode apresentar uma ampla variabilidade interpessoal na avaliação do esfregaço sangüíneo e está sujeita assim à subjetividade do examinador, uma vez que a própria definição do que seja um neutrófilo maduro ou imaturo é artificial e sujeito a confundimento (SILVA, et al., 1995; SCHELONKA et al., 1995; GRACIA et al., 2003; GERDES, 2004).

Os índices de acurácia do teste variam amplamente nos trabalhos, uma vez que a cinética leucocitária no período neonatal ainda não está perfeitamente esclarecida e variações normais dos índices leucocitários ocorrem amplamente, de acordo com a idade do recém-nascido, local de coleta da amostra e inclusão de sepse provável (não confirmada por cultura) nos trabalhos, entre outros fatores confundidores (GERDES, 2004).

A proteína C-reativa é uma proteína da fase aguda produzida no fígado e cuja síntese é estimulada por vários fatores, principalmente a interleucina-1, a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa. Ela tem função importante na defesa contra patógenos bacterianos e fúngicos, e na remoção de células necróticas e apoptóticas (PIZZINI, 2000; VOLANAKIS, 2001). Sua meia-vida em recém-nascidos é de 21 horas, à qual é muito próxima ao valor encontrado em adultos -19 horas (EHL et., 1999). Como não ocorre passagem transplacentária da proteína, a elevação dos níveis séricos no recém-nascido representa síntese endógena (AIBENDER et al., 1982; JAYE e WAITES, 1997; CHIESA et al., 2001).

Os valores séricos iniciais da proteína são normalmente baixos na suspeita do quadro séptico, o que faz com que ela não seja considerada um marcador precoce da doença. No entanto, a ascensão que se segue em 12-24 horas é característica e a proteína atinge valores séricos bem elevados no transcorrer da sepse, decaindo os níveis com a cura

do processo, e normalização a partir do terceiro ao quinto dia, quando a evolução é satisfatória. A manutenção de níveis séricos elevados indica complicação ou falha terapêutica. Assim, a coleta seriada tem sido utilizada tanto para se firmar o diagnóstico como para monitorar o tratamento e indicar a suspensão de antimicrobianos quando a avaliação seriada mostra-se seguidamente normal (MATHERS e POHLANDT, 1987; POURCYROS, 1993; BERGER 1995; KAWAMURA e NISHIDA, 1995; JAYE e WAITES, 1997; EHL et al., 1997; NG 1997; EHL, 1999; RONNESTAD et al., 1999; PHILIP e MILLS, 2000; GERDES, 2001; GRACÍA, 2003; ALBERTONI, 2004).

Seus níveis séricos se alteram durante fenômenos inflamatórios e sepse e, em relação ao leucograma, ela se mostrou um exame mais útil, principalmente depois do desenvolvimento de técnicas quantitativas precisas para sua medição. Porém, ela também sofre influências importantes de condições próprias da idade como parto normal complicado, asfixia perinatal grave, pneumonite por aspiração meconial, hemorragia peri e intraventricular, ruptura prolongada de membranas e sofrimento fetal agudo.

Em visto disso, há dificuldade em se determinar um valor de normalidade mais preciso para o exame, especialmente nos três primeiros dias de vida (SILVA et al., 1995; JAYE e WAITES, 1997; CHIESA et al., 2001). Os níveis séricos ascendem logo após o nascimento, atingem um pico entre 24 e 36 horas de vida e normalizam em 48 horas. Isso presumivelmente exprime algum mecanismo fisiológico de adaptação, uma vez que as alterações são mais pronunciadas no parto normais do que nos cesarianos eletivos (AIBENDER et al., 1982; SCHOUTEN-VAN MEETEREN et al, 1992; BERGER, 1995; KAWAMURA e NISHIDA, 1995; MARCHINI et al., 2000; CHIESA, 2001; ISHIBASHI, 2002).

Após o terceiro dia de vida, o valor habitualmente aceito como “normal” tem sido 1,0 mg/dl. SHINE et al. (1985), ao acompanharem 16 recém-nascidos sem sinais infecciosos durante os primeiros dias de vida, não observaram nenhum valor acima de 1,0 mg/dl e o percentil 95 foi próximo a 0,6 mg/dl. ISHIBASHI et al. (2002) analisaram amostras seriadas, entre zero e 120 horas de vida, de 88 recém-nascidos (71 deles com idade gestacional maior ou igual a 38 semanas de gestação), saudáveis e sem sinais infecciosos, e demonstraram um valor máximo de PCR de 1,37 mg/dl por volta de 36 horas

de vida. As medianas variaram entre 0,052 mg/dl e 0,563 mg/dl. Em estudo extenso envolvendo 1002 episódios de suspeita de infecção precoce e 184 de quadros tardios, BENITZ et al. (1998) mediram a concentração de PCR por nefelometria e construíram uma curva ROC para o marcador. O ponto de corte de 1,0 mg/dl foi o que apresentou a sensibilidade mais elevada.

Na literatura, os valores dos índices diagnósticos variam amplamente também, oscilando a sensibilidade entre 39 e 97,5%, a especificidade entre 47 e 100%, o valor preditivo positivo entre 6,7 e 100% e o valor preditivo negativo entre 80 e 99%.

A interleucina-6 é uma citocina envolvida no processo séptico. Ela é produzida por fibroblastos, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, células endoteliais, e por outros tipos celulares. Tem ação multifuncional e interativa e envolvida em uma série de eventos fisiológicos e fisiopatológicos, tais como estimulação da hematopoiese, ativação e diferenciação de linfócitos T, maturação de linfócitos B em plasmócitos e possui ainda atuação importante nos processos inflamatórios. Sua síntese é estimulada pelo TNF- α , IL-1, IL-3, lipopolissacarídeo bacteriano, interferon- β , fatores estimuladores de formação de colônias granulocíticas, RNA, vírus e bactérias (LE e VILCEK, 1989; GROLL et al. 1992).

A citocina é a principal indutora da síntese de proteínas da fase aguda nos hepatócitos, agindo em sinergismo com TNF- α , IL-1 e glicorticóides. Exerce um efeito importante na contra-regulação inflamatória por inibir a síntese de TNF- α (seu indutor), e age também na indução da febre, em ação conjunta com IL-1 e TNF- α (LE e VILCEK, 1989; GROLL et al., 1992; NESIN e CUNNINGHAM-RUNDLES, 2000).

Ela tem sido referida como um marcador precoce de sepse uma vez que os níveis séricos da citocina encontram-se mais alterados no início dos sintomas e essa seria a sua grande vantagem como marcador diagnóstico. Porém, ao contrário do comportamento da PCR, os níveis plasmáticos caem rapidamente para a normalidade em 24-48 horas devido à sua meia-vida curta e eles podem não ser mais detectáveis então, gerando resultados falsos-negativos (BUCK et al., 1994; PANERO et al., 1997, GRACÍA et al., 2003; NG, 2003).

Em vista disso, a acurácia da citocina tem sido considerada alta no momento da suspeita clínica e mais elevada que a apresentada pelo leucograma. NG et al. (1997), apontam uma sensibilidade de 89% e especificidade de 96% e GRACÍA et al. (2003) demonstraram valores de 91,6% e 77,2%, respectivamente.

O fator de necrose tumoral-alfa é uma citocina secretada por monócitos e macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios, com receptores presentes virtualmente em todos os tipos celulares do corpo e sendo considerado um mediador importante na sepsis (BEUTLER e CERAMI, 1987; MICHIE et al., 1988; POLL et al., 1990).

Em estudos realizados com injeção experimental do mediador em humanos observa-se que ele é responsável (ou co-responsável) por grande parte dos sintomas associados à infecção: piloereção, cefaléia, náuseas, vômitos, febre, calafrios, “aspecto de doente”, mialgia, taquicardia. A depender da dose o mediador leva à instalação de quadro semelhante ao do choque séptico: hipotensão, depressão miocárdica, dano vascular generalizado, lesão tissular extensa, estímulo da cascata da coagulação, pneumonite intersticial, necrose tubular aguda e hemorragia gastrointestinal, adrenal e pancreática (BEUTLER e CERAMI, 1987; MICHIE et al., 1988; POLL et al., 1990; PFEFFER, 2003).

Os efeitos hemodinâmicos da citocina podem ser pronunciados uma vez que o miocárdio possui grandes macrófagos teciduais e os miócitos podem secretar TNF- α em resposta à isquemia. Entre estes efeitos cardiovasculares estão a diminuição da fração de ejeção ventricular, déficit contrátil, hipotensão, diminuição da resistência vascular periférica e dilatação biventricular (MELDRUN, 1998).

Apos injeção única de endotoxina em voluntários humanos, a citocina atinge um pico em 90 minutos e perdura por cerca de 180 minutos. A sintomatologia aparece depois do pico e os níveis caem a seguir, à medida que os sintomas se tornam mais exuberantes (BEUTLER e CERAMI, 1987; MICHIE et al., 1988). Em coletas seriadas em recém-nascidos sépticos, ROMAN et al. (1993) demonstraram a normalização dos níveis séricos em menos de 51 h.

Embora inicialmente relacionado aos quadros de sepse por bactérias gram-negativas, trabalhos posteriores mostraram que a citocina também apresenta níveis séricos elevados durante a sepse por bactérias gram-positivas, fungos ou infecções polimicrobianas (ROMAN et al., 1993; HARRIS et al., 1994; NG et al., 2003; KINASEWITZ et al. 2004).

Os níveis séricos da citocina também apresentam uma relação temporal importante e eles se encontram mais alterados no início do quadro, momento este em que o desempenho diagnóstico do marcador tem sido referido como bom e com valores de sensibilidade elevados, variando de 82 a 98%, e com especificidade variável - 43 a 100% (ROMAN et al., 1993; SILVEIRA e PROCIANOY, 1999; NG et al., 2003).

Como o desempenho de cada marcador individualmente pode sofrer limitações em seu poder discriminatório, cada vez mais tem sido preconizado a associação de marcadores a fim de que se possa garantir uma acurácia diagnóstica mais elevada. Por exemplo, como a PCR apresenta sua melhor acurácia após 12-24 horas de iniciado o processo séptico, e a IL-6 e o TNF- α são mais úteis no momento do início dos sintomas, a associação dos exames nesses momentos poderia fortalecer (ou afastar) com mais segurança e fidedignidade o diagnóstico (NG et al., 1997; SILVEIRA e PROCIANOY, 1999; GRACÍA et al., 2003; NG, 2004; VOLANTE et al., 2004).

Além da busca de melhores marcadores diagnósticos para a sepse, os trabalhos mais recentes, tanto em população adulta como pediátrica, têm procurado mostrar se tais testes laboratoriais possuem a capacidade de determinar o estadiamento evolutivo da doença de modo a serem utilizados como indicadores de complicações como choque, coagulação intravascular disseminada, disfunção orgânica múltipla e óbito. Tais estudos esbarram na dificuldade de padronização dos métodos de dosagem dos testes e também na falta de standardização dos escores de gravidade na faixa etária pediátrica, especialmente a neonatal (LEVY et al., 2003; CHIESA et al., 2004; GOLDSTEIN et al., 2005).

Entre os possíveis candidatos de serem considerados como indicadores prognósticos na sepse estão a IL-6, o TNF- α e procalcitonina. Esta última tem se mostrado útil no diagnóstico pois seus níveis ascendem-se rapidamente no curso da doença,

atingem um pico precocemente em 6 horas, mantém níveis elevados por 24 horas e a seguir caem. Em dois trabalhos com sepse tardia, a sensibilidade do teste foi de 92,6 e 97% (CHIESA et al., 1998; VAZZALWAR et al., 2005). Níveis séricos muito elevados de procalcitonina têm sido correlacionados com a gravidade da doença (ROSSUM et al., 2004).

O Serviço de Neonatologia do CAISM-UNICAMP tem 19 anos de atendimento terciário a uma região de cerca de três milhões de habitantes e a sepse neonatal constitui-se uma ocorrência freqüente na Unidade. No ano de 2002, a densidade de incidência global de infecção (critérios NNIS) foi de 23,1/1000 pacientes-dia, a de infecção adquirida foi de 19,4/1000 pacientes/dia e a densidade de incidência de infecção da corrente sangüínea foi de 4,29/1000 pacientes-dia (Dados do Centro de Controle de Infecção Hospitalar do CAISM-UNICAMP). A doença já foi mais incidente e com taxas elevadas de infecção por bactérias multi-resistentes, especialmente *Enterobacter cloacae*. Porém, graças a um programa educativo de toda equipe médica e de enfermagem, busca por diagnósticos clínicos e laboratoriais mais precisos e uso racional de antimicrobianos, obteve-se um bom controle da doença (CALIL et al., 2001).

Na triagem infecciosa dos recém-nascidos, diante de uma suspeita clínica de sepse neonatal tardia, o Serviço rotineiramente realiza a coleta de sangue para o leucograma e PCR e, após coletas de duas amostras de hemoculturas, líquido e urina, se possível, inicia-se o tratamento antibiótico, além dos cuidados gerais com o recém-nascido. Enquanto se aguarda os resultados das culturas, mantém-se a observação clínica e reavaliações rigorosas a fim de se confirmar ou afastar a doença. Embora tal conduta seja usada correntemente e a equipe esteja bastante habituada com sua interpretação, não havia uma análise mais objetiva desse processo e o trabalho em questão se prestou a isso, adicionando mais dois exames laboratoriais para a avaliação da sepse neonatal tardia.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar o uso do leucograma e de marcadores inflamatórios séricos, isoladamente e em combinação, no diagnóstico da sepse neonatal tardia.

2.2- Objetivos Específicos

2.2.1- Avaliar o uso do leucograma para o diagnóstico da sepse neonatal tardia.

2.2.2- Avaliar o uso da proteína C-reativa para o diagnóstico da sepse neonatal tardia.

2.2.3- Avaliar o uso da interleucina-6 para o diagnóstico da sepse neonatal tardia.

2.2.4- Avaliar o uso do fator de necrose tumoral-alfa para o diagnóstico da sepse neonatal tardia.

2.2.5- Avaliar a associação dos marcadores para o diagnóstico da sepse neonatal tardia.

2.2.6- Avaliar a relação dos marcadores com evolução complicada por choque e óbito.

3- SUJEITOS E MÉTODOS

3.1- Desenho do Estudo

O estudo foi de validação diagnóstica

3.2- Tamanho amostral

A determinação do tamanho amostral se baseou em encontrar intervalos de confiança exatos de 95%, para a sensibilidade de cada teste diagnóstico, com uma precisão satisfatória. Baseado no trabalho de SILVEIRA e PROCIANOY (1999), em que se obteve uma taxa de sensibilidade de 90% e 87,9%, para a IL-6 e TNF- α , respectivamente, esperou-se encontrar taxas de sensibilidade semelhantes. Considerando-se encontrar no estudo um tamanho amostral de 30 casos de cultura positiva, isso permitiu estimar a sensibilidade para os testes com uma precisão de 12,5% e 14,0%, respectivamente, e considerando a taxa de positividade da hemocultura em 44%, o tamanho amostral final foi estimado de 69 pacientes, sendo 30 casos com cultura positiva e 39 casos com cultura negativa.

3.3- Casuística

Os sujeitos deste estudo foram recém-nascidos com suspeita clínica de sepse, internados no Setor de Neonatologia do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), no período de setembro de 2001 a maio de 2003, com idade entre três e trinta dias de vida, no momento da suspeita clínica. Além disso, foram obrigatórios para inclusão: autorização dos pais para a coleta dos exames e a obtenção seriada dos exames (pelo menos as primeiras e segundas amostras).

Foram critérios de exclusão:

- Crianças com infecção crônica congênita, suspeita ou confirmada;
- Uso prévio de imunoglobulina humana e/ou de fator estimulante de formação de colônia granulocítica;

Observação: o uso prévio de antimicrobianos não foi motivo de exclusão pois, embora as culturas fossem negativas por esse motivo, as crianças foram agrupadas como “não infectadas” ou “ com infecção provável”, na definição dos grupos estudados.

3.4- Metodologia

3.4.1- Seleção dos sujeitos

A seleção inicial dos sujeitos foi feita com base na suspeita clínica de sepse pela equipe assistencial, evidenciada pela presença de sinais e sintomas sugestivos de quadro séptico. Nestes recém-nascidos, de acordo com a rotina do serviço, foram colhidas amostras de sangue para hemograma, PCR e hemocultura, e coletas de líquido e urina. Após coleta de culturas, a antibioticoterapia foi iniciada em todos eles.

Foram considerados como indicativos de sepse os seguintes sinais e sintomas, em combinações variáveis: distermia, apnéia ou piora dos padrões de apnéia, bradicardia, taquicardia, hipoatividade e alteração do estado geral, rendilhado cutâneo, palidez cutânea, alteração da perfusão periférica, taquipnéia, piora do padrão respiratório prévio, crises de cianose, vômitos, resíduos gástricos, distensão abdominal, enterorragia, sangramentos em geral, gemência, alteração aguda do tônus ou comportamento (hipotonia ou hipertonia, irritabilidade, letargia, convulsão) e “o recém-nascido que não parece bem”.

Esses sujeitos com suspeita de quadro séptico foram os escolhidos para o estudo, e deles foram colhidas amostras seriadas de sangue para dosagem dos marcadores.

Todas as decisões clínicas tomadas em relação ao tratamento do RN, tais como continuidade ou interrupção, foram efetuadas pela equipe assistente, baseadas nos exames rotineiros e na avaliação clínica.

Após revisão do prontuário médico desses recém-nascidos foi possível classificar os sujeitos em três grupos, de acordo com a evolução que tiveram:

- 1- Sepse comprovada por cultura, nos quais o tratamento foi mantido;
- 2- Infecção provável, nos quais o tratamento também foi mantido;
- 3- Não infectados, nos quais os antibióticos foram suspensos em até 72 horas.

3.4.2- Métodos de obtenção das amostras e dosagens dos marcadores

Os sujeitos com suspeita de quadro séptico foram os escolhidos para o estudo, e deles foram colhidas três amostras seriadas de sangue para dosagem da PCR, IL-6 e TNF- α nos seguintes tempos: no momento da suspeita clínica, 24 horas e 48 horas após. Em cada momento foram colhidos dois ml de sangue.

O hemograma avaliado no estudo foi o utilizado pela equipe assistencial na avaliação do recém-nascido.

As dosagens de proteína C-reativa utilizadas pela equipe atendente foram realizadas pelo método de nefelometria e não foram avaliadas no trabalho em questão.

As amostras de sangue para dosagem de PCR, IL-6 e TNF- α foram obtidas por punção venosa ou de calcânhar, e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas, onde foram processadas e congeladas a -20° C. A realização dos exames da pesquisa foi efetuada posteriormente, em momento único, por um técnico especializado e que desconhecia os dados clínicos das crianças. A equipe assistencial não foi informada a respeito do resultado dos mesmos.

As dosagens dos três marcadores humorais foram determinadas em analisador automático (IMMULITE® - Euro/DPC Ltd PILK6P-4) por ensaio enzima-imunométrico - quimioluminescência. A técnica consiste em um ensaio imunoenzimático no qual primeiramente a amostra de soro é pipetada diretamente na unidade de teste, juntamente com o tampão de reação (matriz protéica) e com o conjugado (anti-PCR ou anti-IL-6 ou anti-TNF- α , conforme o caso), acoplados à enzima fosfatase alcalina. No interior da unidade de teste existe uma pérola recoberta de anticorpos monoclonais específicos, e na qual irão se ligar a substância a ser testada presente na amostra e o anticorpo marcado com fosfatase alcalina (sanduíche). Após incubação a 37° C sob agitação intermitente, a unidade de teste é centrifugada em seu eixo vertical em alta velocidade. Nesta etapa, todo material que não se ligou à pérola é forçado a subir pelas paredes da unidade, capturado em um reservatório e descartado. Uma série de lavagens posteriores remove eficientemente o material remanescente e o substrato quimioluminescente é

adicionado. A enzima fosfatase alcalina hidrolisa o substrato e gera um produto instável, o qual gera continuamente emissão de fótons de luz (amplificados). Estes são medidos por um fotomultiplicador (luminômetro) e os impulsos elétricos são lidos em “contagens” de luz por segundo (cps). O sistema computadorizado em anexo realiza os cálculos, emite os resultados dos testes e gera um relatório impresso.

A sensibilidade analítica do método para a PCR é de 0,01 mg/dl, para a IL-6 de 5 pg/ml e para o TNF- α de 1,7 pg/ml. A faixa de calibração é de 15 mg/dl para o PCR, até 1000 pg/ml para a IL-6 e até 1000 pg/ml para o TNF- α . Os valores menores e maiores que esses são obtidos por extrapolação baseados nos testes de linearidade descritos pelo fabricante dos reagentes.

Optou-se por este método pelo fato do aparelho ter acesso randômico (vários exames podem ser feitos simultaneamente na mesma corrida) e em um curto espaço de tempo (tempo de reação de 30 minutos). A única parte manual é a pipetagem inicial e o restante da operação é automatizada, evitando-se manipulação e perda de material, importante no caso de recém-nascidos devido ao pequeno volume de sangue disponível para análise. O método tem sido usado em outros trabalhos descritos e com resultados superponíveis ao de técnicas mais complexas e mais caras (MARTIN et al, 2001; VIEIRA, 2001; GRACÍA et al, 2003).

As amostras de soro foram testadas em monoplicatas devido à pequena quantidade de soro.

A hemocultura foi obtida por meio da coleta asséptica de duas amostras de sangue periférico (1ml em cada amostra). O sangue foi inoculado em frasco específico, cujo sistema de leitura é automatizado (BacT/ALERT®PF - BioMérieux, Inc, Durham, NC,USA). O BacT/Alert® é um sistema totalmente automatizado, não invasivo para teste de hemocultura. Ele utiliza um avançado sistema de detecção colorimétrico para a detecção da produção do dióxido de carbono bacteriano. As amostras dos pacientes foram inoculadas nos frascos de cultura BacT/Alert® , sendo continuamente agitados numa temperatura de 35 - 37° C e cada frasco é monitorado 144 vezes ao dia, em intervalos de 10 minutos, para a detecção de microrganismos. Até o momento que o equipamento emite alertas

visuais e sonoros avisando sobre a possibilidade de crescimento bacteriano, nenhum manuseio dos frascos é necessário.

A obtenção de urina para análise de sedimento e cultura foi por punção vesical suprapúbica ou por sondagem vesical. Se a amostra não foi conseguida rapidamente, o tratamento antibiótico foi iniciado para não haver atraso em demasia.

A coleta de líquido cefalorraquidiano também foi realizada sempre que possível a depender das condições clínicas da criança.

3.4.3- Variáveis e conceitos

Sepse: Reação inflamatória sistêmica à infecção, comprovada por cultura ou clinicamente suspeita.

Sepse neonatal tardia: aquela de aparecimento após as primeiras 48 horas de vida (GAYNES et al. 1996).

Sepse comprovada por cultura: quadro séptico com comprovação microbiológica em líquido normalmente estéril.

Infecção provável: Quadro clínico compatível com sepsis, mas cujas culturas foram negativas.

Grupo não infectado: Pacientes cuja evolução e exames laboratoriais permitiram afastar um quadro infeccioso e permitiu-se a suspensão da antibioticoterapia em até 72 horas.

Crítérios NNIS: Sistema colaborativo de vigilância epidemiológica por busca ativa, estabelecido pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) americano, com a finalidade de monitorar as tendências da infecção associada a cuidados hospitalares (nosocomial), seus fatores de risco e patógenos associados (EMORI et al., 1991).

Leucograma: A interpretação do leucograma baseou-se nas tabelas de número de neutrófilos totais e da relação de neutrófilos imaturos/neutrófilos totais (índice neutrofílico), de acordo com MANROE et al. (1979). Ele foi considerado alterado quando os dois parâmetros eram anormais.

Hemocultura positiva: O resultado da hemocultura foi considerado positivo quando houve crescimento de um ou mais agentes nas duas amostras e com o mesmo padrão de antibiograma.

Urocultura positiva: considerou-se positivo o isolamento de um agente único obtido por punção supraúmbilica, com qualquer número de colônias, ou por sondagem vesical e com contagem de colônias superior ou igual a 100000 unidades formadoras de colônias.

Choque séptico: Definido como a ocorrência de sepse com disfunção cardiovascular - hipotensão de acordo com a idade; necessidade de expansão volumétrica e droga vasoativa para manter pressão arterial normal, oligúria, acidose metabólica, enchimento capilar prolongado (LEVY et al., 2001; GOLDSTEIN et al., 2005).

Óbito: aquele que ocorreu durante um episódio ativo de infecção (PESSOA-SILVA et al. 2004).

Enterocolite necrosante: critérios clínicos e radiológicos de estagiamento de Bell (WALSH, 1986).

Pneumonia: Critérios diagnósticos baseados nas definições do CDC – HORAN e GAYNES, 2004.

1- Piora de troca gasosa (dessaturação de oxigênio, aumento da necessidade de oxigênio ou da necessidade de ventilação), e

2- Pelo menos três dos seguintes achados:

- instabilidade térmica sem outra causa aparente

- alteração no leucograma
- aparecimento de catarro purulento, ou alteração de seu aspecto, ou aumento em sua quantidade ou aumento da necessidade de aspiração
- apnéia, taquipnéia, batimento de asa nasal e retração de parede torácica, ou gemido; sibilos, estertores ou roncos
- tosse.
- bradicardia ou taquicardia.

3- Duas ou mais radiografias de tórax seriadas com pelo menos um dos achados:

- Infiltrado novo
- Infiltrado anterior persistente
- Consolidação
- Cavitação
- Pneumatocele

Meningite: Além do quadro clínico de sugestivo de infecção, com ou sem sinais e sintomas neurológicos, foi considerado meningite quando a cultura de líquido cefalorraquidiano foi positiva e/ou havia anormalidades da avaliação citobioquímica do líquido (SARF et al., 1976; HORAN e GAYNES, 2004).

Infecção do trato urinário: caracterizada pela urocultura positiva (HORAN e GAYNES, 2004).

Peso ao nascer: É o primeiro peso de um nascido vivo ou feto nascido morto obtido dentro de 24 horas do nascimento (WHO, 1987).

Idade gestacional: medida em semanas inteiras, e obtida a partir da data da última menstruação materna, ecografia e métodos estimativos de Capurro (CAPURRO et al. 1978) e New Ballard (BALLARD et al. 1981).

Idade à suspeita: Idade do recém-nascido em dias quando houve a suspeita clínica de sepse.

Apgar de primeiro minuto: corresponde ao valor do boletim de Apgar, dado com um minuto de vida (APGAR, 1953).

Apgar de quinto minuto: corresponde ao valor do boletim de Apgar, dado com cinco minutos de vida (APGAR, 1953).

Estado nutricional: Corresponde à classificação do peso do recém-nascido de acordo com a idade gestacional, usando como padrão a curva de Colorado (LUBCHENCO et al. 1972), sendo cada RN classificado em adequado para idade gestacional (AIG), pequeno para idade gestacional (PIG) ou grande para idade gestacional (GIG).

Sexo: corresponde ao sexo do recém-nascido, determinado por ocasião do nascimento, masculino ou feminino.

Baixo peso ao nascer: Peso menor que 2500g (WHO, 1987).

Muito baixo peso ao nascer: Peso menor que 1500g (WHO, 1987).

Recém-nascido prematuro: Criança nascida com menos de 37 semanas completas de gestação -menos de 259 dias completos (WHO, 1987).

Recém-nascido de termo: Criança nascida entre 37 semanas e 42 semanas completas - 259 a 293 dias completos (WHO, 1987).

Apnéia: interrupção dos movimentos respiratórios por pelo menos vinte segundos, ou duração menor mas associada à queda de saturação de oxigênio, bradicardia e/ou à cianose.

Taquicardia: frequência cardíaca maior ou igual a 180 batimentos por minutos.

Bradicardia: frequência cardíaca menos ou igual a 80 batimentos por minutos.

Taquipnéia: frequência respiratória maior ou igual a 80 incursões por minutos.

Hipotensão: valores de pressão arterial medidos por método oscilométrico e analisados de acordo com ZUBROWN et al. (1995).

3.4.4- Coleta de dados e instrumentos

Os dados foram coletados do prontuário médico usado no Serviço de Neonatologia do CAISM e posteriormente transferido para uma ficha pré-codificada (ANEXO I).

3.4.5- Processamento dos Dados

Os dados contidos na ficha pré-codificada foram revisados manualmente para se detectar erros de seleção ou preenchimento. Posteriormente, eles foram digitados e codificados em um arquivo, em microcomputador, utilizando-se o padrão disponível no programa estatístico *SPSS 7.5 for Windows*. Após digitação dos casos, fez-se verificação manual dos dados confrontando-os com aqueles presentes na ficha original, a fim de se evitar erros.

3.4.6- Análise dos Dados

Como a distribuição dos níveis séricos dos marcadores não é normal, eles foram apresentados como mediana.

O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparação dos grupos quanto ao peso de nascimento, sexo, idade gestacional, idade à época da suspeita da infecção e agrupamento de peso menor de 1500 g. Para análise de associação referente a estado nutricional, Apgar de 1º e 5º minuto e agrupamento de peso menor de 2500g foi utilizado o teste exato de Fisher.

Para comparação dos valores de PCR, IL-6 e TNF- α entre os grupos e entre os tempos de aferição utilizou-se a análise de variância de Friedman e teste de Wilcoxon.

Na comparação entre os grupos com evolução para óbito e/ou choque e os níveis dos marcadores séricos, utilizou-se o teste de análise de variância de Kruskal-Wallis.

Como não há uma definição clara na literatura médica a respeito dos valores normais das duas citocinas e da PCR, construiu-se uma curva ROC (*receiver operator characteristic*) e os dados foram obtidos a partir da análise dos valores encontrados no grupo de recém-nascidos com sepse comprovada por cultura (os “verdadeiramente” sépticos) e no grupo de recém-nascidos não infectados. A curva é elaborada a partir de cruzamento das taxas de positivos verdadeiros (sensibilidade) nas ordenadas de um gráfico contra a taxa de falsos positivos (1-especificidade) a partir de vários pontos de corte. Testes com bom poder discriminatório tem suas curvas com desvio no canto esquerdo, onde o aumento da sensibilidade acarreta pouca diminuição da especificidade. Os limites de corte foram obtidos pelo ponto de maximização da curva, permitindo a detecção do ponto da melhor combinação de sensibilidade e especificidade. Tal ponto corresponde a mais alta taxa de acurácia do teste.

Para o cálculo dos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivo positivo e negativo utilizou-se os limites de corte obtidos pela curva ROC e os cálculos obtidos pelo teste de qui-quadrado ou Fisher.

O nível de significância aceito foi $p < 0,05$ (intervalo de confiança de 95%).

3.5- Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Campinas, e foram seguidos os princípios enunciados na DECLARAÇÃO DE HELSINKI (1990). Foi obtida a aprovação dos pais para a coleta de sangue dos recém-nascidos por meio do modelo do consentimento livre e esclarecido (ANEXO II).

4- RESULTADOS

Foram observados no período do estudo 42 crianças com episódios de sepse comprovada por cultura, 16 com infecção provável e 24 crianças não infectadas.

Quando comparados os grupos de sepse comprovada e com infecção provável com aquele de recém-nascidos não infectados, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles no tocante ao peso ao nascer, idade gestacional, idade de aparecimento dos sintomas, índice de Apgar de quinto minuto e sexo. Os recém-nascidos com infecção provável apresentaram significativamente um valor de Apgar de primeiro minuto mais baixo que os do grupo de crianças não infectadas.

Foi observado que os recém-nascidos desnutridos foram associados significativamente com os quadros infecciosos (tanto nos comprovados por cultura como nos quadros prováveis) em relação às crianças de peso de nascimento adequado para idade gestacional, embora a proporção de recém-nascidos de baixo peso e de muito baixo peso ao nascer fosse semelhante nos três grupos.

A população estudada foi constituída basicamente de prematuros. Eles constituíram aproximadamente 81% dos recém-nascidos com sepse em ambos os grupos, e 75% daqueles do grupo não infectado.

As crianças com baixo peso ao nascer também predominaram na amostra e não houve diferença estatística entre os grupos.

Os dados com as características gerais desses recém-nascidos estão expostos nas tabelas 1,2 e 3.

Tabela 1- Características gerais dos recém-nascidos dos grupos com infecção comprovada e não infectados

	Sepse Comprovada	Não infectados	p#
	(42)	(24)	
Peso ao nascer (g)*	1292,5 (470-4100)	1627,5 (830–3770)	0,1247
Idade gestacional (semanas)*	31 (25-41)	32 (24-41)	0,2792
Idade à suspeita (dias)*	14,50 (3 –30)	10,0(4-29)	0,3830
Apgar 1o minuto ≥ 7 (%)	24 (57,1)	18 (75)	0,1469
Apgar 5o minuto ≥7 (%)	37 (88,1)	23 (95,8)	0,4023
PIG (%)	15 (35,7)	0	<0,0001
Sexo masculino (%)	20 (47,6)	13 (54,2)	0,0688

* Valores de mediana. Nas características: entre parênteses valores de mínimo e máximo. Nos grupos: entre parênteses número de crianças. # Teste de Fisher ou qui-quadrado

Tabela 2- Características gerais dos recém-nascidos dos grupos com infecção provável e não infectados

	Infecção provável	Não infectados	p#
	(16)	(24)	
Peso ao nascer (g)*	1490,0 (520-3585)	1627,5 (830 – 3770)	0,4334
Idade gestacional (semanas)*	33 (26-40)	32 (24-41)	0,4321
Idade à suspeita (dias)*	12,50 (3-30)	10,0(4-29)	0,7992
Apgar 1o minuto ≥ 7 (%)	5 (31,3)	18 (75)	0,0061
Apgar 5o minuto ≥7 (%)	16 (100)	23 (95,8)	1,0000
PIG (%)	6 (37,5)	0	0,0021
Sexo masculino (%)	13 (81,3)	13 (54,2)	0,0785

* Valores de mediana. Características gerais: entre parênteses valores de mínimo e máximo. Nos grupos: entre parênteses número de crianças. # Teste de Fisher ou qui-quadrado

Tabela 3- Maturidade e classificação por grupos de peso dos recém-nascidos estudados

	Sepse comprovada	Infecção provável	Não infectados	Total
	(42)	(16)	(24)	(82)
RN de termo	8 (19)	3 (18,8)	6 (25)	17 (20,7)
RN prematuro	34 (81)	13 (81,2)	18 (75)	65 (79,3)
RN < 2500g	36 (85,7)*	13 (81,3)**	17 (70,8)	66 (80,5)
RN < 1500g	24 (57,1)#	8 (50,0)##	9 (37,5)	41 (50,0)

Número de casos (percentagem). * Sem diferença estatística em relação ao grupo não infectado (p=0,1998).

**Sem diferença estatística em relação ao grupo não infectado (p=0,7110). # Sem diferença estatística em relação ao grupo não infectado (p=0,1247). ##Sem diferença estatística em relação ao grupo não infectado (p=0,1433).

A sintomatologia foi agrupada nos seguintes modos de apresentação: gerais, respiratórias, cardiovasculares, gastrointestinais e neurológicas. Os sinais e sintomas gerais (hipoatividade, palidez cutânea, distermia, sangramentos em geral, rendilhado cutâneo, gemência) foram os mais freqüentemente encontrados (170 ocorrências). A hipoatividade foi o principal sintoma encontrado nos três grupos estudados, e esteve presente em 85,7% das crianças com sepse comprovada, em 81,3% daquelas com infecção provável e em 62,5% dos recém-nascidos sem infecção. As manifestações respiratórias (apnéia, taquipnéia, cianose, piora respiratória) aconteceram em 91 ocorrências. Sintomatologia hemodinâmica (alteração da perfusão, taquicardia, bradicardia, oligúria, hipotensão, alteração da amplitude de pulso, escleredema) esteve presente em 82 vezes. Manifestações gastrointestinais (resíduo gástrico, icterícia, distensão abdominal, dor à palpação, vômitos) estiveram presentes em 46 ocasiões. As alterações neurológicas (irritabilidade, coma, convulsão) foram poucos freqüentes e em apenas 11 momentos. A ocorrência dos sinais e sintomas nos grupos encontra-se resumida na tabela 4.

Tabela 4- Sintomatologia encontrada nos grupos com sepse comprovada, clínica e não infectados.

	Sepse comprovada	Infecção provável	Não infectados
Hipoatividade	36(85,7)	13 (81,3)	15 (62,5)
Palidez	32 (76,2)	9 (56,3)	4 (16,7)
Apnéia	27 (64,3)	4 (25)	5 (20,8)
Taquipnéia	16(38,1)	4 (25,0)	6 (25,0)
Perfusão alterada	15 (35,7)	6 (37,5)	2 (8,3)
Hipertermia	12 (28,6)	2 (12,5)	7 (29,2)
Hipotermia	11(26,2)	2 (12,5)	3 (12,5)
Bradycardia	11 (26,2)	1 (6,3)	3 (12,5)
Cianose	11 (26,2)	3 (18,8)	0
Resíduo gástrico	10 (23,8)	3 (18,8)	0
Oligúria	10 (23,8)	1 (6,3)	0
Icterícia	7 (16,7)	4 (25)	2 (8,3)
Hipotensão	6 (14,3)	3 (18,8)	0
Piora respiratória	5 (11,9)	5 (31,3)	5 (20,8)
Alteração de pulso	5 (11,9)	2 (12,5)	0
Sangramentos em geral	5 (11,9)	1 (6,3)	2 (8,3)
Recusa alimentar	4 (9,5)	1 (6,3)	2 (8,3)
Irritabilidade	4 (9,5)	1 (6,3)	4 (16,7)
Rendilhado cutâneo	4 (9,5)	4 (25)	1 (4,2)
Gemência	4 (9,5)	0	4 (16,7)
Escleredema	4 (9,5)	2 (12,5)	0
Distensão abdominal	4 (9,5)	7 (43,8)	3 (12,5)
Dor abdominal	2 (4,8)	5 (31,3)	0
Taquicardia	2 (4,8)	7(43,8)	1 (4,2)
Vômitos	2 (4,8)	1 (6,3)	3 (12,5)
Coma	1 (2,4)	0	0
Convulsão	1 (2,4)	0	0

Número de casos (percentagem)

No grupo com sepse comprovada, a maioria dos casos (24/42 - 67%) foi classificada como infecção primária da corrente sanguínea e em 18 casos (43%) houve localização, sendo oito casos com pneumonia, três com meningite, cinco com infecção do trato urinário, e dois com enterocolite necrosante. Neste mesmo grupo, a cultura de sangue foi positiva em 38 casos (90%), e em apenas quatro casos o agente foi isolado somente em outro material (urina obtida por punção suprapúbica). Em todos os casos de meningite, a cultura de sangue também foi positiva e em um caso de infecção sistêmica grave por fungo, tanto a cultura de sangue como a de urina foram positivas para o mesmo agente (*Candida albicans*).

No grupo de infecção provável a predominância foi de quadros localizados (12/16 - 75%), sendo cinco casos de pneumonia, cinco de enterocolite necrosante, um de adenite submandibular e um caso de meningite com cultura negativa, porém com citologia líquórica alterada (leucócitos 532/ml com predomínio de neutrófilos - 94%) e evolução fulminante com choque e óbito. Apenas quatro casos foram considerados como infecção de corrente sanguínea (compatível com o diagnóstico de “sepse clínica” do CDC).

Os diagnósticos do grupo controle foram os mais variados, porém de ocorrência comum no período neonatal e estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5- Diagnósticos encontrados nos recém-nascidos do grupo de crianças não infectadas

Diagnóstico	Frequência
Estado pós-operatório	4 (16,0)
Doença de membrana hialina	3 (12,5)
Apnéia primária	3 (12,5)
Suspeita de enterocolite necrosante	3 (12,5)
Hipertermia	3 (12,5)
Atelectasia	3 (12,5)
Sangramento do sistema nervoso central	2 (8,0)
Displasia broncopulmonar	2 (8,0)
Insuficiência cardíaca	1 (4,0)

número de casos (percentagem)

Os cocos gram-positivos foram as bactérias mais frequentemente encontradas nas culturas, correspondendo a 78,5% dos isolados sangüíneos, principalmente *S. epidermidis* (16 –38,1%) e *S. aureus* (12 –28,6%). Houve apenas uma sepse fúngica, apesar do predomínio de recém-nascidos de muito baixo peso. Infecção por bactérias gram-negativas ocorreu em 7 (16,6%) e sepse por duplo agente aconteceu em dois casos. Os agentes isolados nas culturas encontram-se resumidos na tabela 6.

As hemoculturas levaram até 72 horas para identificação do agente, sendo que em 17 casos (40,4%) em até 24 horas, 21 (50%) entre 24 e 48 horas e em apenas quatro ocasiões (9,6%) obteve-se o resultado entre 48 e 72 horas após a coleta.

Tabela 6- Agentes microbiológicos isolados nas culturas

Agente	n (%)
Staphylococcus epidermidis	16 (38,1)
Staphylococcus aureus	12 (28,6)
Escherichia coli	2 (4,8)
Staphylococcus warneri	1 (2,4)
Micrococcus sp	1 (2,4)
Staphylococcus simulans	1 (2,4)
Pseudomonas aeruginosa	1 (2,4)
Acinetobacter calcoaceticus	1 (2,4)
Klebsiella pneumoniae	1 (2,4)
Pantoea agglomerans	1 (2,4)
Enterobacter cloacae	1 (2,4)
Serratia marcescens	1 (2,4)
S. aureus e P.aeruginosa	1 (2,4)
S. aureus e S. hominis	1 (2,4)
Candida albicans	1 (2,4)

número de casos (percentagem)

No grupo sepse comprovada por cultura, o leucograma foi considerado alterado em 27 casos (64,3%) e normal em 15 (35,7%). No grupo de infecção provável, o padrão foi semelhante, estando o exame alterado em 11/16 dos sujeitos (68,8%) e normal em 31,2%. Por outro lado, no grupo de crianças não infectadas, ele esteve anormal em apenas seis casos (25,0%) e normal nos 18 casos restantes (75,0%). Tabela 7.

Tabela 7- Leucograma nos grupos com sepse comprovada, infecção provável e recém-nascidos não infectados

	Sepse Comprovada	Infecção provável	Não Infectados
	(42)	(16)	(24)
Normal (%)	15 (35,7)	5 (31,3)	18 (75,0)
Alterado (%)	27 (64,3)	11 (68,8)	6 (25,0)

Número de casos (percentagem)

A mediana da PCR mostrou-se elevada nos três tempos de aferição nos dois grupos sépticos, com diferença estatisticamente significativa em todos os momentos em relação ao grupo de recém-nascidos não infectados ($p < 0,0001$). Nos grupos de recém-nascidos com sepse comprovada, foi verificada uma ascensão significativa do valor da mediana da primeira medida para a segunda aferição ($p = 0,0019$) e uma queda no valor da mediana da segunda para a terceira medida. Essa queda, porém, não teve valor estatisticamente significativo ($p = 0,2449$). Nos recém-nascidos com infecção provável tal fato se repetiu, com ascensão estatisticamente significativa da mediana do primeiro para o segundo valor ($p = 0,0155$) e queda não significativa da segunda para a terceira aferição ($p = 0,1876$). Nos recém-nascidos controles, a leve ascensão do valor da segunda mediana da PCR não teve valor estatístico ($p = 0,4120$). Os valores da mediana da PCR encontradas nos três tempos de medida e para cada grupo estão demonstradas nas tabela 8 e 9 e nos gráficos 1 e 2.

Tabela 8- Valores de mediana da PCR nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados

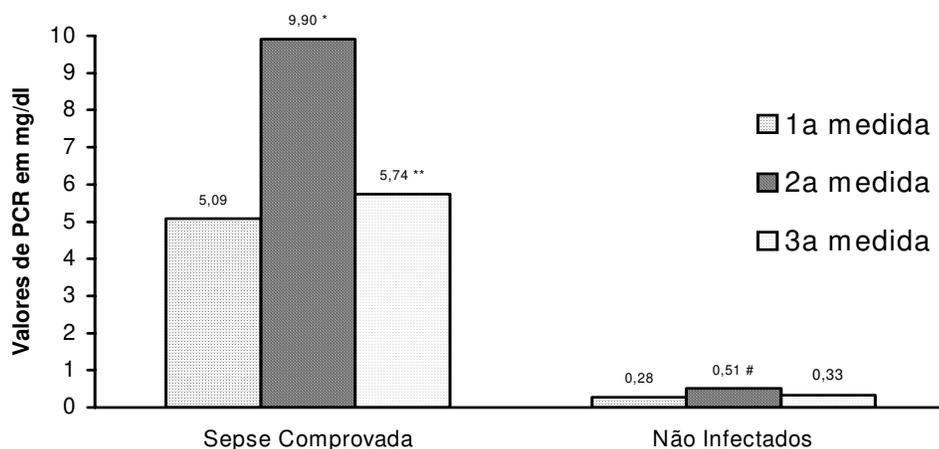
	Sepse Comprovada (42)	Não Infectados (24)	p*
PCR 1ª medida	5,09 (0,56-30,60)	0,28 (0,01-3,61)	<0,0001
PCR 2ª medida	9,90 (0,29–83,20)	0,51 (0,01-2,38)	<0,0001
PCR 3ª medida	5,74 (0,11-144,00)	0,33 (0,02-3,20)	<0,0001

Valores expressos em mg/dl. Valores mínimos e máximos entre parênteses. *Teste de Wilcoxon

Tabela 9- Valores de mediana da PCR nos grupos de infecção provável e de recém-nascidos não infectados

	Infecção provável (16)	Não Infectados (24)	p*
PCR 1ª medida	4,14 (0,19-31,30)	0,28 (0,01-3,61)	<0,0001
PCR 2ª medida	9,93 (0,70-31,90)	0,51 (0,01-2,38)	<0,0001
PCR 3ª medida	6,21 (0,46-60,90)	0,33 (0,02-3,20)	<0,0001

Valores expressos em mg/dl. Valores mínimos e máximos entre parênteses. *Teste de Wilcoxon



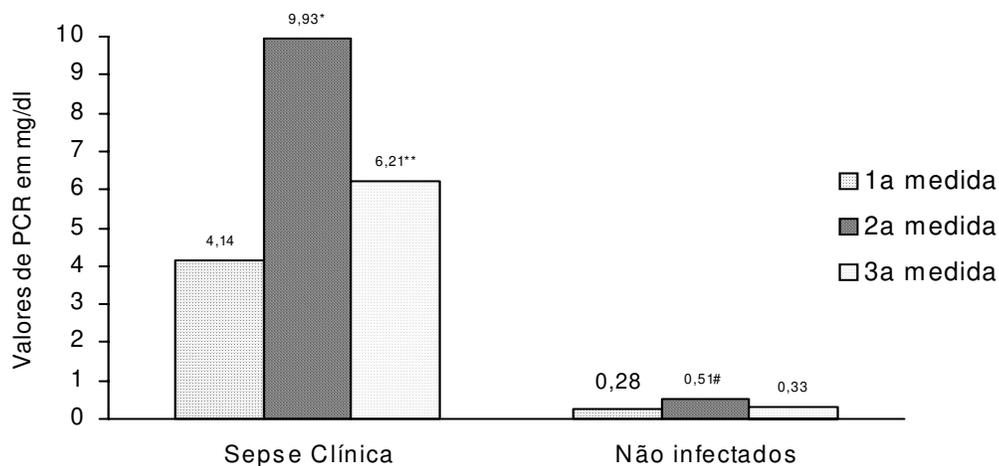
*Diferença estatisticamente significativa entre a 2ª e a primeira mediana (p=0,0019)

** Sem diferença estatística entre a segunda e terceira medianas (p=0,2449)

Sem diferença estatisticamente significativa entre a 2ª e a primeira medianas (p=0,4120) e entre a segunda e a terceira medianas (p=0,2355).

(Teste de Wilcoxon)

Gráfico 1- Valores de mediana da PCR nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados



*Diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a segunda mediana ($p=0,0155$)
 ** Sem diferença estatística entre a segunda e terceira medianas ($p=0,1876$)
 # Sem diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a segunda medianas ($p=0,4120$) nem entre a segunda e a terceira ($p=0,2355$).
 (Teste de Wilcoxon)

Gráfico 2- Valores de mediana da PCR nos grupos de infecção provável e de recém-nascidos não infectados

Os valores de mediana de IL-6 de ambos os grupos sépticos foram estatisticamente superiores aos do grupo não infectado em todos os momentos. No grupo com sepsis comprovada ocorreu queda progressiva e significativa na mediana ao longo do tempo ($p=0,0036$ da primeira para segunda medida e $p=0,0174$ da segunda para terceira aferição). No grupo de infecção provável, a mediana também apresentou queda progressiva nos valores ao longo do tempo, principalmente da primeira para a segunda medida ($p=0,0052$). Porém, essa queda não se acentuou da segunda para a terceira aferição ($p=0,0906$). No grupo não infectado, as medianas permaneceram constantes ao longo do tempo. Os valores encontrados para a interleucina-6 estão resumidos nas tabelas 10 e 11 e gráficos 3 e 4

Tabela 10- Valores de mediana da IL-6 nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados

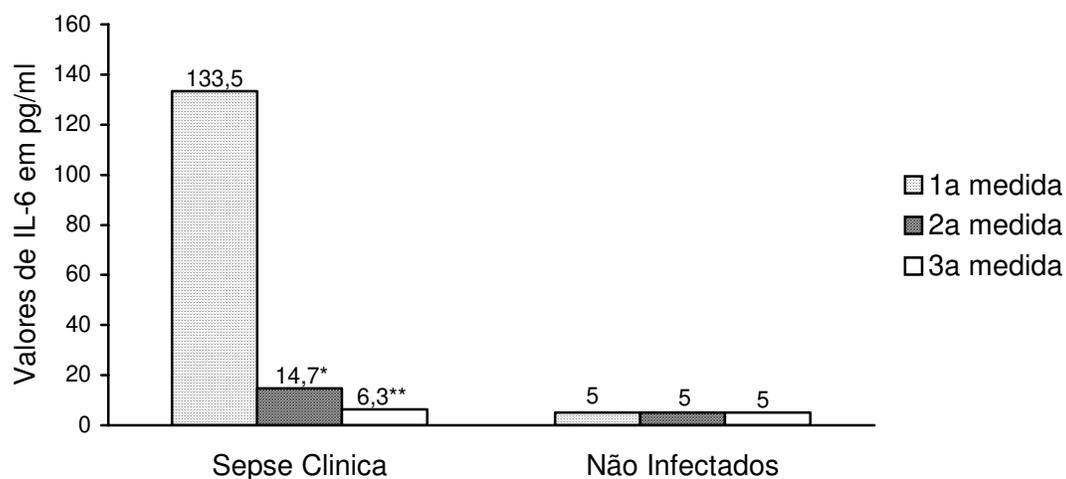
	Sepse Comprovada (42)	Não Infectados (24)	p*
IL-6 1ª medida	63,15 (3,00-29079,00)	5,00 (2,10-69,50)	<0,0001
IL-6 2ª medida	27,00 (1,60- 23818,00)	5,00 (1,30-52,30)	0,0024
IL-6 3ª medida	9,05 (0,00-19998,0)	5,00(1,00-40,10)	0,0317

Valores expressos em pg/ml. Valores mínimos e máximos entre parênteses. * Teste de Wilcoxon

Tabela 11- Valores de mediana da IL-6 nos grupos de infecção provável e de recém-nascidos não infectados

	Infecção provável (16)	Não Infectados (24)	p*
IL-6 1ª medida	133,50 (0,99 – 8746,00)	5,00 (2,10-69,50)	0,0016
IL-6 2ª medida	14,70 (1,40- 1047,00)	5,00 (1,30-52,30)	0,0219
IL-6 3ª medida	6,30 (2,40-139,0)	5,00(1,00-40,10)	0,0373

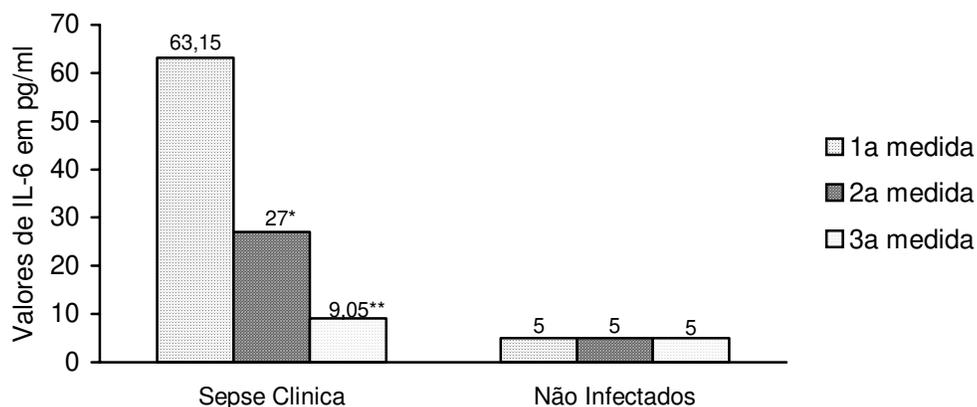
Valores expressos em pg/ml. Valores mínimos e máximos entre parênteses. Teste de Wilcoxon



* Diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a segunda medianas (p=0,0036).

** Diferença estatisticamente significativa entre a segunda e a primeira medianas (p=0,0174).

Gráfico 3- Valores de mediana da IL-6 nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados



*Diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a segunda medianas ($p=0,0052$).

**Sem diferença estatisticamente significativa entre a segunda e a terceira medianas ($p=0,0906$).

Gráfico 4- Valores de mediana da IL-6 nos grupos de infecção provável e de recém-nascidos não infectados

Em relação ao TNF- α , os valores de mediana do grupo de sepse comprovada foram mais elevados que aqueles do grupo de recém-nascidos não infectados em todos os momentos de coleta, e sempre com diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$ na primeira mediana, $p=0,0002$ para a segunda e $p=0,0038$ na terceira mediana). As medianas também mostraram queda significativa ao longo do tempo ($p=0,0145$ da primeira para segunda e $p=0,0320$ da segunda para a terceira medida). No grupo não infectado, a mediana permaneceu praticamente sem alterações estatisticamente significativas nos três tempos de medida. No grupo de infecção provável a queda nos valores não foi significativa temporalmente ($p=0,0830$ da primeira para segunda mediana e $p=0,1465$ da segunda para terceira). Além disso, as diferenças nas medianas entre esse grupo e o de recém-nascidos não infectados não foram significativas em nenhum momento de coleta (valores de p iguais a 0,1668; 0,5209; 0,9019). Os achados encontram-se nas tabelas 12 e 13 e gráficos 5 e 6.

Tabela 12- Valores de mediana do TNF- α nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados

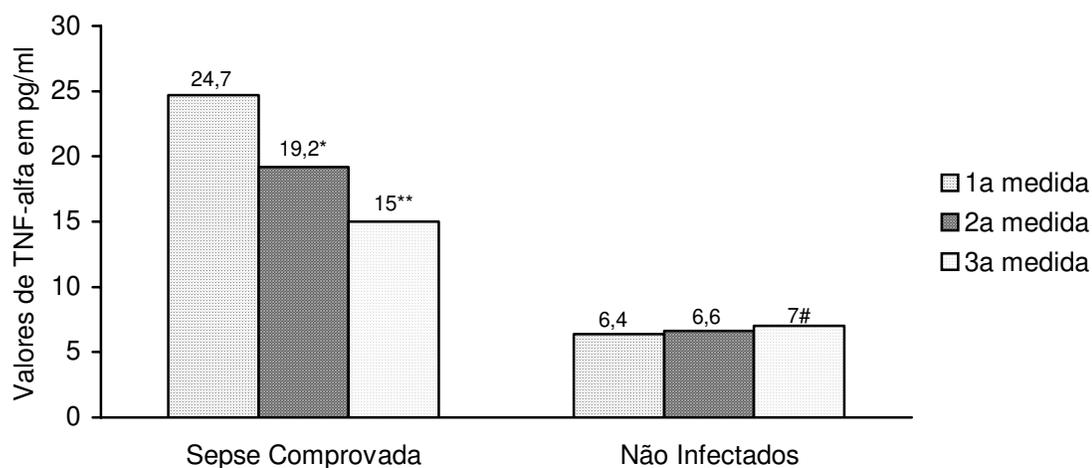
	Sepse Comprovada (42)	Não Infectados (24)	p*
TNF 1ª medida	24,70 (4,80-397,00)	6,40 (2,10-29,70)	<0,0001
TNF 2ª medida	19,20 (4,30-376,00)	6,60 (0,75- 30,40)	0,0002
TNF 3ª medida	15,00 (1,40 –238,00)	7,00 (3,70-17,30)	0,0038

Valores expressos em pg/ml. Valores mínimos e máximos entre parênteses. * Teste de Wilcoxon

Tabela 13- Valores de mediana do TNF- α nos grupos de infecção provável e de recém-nascidos não infectados

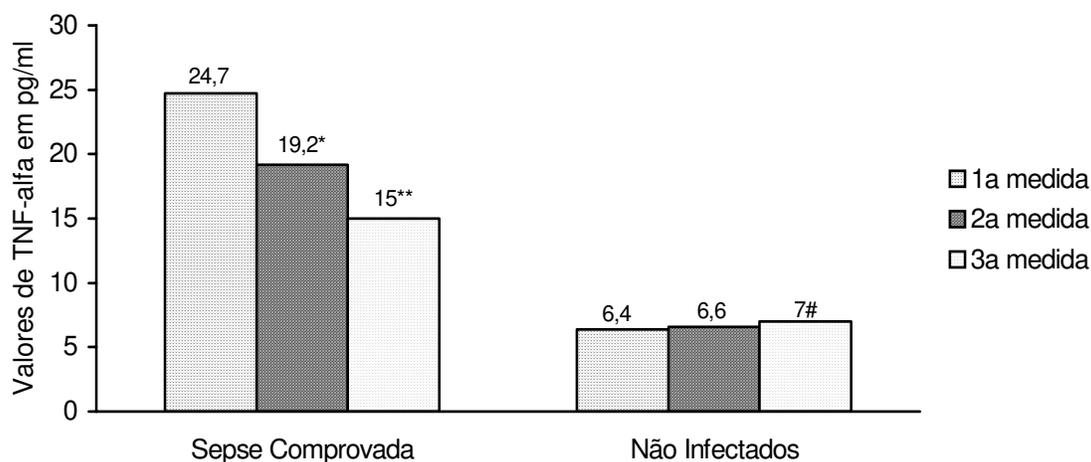
	Infecção provável (16)	Não Infectados (24)	p*
TNF 1ª medida	10,05 (0,02-47,70)	6,40 (2,10-29,70)	0,1668
TNF 2ª medida	8,10 (2,00 –37,20)	6,60 (0,75- 30,40)	0,5209
TNF 3ª medida	6,7 (2,30 –28,50)	7,00 (3,70-17,30)	0,9019

Valores expressos em pg/ml. Valores mínimos e máximos entre parênteses. * Teste de Wilcoxon



* Diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a segunda medianas ($p=0,0145$).
 ** Diferença estatisticamente significativa entre a segunda e a terceira medianas medianas ($p=0,0320$). # Sem diferença estatística entre os três tempos. (Teste de Wilcoxon)

Gráfico 5- Valores de mediana do TNF- α nos grupos de sepse comprovada e de recém-nascidos não infectados



* Sem diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a segunda medianas ($p=0,0830$).
 ** Sem diferença estatisticamente significativa entre a segunda e a terceira medianas medianas ($p=0,1465$).
 # Sem diferença estatística entre os três tempos (Teste de Wilcoxon)

Gráfico 6- Valores de mediana do TNF- α nos grupos de recém nascidos com infecção provável e não infectados

Alguns recém-nascidos tiveram sua evolução complicada por choque ou óbito (Tabela 14). O choque foi um evento freqüente em ambos os grupos sépticos, ocorrendo em 15 recém-nascidos do grupo comprovado por cultura (35,7%) e em seis crianças do grupo com infecção provável (37,5%). Ele não ocorreu no grupo não infectado. Naqueles recém-nascidos com sepse monomicrobiana, o choque ocorreu em 11/31 casos (35,5%) quando a sepse foi produzida por bactérias gram-positivas e 4/6 casos (66,7%) na sepse por bactérias gram-negativas.

O óbito ocorreu em quatro (9,5%) pacientes do grupo com sepse e em um paciente (6,3%) no grupo de infecção provável e não ocorreu no grupo não infectado. Apesar de *S. epidermidis* ser o agente mais freqüentemente isolado nos quadros de infecção da corrente sangüínea no grupo de sepse comprovada, não houve nenhum óbito entre as crianças acometidas. Todos os quatro casos de óbito no grupo com sepse comprovada foram quadros de infecção da corrente sangüínea e três deles foram determinados por bactérias gram-negativas (*P. aeruginosa*; *Serratia narcescens*; *Pantoea aglomerans*) e um caso por *S.aureus*. Todos eram prematuros e de baixo peso ao nascer (peso variando entre 1610 e 2155 g), sendo duas crianças com peso adequado para idade gestacional e duas com desnutrição intra-uterina.

No grupo de crianças com sepse comprovada verificou-se que as medianas dos marcadores séricos apresentaram-se mais elevadas naqueles com evolução complicada (choque e/ou óbito). Porém, diferença estatisticamente significativa foi notada na primeira e terceira aferições da IL-6 e na terceira medida do PCR e do TNF- α (Tabela 14 e 15).

Tabela 14- Ocorrência de choque e óbito nos grupos estudados

	Sepse Comprovada (42)	Infecção provável (16)	Não Infectados (24)
Choque	15(35,7)	6 (37,5)	0
Óbito	4 (9,5)	1 (6,3)	0

Número de casos (percentagem)

Tabela 15- Valores de mediana dos marcadores séricos e ocorrência de choque e óbito no grupo de recém-nascidos com sepse comprovada

	Óbito (4)	Choque (11)	Sem choque ou óbito (27)	p*
PCR1	20,3	5,2	4,2	0,1068
PCR2	18,5	12,6	8,3	0,0793
PCR3	43,5	6,3	4,8	0,0197
IL1	4861,0	73,5	38,8	0,0118
IL2	396,5	36,2	14,5	0,0505
IL3	3048,5	9,2	6,0	0,0090
TNF1	259,0	14,1	24,2	0,0814
TNF2	115,9	25,6	17,5	0,0767
TNF3	156,0	19,5	12,5	0,0132

Valores de mediana – PCR em mg/dl eIL-6 e TNF- α em pg/ml

* Análise de variância de Kruskal-Wallis

Alguns recém-nascidos com sepse comprovada apresentaram valores séricos dos marcadores normais. Tais crianças serão avaliadas no item “Discussão”. Todos os valores individuais dos marcadores séricos – proteína C-reativa, interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa, estão dispostos no anexo IV.

Para avaliar a precisão diagnóstica desses marcadores nos quadros de sepse, o cálculo da sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e a acurácia de cada exame foi realizado para cada momento de coleta e os limites de corte foram obtidos por pontos de inflexão com alta sensibilidade da curva ROC (*receiver operator characteristic*). Para o leucograma o cálculo foi feito por medida direta de frequência. Os limites de corte obtidos encontram-se resumidos na tabela 16.

Tabela 16- Limites de corte para os três marcadores sérios

	PCR	IL-6	TNF-α
1ª medida	1,73	25,8	12,5
2ª medida	1,16	14,0	11,0
3ª medida	1,32	5,6	12,5

Limites obtidos por ponto de maximização pela curva ROC

Valores de PCR em mg/dl e de IL-6 e TNF- α em pg/ml

Os valores desses índices para a PCR mostraram-se elevados, com a especificidade e o valor preditivo positivo ascendendo-se com o tempo. A sensibilidade e o valor preditivo negativo apresentaram queda nos valores da segunda para terceira medida. A acurácia diagnóstica mostrou-se elevada em todos os momentos (Tabela 17).

Tabela 17- Valores de Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – PCR

	Sens	Esp	VPP	VPN	Acur
1ª medida	78,6	87,5	91,7	70,0	81,8
2ª medida	90,5	87,5	92,7	84,0	89,4
3ª medida	85,7	91,7	94,7	78,6	87,9

Valores em porcentagem

A interleucina-6 apresentou índices progressivamente menores com o tempo e, do mesmo modo que a primeira medida (à suspeita do quadro) foi a mais alterada, os índices têm seus valores mais elevados na primeira aferição (comparáveis à da primeira medida da PCR), com queda importante na acurácia da primeira para a terceira aferição (Tabela 18).

Tabela 18- Valores de Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – IL-6

	Sens	Esp	VPP	VPN	Acur
1ª medida	77,5	87,0	91,2	69,0	81,0
2ª medida	64,3	83,3	87,1	57,1	71,2
3ª medida	64,3	75,0	81,8	54,5	68,2

Valores em porcentagem

Os índices do fator de necrose tumoral-alfa foram menores que os apresentados pela PCR e IL-6, mas a acurácia manteve-se praticamente constante ao longo do tempo (Tabela 19).

Tabela 19- Valores de Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – TNF- α

	Sens	Esp	VPP	VPN	Acur
1ª medida	74,3	81,8	86,7	66,7	77,2
2ª medida	71,8	86,4	90,3	63,3	77,0
3ª medida	62,2	95,2	95,8	58,8	74,1

Valores em porcentagem

O leucograma apresentou o pior desempenho dos quatro marcadores, quando comparado com o perfil apresentado por eles na primeira aferição (Tabela 20).

Tabela 20- Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – Leucograma.

	Sens	Esp	VPP	VPN	Acur
Leucograma	64,3	75,0	81,8	54,5	68,2

Valores em percentagem

A associação de testes foi realizada e ao se combinar a proteína C-reativa, a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral-alfa, em suas primeiras medidas, todos os índices, de um modo geral, sofreram um aumento significativo de valor e a acurácia alcançou seu máximo com a combinação PCR1 x TNF1, atingindo 94,7% (Tabela 21).

Tabela 21- Associação de marcadores e valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia - Primeiras medidas da PCR, Il-6 e TNF- α

	Sens	Esp	VPP	VPN	Acur
IL 1 + PCR 1	88,0	90,0	91,7	85,7	88,9
IL 1 + TNF 1	87,0	94,1	95,2	84,2	90,0
PCR 1 + TNF1	95,2	94,1	95,2	94,1	94,7

O número à frente do marcador representa o tempo de coleta
Valores em percentagem

O leucograma, o exame com pior desempenho dos quatro exames estudados, apresenta também melhora na sua performance quando associado aos outros marcadores (Tabela 22).

Tabela 22- Associação de marcadores e valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia – leucograma e marcadores séricos

	Sens	Esp	VPP	VPN	Acur
Leuc + PCR1	88,0	94,1	95,6	84,0	90,4
Leuc + IL1	85,0	94,0	94,4	84,2	89,0
Leuc + TNF1	68,0	94,4	95,0	71,0	81,3

O número à frente do marcador representa o tempo de coleta
Valores em percentagem

O estudo utilizou um limite de corte para a PCR diferente aquele utilizado da prática clínica (1mg/dl). Ao se considerar este limite, a acurácia do marcador nos dois primeiros momentos de dosagem, isoladamente e em combinação, ainda permanece elevada (Tabela 23).

Tabela 23- Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia da PCR com o limite de corte de 1,0 mg/dl

	Sens	Esp	VPP	VPN	Acur
PCR1	92,9	70,8	84,8	85,0	84,8
PCR2	92,9	83,3	90,7	87,0	89,4
PCR3	85,7	83,3	90,0	76,9	84,5
PCR1 x PCR2	95,0	84,2	92,7	88,9	91,5

Os valores à frente do marcador representam o momento de coleta
Valores em percentagem

Como a PCR apresenta seu melhor desempenho 24-48 horas após o início do quadro e a IL-6 e o TNF- α apresentam suas melhores performances diagnóstico no momento da suspeita clínica, avaliamos também a combinação dos marcadores nessas

situações. Observa-se um aumento de todos os valores estudados e a associação do leucograma e da PCR2 apresentou o melhor desempenho, com acurácia de 97,5% e valor preditivo e sensibilidade de 100% (Tabela 24).

Tabela 24- Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia da associação de marcadores em outros momentos

	Sens	Esp	VPP	VPN	Acur
Leuc x PCR2	100	94,1	95,8	100	97,5
PCR2 x IL1	93,5	90,5	93,5	90,5	92,3
PCR2 x TNF2	95,8	94,1	95,8	94,1	95,1

Os valores à frente do marcador representam o momento de coleta
Valores em porcentagem

Uma vez que a população de crianças foi de prematuros e de recém-nascidos de termo, compararam-se os valores de medianas dos três marcadores séricos nas três aferições para verificar se havia diferença entre ambos na produção das citocinas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de PCR, IL-6 e TNF- α em nenhum momento da dosagem (Tabela 25).

Tabela 25- Comparação entre a mediana dos marcadores entre grupos de recém-nascidos de termo e pré-termo

	Termo (17)	Pré-termo (65)	p*
PCR1	4,9	2,3	0,2754
PCR2	7,5	3,3	0,5024
PCR3	3,6	1,9	0,7241
IL1	59,8	32,0	0,6966
IL2	13,4	12,6	0,85983
IL3	5,5	6,3	0,2747
TNF1	8,4	13,0	0,2493
TNF2	7,3	11,8	0,1410
TNF3	8,4	9,3	0,3394

Valores de PCR em mg/dl e de IL-6 e de TNF- α em pg/ml, expressos como mediana

Os valores à frente do marcador representam o momento de coleta

* Teste de Wilcoxon

Os grupos de recém-nascidos com sepse comprovada e infecção provável apresentaram um comportamento bastante semelhante tanto nas características da população como no comportamento dos marcadores laboratoriais. Assim, eles foram reunidos em um grupo único e comparados com o grupo não infectado. Os resultados da avaliação conjunta estão colocados no “Apêndice III”.

5- DISCUSSÃO

A sepse neonatal constitui-se ainda um grande desafio diagnóstico em virtude das particularidades da faixa etária e do alto índice de morbi-letalidade associada à doença. Há a necessidade de se estabelecer o diagnóstico o mais preciso possível, de modo a se iniciar o tratamento rapidamente e ao mesmo tempo, é necessário evitar que as crianças não infectadas recebam tratamento desnecessário e sejam expostos aos efeitos indesejáveis dos antimicrobianos. (KLEIN e MARCY, 1991; SILVA et al., 1995; STOLL et al., 1998; GERDES, 2004; JACKSON et al.2004).

A doença ainda é bastante prevalente mundialmente e os recém-nascidos prematuros, os de baixo peso e de muito baixo peso ao nascer são os principais acometidos. Uma vez que esse grupo de crianças representa uma parcela significativa dos recém-nascidos atendidos nas unidades de cuidados neonatais, esforços no sentido de aprimorar o diagnóstico e tratamento dos quadros infecciosos terão grande impacto em sua sobrevivência e na prevenção de seqüelas importantes associadas à prematuridade e ao baixo peso (GAYNES et al., 1996; KARLOWCIZ et al., 2000; ADAMS-CHAPMAN e STOLL, 2002; VERGNANO et al., 2002; STOLL e HANSEN, 2003; PESSOA-SILVA, 2004).

Optou-se por estudar a sepse tardia pelo fato de as alterações gestacionais e perinatais já estarem praticamente ausentes a partir de 72 horas de vida, não servindo assim como fatores de confundimento na avaliação dos quatro marcadores estudados. É bem estabelecido que tanto o leucograma como os três marcadores humorais têm seus valores de normalidade bastante diferente nos primeiros três dias de vida, decorrentes da própria adaptação ao final da gestação, à parturição e à adaptação neonatal imediata (MANROE et al., 1979; LLOYD e OTO, 1982; MOUZINHO et al., 1994; SILVA et al., 1995; JAYES e WAITES, 1997; CHIESA et al., 2001).

O trabalho obteve uma amostra significativa de recém-nascidos comumente internados em unidades de terapia intensiva neonatal. Em 2002, no CAISM –UNICAMP, a taxa de recém-nascidos de baixo peso ao nascer foi 16,6/1000 nascidos-vivos e a de muito baixo peso foi de 4,0/1000 nascidos-vivos. Os três grupos foram bastante comparáveis entre si quanto às características gerais.

Como o trabalho não obteve todos os casos de sepse ocorrida no serviço, ele não serve como estimativa da prevalência da doença. Algumas crianças não foram incluídas devido à não obtenção da coleta seriada ou à falta de autorização para a coleta e limitou-se a incluir apenas os recém-nascidos com idade máxima de quatro semanas, pois tradicionalmente esse é o limite definido para “recém-nascidos”.

A sintomatologia da sepse neonatal é bastante variável e inespecífica, como foi observado pela predominância dos sinais e sintomas gerais, o que pode ser confundido com outras doenças do período neonatal e mesmo da evolução por vezes instável do RN de muito baixo peso (NG et al., 1997; STOLL et al., 2003; GERDES, 2004; PUOPOLO, 2005). A dificuldade de distinção entre essas situações clínicas explica em parte a frequência de avaliações de sepse. No estudo de STOLL et al. (2002), 62% das crianças tiveram pelo menos uma coleta de hemocultura por suspeita de sepse tardia. A hipoatividade foi o principal sinal clínico encontrado, porém, este sintoma é bastante difícil até de ser definido, pois depende de uma observação contínua e ainda sofre efeito direto de drogas depressoras do sistema nervoso central, comumente usadas nas unidades de terapias intensivas.

No trabalho de GONZALEZ et al. (2003) os modos de apresentação foram semelhantes, com dessaturação (50%), resíduos gástricos (33%), apnéia (33%), bradicardia (22%), necessidade de suporte ventilatório (17%) e taquipnéia (10%) os mais frequentes sinais e sintomas, e com exceção dos episódios de apnéia/bradicardia, os critérios clínicos foram incapazes de distinguir os recém-nascidos infectados dos não sépticos. Em um estudo multicêntrico, extenso, FANAROFF et al. (1998) encontraram os seguintes quadros de apresentação da sepse em 395 recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer: piora dos episódios de apnéia (55%), intolerância alimentar, distensão abdominal ou teste de guáiaico positivo (43%), aumento da necessidade de suporte ventilatório e/ou aumento da necessidade de oxigênio (29%), letargia e hipotonia (23%). O valor preditivo positivo desses sinais na sepse comprovada por cultura foi baixo, variando de 14 a 20%.

As manifestações respiratórias e hemodinâmicas também foram de ocorrência frequente no estudo, embora elas também não sejam específicas de sepse. Outras situações clínicas comuns no período neonatal foram encontradas no trabalho e mimetizaram a

sintomatologia que ocorre em vigência de um quadro infeccioso. Entre elas se destacaram hemorragia grave do sistema nervoso central, displasia broncopulmonar, estado pós-operatório, insuficiência cardíaca e, anemia grave, como também descrito por NG et al. 2003.

Nos casos de sepse comprovada por cultura, houve predomínio dos quadros de infecção primária da corrente sangüínea, e mesmo nos episódios sépticos com localização, a hemocultura também foi positiva na grande maioria dos casos. No Serviço de Neonatologia do CAISM-UNICAMP, nos anos de 2001 e 2002, a densidade de incidência de infecção da corrente sangüínea foi de 5,08 e 4,29/1000 pacientes-dia, respectivamente (Dados do Centro de Controle de Infecção Hospitalar do CAISM-UNICAMP - relatório 2002), o que está de acordo com densidades encontradas em outros serviços que usam o mesmo instrumento de medição (metodologia NISS). PESSOA-SILVA et al. (2004), em estudo multicêntrico brasileiro, relataram uma taxa de infecção nosocomial da corrente sangüínea de 7,6/1000 pacientes-dia e STOVER et al. (2001) de 8,9/1000 pacientes-dia (variação de 4,6 a 18,1 nos 19 centros de estudos americanos).

De um modo geral, a infecção da corrente sangüínea tem sido relatada como a forma mais comum de sepse nosocomial entre recém-nascidos, seguido por pneumonia e infecções do grupo olhos-nariz-ouvido-garganta (representado principalmente por conjuntivite e candidíase mucosa). A enterocolite necrosante costuma acometer prematuros de muito baixo peso (GAYNES et al. 1996; KARLOWICZ et al, 2000; ADAMS-CHAPMAN e STOLL, 2000; LEMMONS et al, 2001; STOVER et al, 2001; BALTIMORE, 2003; PESSOA-SILVA, 2004).

No grupo de infecção provável, como por definição as culturas foram negativas, a localização dos quadros infecciosos ajudou na identificação dos doentes. As taxas de recuperação sangüínea em culturas nos casos de pneumonia não são elevadas. Deste modo, o diagnostico é feito por critérios clínicos de insuficiência respiratória aguda ou crônica reagudizada, sintomas gerais de infecção e imagem radiológica compatível em radiografias seriadas (HORAN e GAYNES, 2004).

Nos casos de enterocolite necrosante, além do quadro abdominal e sistêmico definidos, havia alterações radiológicas compatíveis. No único caso de adenite submandibular, a presença da nodulação inflamatória e saída de pus na cavidade oral, tornou o diagnóstico exequível. No caso de meningite com cultura líquórica e sangüínea negativas, o quadro sistêmico, a alteração citológica do líquido cefalorraquidiano e a evolução para choque e óbito também deixaram em evidência a natureza infecciosa da doença. Apenas quatro casos foram definidos como sendo de infecção da corrente sangüínea, baseados nas manifestações sistêmicas, apesar das culturas negativas.

O CDC americano também incluiu o termo “sepse clinica” em suas definições em 1986, como aquela em que estão presentes pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas, sem outra causa reconhecida: febre, hipotermia, apnéia ou bradicardia. Acrescenta-se a isso o fato de não haver crescimento de microrganismos em hemocultura e não haver outro sítio aparente de infecção (GARNER et al., 1988; HORAN e GAYNES, 2004). GAYNES et al. (1996) encontraram uma taxa de infecção primária da corrente sangüínea associada à sepse clinica de 13 a 21%, inversamente relacionada ao peso ao nascer. PESSOA-SILVA et al. referiram uma taxa mais elevada, de cerca de 50%. No CAISM-UNICAMP, no ano de 2002, a incidência de infecção da corrente sangüínea foi de 12% e, destes casos, 32% foram de sepse clinica (Dados do Centro de Controle de Infecção Hospitalar do CAISM-UNICAMP - relatório 2002).

Alguns trabalhos de avaliação diagnóstica têm incluído recém-nascidos com sepse clinica em suas casuística. Nestes estudos, a sintomatologia é mais extensa que os definidos pelo CDC, e definida pela presença de sintomatologia compatível com quadro séptico e culturas negativas, podendo incluir casos de pneumonia (PANERO et al, 1997; SILVEIRA e PROCIANOY, 1997; DOLLNER et al., 2001; VIEIRA, 2001). Tal conceito se aproxima com o que definimos por “infecção provável”. Tal categoria de sujeitos é importante, pois, por um lado, tais pacientes de fato existem na prática clínica e é necessário saber o comportamento dos testes nesse tipo de recém-nascidos, uma vez que as culturas serão negativas e o diagnóstico terá de ser feito pela avaliação clínica e exames indiretos. Por outro lado, não há como saber qual a porcentagem dessas crianças realmente estavam infectadas “verdadeiramente” e isso, de certo modo, pode interferir na avaliação

mais precisa da acurácia do teste, bem como ter impacto epidemiológico importante (HUGONNET et al., 2004).

Os agentes isolados nas culturas foram aqueles mais comumente encontrados na sepse neonatal tardia. Houve predomínio dos cocos gram-positivos, especialmente *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, compatíveis com a população de recém-nascidos internados e com acesso venoso prolongado (GAYNES et al. 1996; ADAMS-CHAPMAN e STOLL, 2000; PESSOA-SILVA, 2004). Em estudo multicêntrico extenso, avaliando 6215 recém-nascidos, STOLL e HANSEN (2002), avaliaram 1313 episódios de sepse tardia e relataram que os cocos gram-positivos foram responsáveis por 70,2% dos casos de sepse tardia neonatal, e estafilococos coagulase-negativos foram os agentes em isolados em 47,9% do total de casos. FANAROFF et al. (1998) relataram que em sua casuística de 395 episódios de sepse tardia, os cocos gram-positivos foram responsáveis por 53% dos quadros.

Os sete casos de infecção por bactérias gram-negativas foram associados à infecção do trato urinário em quatro ocasiões e em três o quadro foi de infecção de corrente sanguínea. Um fato surpreendente é que houve apenas um caso de infecção fúngica sistêmica, apesar da população ser composta basicamente por recém-nascidos prematuros e com fatores de risco para aquisição de doença fúngica sistêmica como muito baixo peso ao nascer, uso prolongado de cateter venoso central e utilização de nutrição parenteral (KAUFMAN & FAIRCHILD, 2004). O fato não se constitui apenas um mero acaso da pesquisa em si, mas a realidade do Serviço onde se constataram apenas 20 casos de micose sistêmica em 10 anos (Dados do Centro de Controle de Infecção Hospitalar do CAISM-UNICAMP).

As hemoculturas levaram, na maioria das vezes, cerca de 48 horas para evidenciar o agente, embora em algumas situações a identificação fosse incompleta nesse período, com definição apenas do tipo de estrutura (coco, bacilo, levedura) e coloração pelo método de Gram. Comumente, até 72 horas após a coleta, já estavam disponíveis a informação do agente microbiano e padrão de sensibilidade do antibiograma. Isso vem de encontro ao relatado na literatura médica. GONZALEZ et al. (2003) em estudo de sepse tardia relataram um índice de positividade de 88% em até 48 horas após a coleta.

SCHELONKA e MOSER (2003) em estudo sobre sepse neonatal por *Candida sp* demonstraram um tempo de positividade de 37 ± 14 horas e 97% dos recém-nascidos doentes foram detectados por volta de 72 horas após a coleta da cultura.

O trabalho demonstrou que o leucograma possui uma acurácia diagnóstica apenas regular, com um índice melhor em relação ao valor preditivo positivo. Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados na literatura variam amplamente, uma vez que cada trabalho avalia variáveis não comparáveis de contagem neutrofílica total e suas subdivisões, com uma heterogeneidade importante entre os vários estudos e os índices de sensibilidade apontados variam entre 17% e 100% e a especificidade entre 31% e 100% nos casos de sepse precoce (RODWELL et al., 1988; RODWELL et al., 1993; GUILLOIS et al., 1994; BERGER et al., 1995; SILVA et al., 1995; FANAROFF et al., 1998; PHILIP e MILLS, 2000).

O trabalho de BENUCK e DAVID (1983) usou os mesmos critérios usados por nós para definição de leucograma alterado: dois parâmetros hematológicos anormais e valores leucocitários de acordo com MANROE et al. (1979). Tal definição identificou 21/30 recém-nascidos sépticos com quadro precoce e três em quatro crianças com quadro tardio.

Em trabalhos com sepse tardia comprovada por cultura, BERGER et al., (1995) mostraram que a contagem leucocitária total, a relação de neutrófilos imaturos/total e o número de neutrófilos totais aumentados, foram pouco específicos (56%, 66%, 65%, respectivamente), com valores preditivos positivos muito baixos (13%, 14% e 18%, respectivamente), porém com valores preditivos negativos altos (96%, 96% e 98%, respectivamente). O desempenho da proteína C-reativa, analisada conjuntamente foi muito superior (sensibilidade de 88%, especificidade de 87%, valor preditivo positivo de 37% e valor preditivo negativo de 99%).

GONZALEZ et al. (2003) em estudo de 48 episódios de sepse neonatal tardia, também encontraram valores baixos de sensibilidade para os parâmetros neutrofílicos, a saber: neutrófilos totais alterados ($< 7500/\text{ml}$ ou $> 15000/\text{ml}$) 63%, imaturos totais aumentados ($> 1500/\text{ml}$) 44% e relação de neutrófilos imaturos/totais aumentada ($> 0,16$) 38%.

VIEIRA (2001), em trabalho com grupo de recém-nascidos com sepse comprovada e clínica e quadros precoces e tardios, também demonstrou que o desempenho diagnóstico da contagem leucocitária total, índice neutrofílico e plaquetometria, avaliados em vários limites, eram inferiores ao da PCR.

RODWELL et al., (1988) para melhorar o desempenho diagnóstico do hemograma, propôs a utilização de escores hematológicos para a detecção de sepse neonatal. Os parâmetros usados foram sete e a cada um se atribuiu o valor de um ponto. São eles: índice neutrofílico aumentado (de acordo com MANROE et al., 1979); neutrofilia ou neutropenia (MANROE et al., 1979); relação neutrófilos imaturos/neutrófilos maduros $\geq 0,3$; número absoluto de neutrófilos imaturos (MANROE et al., 1979); leucometria total $\leq 5000/\text{ml}$ ou $\geq 25000 - 30000$ e $21000/\text{ml}$ ao nascer, 12-24 horas e segundo dia de vida em diante, respectivamente); alterações degenerativas em neutrófilos e contagem plaquetária $\leq 150000/\text{ml}$. Quanto maior o número de alterações, maior a possibilidade de infecção. Uma pontuação ≥ 3 apresentou uma sensibilidade de 96% e especificidade de 78% e valor preditivo negativo de 99%.

ALBERTONI (2004) avaliou 25 episódios de sepse comprovada por cultura (sendo 23 deles de aparecimento tardio) e usando os critérios de RODWELL et al. (1988), considerou o hemograma alterado quando o escore era maior ou igual a três e assim encontrou uma sensibilidade do exame em 72%. Índices isolados como neutropenia esteve presente em apenas 8% dos casos, neutrofilia em 56% e índice neutrofílico aumentado em 68%. Nos casos de sepse precoce por ela avaliada, em casos de infecção comprovada e clínica, o índice esteve alterado em apenas 17% das ocasiões.

Os padrões de alteração do leucograma foram bastante semelhantes entre os dois grupos sépticos, servindo de indicativo de que muito provavelmente as crianças do grupo com infecção provável realmente estavam infectadas, apesar das culturas negativas.

Em síntese, a contagem leucocitária total, o número total de neutrófilos e a relação de neutrófilos imaturos/total estão longe de serem os testes complementares perfeitos no diagnóstico de sepse neonatal. No entanto, os valores preditivos negativos elevados destes testes podem ajudar a afastar um quadro suspeito (BERGER et al., 1995; GERDES, 2004).

Em relação à proteína C-reativa, o estudo demonstrou níveis elevados do marcador já na primeira avaliação, e que se manteve nos dois outros momentos de aferição. Não há uma explicação para esse fenômeno de ascensão precoce, uma vez que não parece ter havido retardo no diagnóstico dessas crianças e a IL-6 também se apresentava no pico de nível sérico, o que sugeriu se tratar de quadro séptico inicial (explicação adiante no texto).

ALBERTONI (2004) no seu trabalho de 25 casos de sepse (23 tardios) demonstrou que a PCR também já estava alterada na primeira avaliação em 22 dos episódios (sensibilidade de 88%) e os três casos com exame normal (abaixo de 1,0 mg/dl) se alteraram 24-36 horas após.

EHL et al (1999) encontraram três padrões do marcador em coletas seriadas. No primeiro, ocorre o padrão “habitual”, com valor normal na primeira medida e ascensão em 24 a 48 horas e queda dos valores nos dias seguintes. No segundo padrão, a medida inicial foi a mais alta vista nas aferições. No terceiro padrão, a primeira medida também já foi elevada, aumentou mais ainda e caiu posteriormente. Atribuem esse fato a um processo infeccioso mais avançado. Além disso, apontam que existe uma variabilidade individual no espaço de tempo entre o estímulo infeccioso e a síntese de PCR, bem como na taxa de síntese e de depuração plasmática da proteína.

Como resultado desses valores séricos elevados, o estudo obteve valores significativamente altos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo em todos os momentos da aferição. A PCR apresentou o melhor índice de valor preditivo negativo dos quatro exames testados, especialmente na sua segunda aferição (84%), mostrando que a dosagem sérica seriada da proteína continuamente normal pode indicar com segurança razoável que a criança não esteja séptica.

Na literatura, os valores dos índices diagnósticos variam amplamente também, oscilando a sensibilidade entre 39 e 97,5%, a especificidade entre 47 e 100%, o valor preditivo positivo entre 6,7 e 100% e o valor preditivo negativo entre 80 e 99%. Tais variações podem ser explicadas pelo momento da coleta (única ou seriada), pelo método de dosagem da substância (métodos ultra-sensíveis são os utilizados

atualmente), pela determinação variável dos limites de corte, pela própria definição de sepse (nem sempre comprovada por cultura) e pelos pacientes estudados - sepse tardia ou precoce (BERGER 1995; SILVA et al., 1995; EHL 1997; BENITZ et al., 1998; CHIESA et al., 2003, FRANZ et al., 2004). Estudos com amostras seriadas demonstraram índices significativamente maiores entre as medidas iniciais e as posteriores (MATHERS e POHLANDT, 1987; BENITZ et al., 1998; LABORADA et al., 2003).

Considerando apenas quadros de sepse tardia, com 184 episódios e 54 comprovados por cultura, BENITZ et al. (1998) encontraram os seguintes índices no momento da suspeita clínica e 24 horas depois: sensibilidade de 61,5% e 84,4%, especificidade de 68,9% e 74,6%, valor preditivo positivo de 43,8% e 47,4% e valor preditivo negativo de 82,0% e 94,6%. BERGER et al (1995) encontraram valores de sensibilidade de 88% e 97% após 12 a 24 horas, especificidade de 87%, valor preditivo positivo de 37% e valor preditivo negativo de 99%. VIEIRA (2001) encontrou, com um limite de corte de 0,6 mg/dl, taxas de sensibilidade de 70%, especificidade de 91,3%, valor preditivo positivo de 77,8% e valor preditivo negativo de 87,5%.

O valor de corte utilizado no estudo foi mais alto que o habitualmente utilizado na prática clínica diária (1,0 mg/dl), porém o método de dosagem não é o mesmo (usualmente a dosagem no Laboratório local é feita por nefelometria). De qualquer modo, considerando como esse o limite de corte, o marcador ainda mantém uma acurácia diagnóstica importante: sensibilidade de 92,9%; 92,9% e 85,7%, e especificidade de 70,8%, 83,3% e 83,3%, para os três momentos de dosagem, respectivamente.

Quatro crianças com quadro séptico comprovado por cultura apresentaram níveis séricos baixos de PCR nas três ocasiões de dosagem. Todas apresentaram infecção da corrente sanguínea, sendo três por estafilococos coagulase-negativo (duas por *S. epidermidis* e uma por *S.warneri*) e um recém-nascido com sepse por *S.aureus*. Todos eram prematuros (26–31 semanas) e de muito baixo peso ao nascer (peso ao nascer entre 835 a 1280 g). Nenhum deles morreu e aquele com sepse por *S.aureus* apresentou choque. Todas as quatro crianças apresentavam hemograma alterado.

Como explicação para a primeira medida da PCR, admite-se que isto pode vir a ocorrer devido ao intervalo de tempo mínimo para haver acúmulo progressivo da proteína no soro para níveis detectáveis, o que pode levar cerca de 12 a 48 horas após o estímulo

inicial (BUCK e POHLANDT, 1995; BENITZ et al., 1998; CHIESA, et al., 2001;). Para a não ascensão posterior não há explicação convincente, uma vez que prematuridade e a desnutrição intra-uterina desses recém-nascidos não justificam o fato (KAWAMURA e NISHIDA, 1995; EHL et al., 1997).

Uma hipótese atribuída seria devido às próprias características microbiológicas dos estafilococos coagulase-negativos, tais como a produção de biofilmes, adesinas de superfície e outras exoproteínas, os quais estariam associados a uma patogenicidade lenta e produziriam uma resposta de fase aguda menos intensa durante a infecção (BENITZ et al., 1998; RONNESTAD, 1999; LABORADA et al., 2003). PORCYROUS et al. (1993) em 187 casos de sepse com hemocultura positiva e coleta seriada de PCR, observaram que a proteína estava alterada de modo não homogêneo de acordo com o microrganismo isolado. Bacilos gram-negativos e estreptococo do grupo B estavam associados com PCR aumentada em 92%, *S. aureus* em 89%, estreptococo do grupo D em 71%, *S. viridans* em 60 e *S. epidermidis* em apenas 55% dos casos.

Outros dois motivos apontados para explicar esse fato é que infecções localizadas como as do trato urinário poderiam induzir pouca resposta sistêmica e pacientes gravemente granulocitopênicos poderiam exibir pouco ou nenhum aumento nos níveis séricos da PCR durante episódios sépticos, mesmo nos casos mais graves (BENITZ, et al. 1998). Alguns trabalhos mais recentes têm alertado quanto à possibilidade de alguns indivíduos apresentarem polimorfismo gênico para a PCR, de modo que estes indivíduos produzam menos quantidade da substância e sejam mais susceptíveis a quadros infecciosos (ROY et al., 2002; SZALAI e MCCRORY, 2002). Isso, porém, não foi testado em recém-nascidos.

O grupo de infecção provável mostrou níveis de PCR muito semelhante ao apresentado pelo grupo de sepse comprovada por cultura, sendo encontrado níveis elevados do marcador já na primeira avaliação e ascensão e queda posteriormente. Isso mostra que tais casos, muito provavelmente, eram de sepse “verdadeira”. Alguns trabalhos também mostraram fatos semelhantes e, por vezes, incluíam essas crianças no grupo daquelas com sepse comprovada (BERGER et al., 1995, EHL et al., 1997; BENITZ et al., 1998).

No tocante aos valores de IL-6, eles se encontraram elevados em todos os momentos de coleta, em ambos os grupos de recém-nascidos sépticos, com diferença estatisticamente significativa em relação às medianas do grupo não infectado. Observou-se ainda queda importante nos níveis séricos nas duas medidas subseqüentes. BONT et al. (1993) estimaram o retorno dos níveis séricos à normalidade em torno de 30 horas. NG et al. (2003) observaram queda de 83% nos níveis da citocina 48 horas após o início do tratamento e BUCK et al. (1994) demonstraram que 75% dos recém-nascidos sépticos tinham níveis indelectáveis da citocina 24 horas após a primeira medida.

Esse padrão também foi observado em outros trabalhos com medição seriada da citocina em quadros sépticos neonatais. Caracteristicamente, uma vez que a citocina está presente em níveis elevados no momento da suspeita clínica e rapidamente tem seus níveis decaindo para a normalidade, ela é considerada um marcador sérico precoce da sepse (BUCK et al., 1994; HARRIS et al., 1994; PANERO et al., 1997; GRACÍA et al., 2003; NG et al., 1997; KÄLLMAN et al., 1999; ROMAGNOLI et al., 2001 GRACÍA et al., 2003; NG et al., 2003). KÜSTER et al. (1998) demonstraram na verdade, níveis elevados da citocina 24-48 horas antes do aparecimento dos sintomas nos casos de sepse tardia e BHARTIYA et al. (2000) mostraram também esse fenômeno em sangue de cordão em recém-nascidos assintomáticos aos nascer e que posteriormente desenvolveram sepse.

A explicação fisiopatológica para a ocorrência é a de que a citocina é principal indutora da reação pró-inflamatória que se segue ao estímulo inicial da sepse e seus níveis caem rapidamente, à medida que outros mediadores, como IL-4 e IL-10 vão se tornando ativos, iniciando-se mecanismos de contra-regulação (BHARTIYA et al., 2000; NG et al., 2003).

Em vista desse comportamento, a sua acurácia diagnóstica cai com o tempo, e é mais elevada no primeiro momento, no momento da suspeita clínica. No trabalho em questão, os índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo da IL-6 foram bastante comparáveis àqueles apresentados pela PCR em sua primeira aferição. Esta última superou a IL-6 em termos de acurácia nas medidas posteriores como foi observado também por NG et al. (1997).

Na literatura médica os índices de sensibilidade e especificidade também variam uma vez que os métodos de dosagem e os limites de corte não são os mesmos utilizados no estudo em questão e não há uma definição uniforme de sepse. Em estudos de sepse tardia, a sensibilidade variou de 67 a 100% (GROLL, et al., 1992; NG et al., 1997; PANERO et al., 1997; KUSTER et al., 1998).

NG et al (1997), em estudo avaliando 101 episódios de sepse tardia em 68 recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer, demonstraram que a IL-6 tem uma acurácia diagnóstica alta no momento da suspeita clínica, com sensibilidade de 89%, especificidade de 96%, valor preditivo positivo de 95% e valor preditivo negativo de 91%. Tais índices foram semelhantes ao do TNF- α (82,86%, 82% e 85%, respectivamente) e maiores que os da PCR (sensibilidade de 60% e valor preditivo negativo de 75%). Depois de 24-48 horas, a sensibilidade da IL-6 caiu para 67%, a do TNF- α se manteve (82%) e a da PCR aumentou para 82%.

SILVEIRA e PROCIANOY (1999), em uma população de recém-nascidos de até cinco dias de vida, demonstraram uma sensibilidade de 90%, especificidade de 43%, valor preditivo positivo de 67,4% e valor preditivo negativo de 78,6%. GRACÍA et al. (2003), em um estudo sobre sepse neonatal precoce, demonstraram sensibilidade de 91,6%, especificidade de 77,2% valor preditivo positivo de 64,7% e valor preditivo negativo de 94,1%.

VIEIRA (2001) em um estudo avaliando uma população de recém-nascidos com sepse tardia e precoce, tanto clínica como comprovada por cultura, encontrou, para um limite de corte de 30 pg/ml, valores elevados de sensibilidade e valor preditivo negativo de 100%, especificidade de 93,5% e valor preditivo positivo de 82,4%.

A definição dos valores normais da citocina ainda é controversa. Dois trabalhos com recém-nascidos saudáveis procuraram determinar os níveis normais da substância nas primeiras 48 horas de vida.

ULRICH et al. (2001) avaliaram amostras de sangue de cordão de 25 recém-nascidos de termo saudáveis, não asfíxiados, sem risco infeccioso aparente e com evolução pós-natal sem intercorrências, e encontraram um valor de $7,52 \pm 5,17$ pg/ml para a

citocina, e consideraram valores acima do segundo desvio-padrão de 17,86pg/ml como suspeito de sepse. CHIESA et al. (2003) avaliou 113 recém-nascidos de termo e 35 crianças próximas ao termo (35-36 semanas de gestação), com amostras de sangue de cordão, 24 e 48 horas de vida. Para os recém-nascidos de termo os valores de IL-6 apresentaram média geométrica de 1,69, 4,09 e 3,45 ng/l, para esses tempos de coleta. Para as crianças próximas ao termo, o percentil 95 foi de 24,8, 40,9 e 27,0 ng/l nos mesmos tempos de coleta.

Nos trabalhos envolvendo recém-nascidos com sepse tardia, GROLL et al. (1992) em 10 pacientes com sepse tardia (comprovada + sepse clínica) encontraram valor de corte de 20 pg/ml. PANERO et al. (1997), em avaliação de 17 pacientes com sepse comprovada por cultura encontraram um limite de corte de 15 pg/ml. KÜSTER (1998), em 28 crianças com sepse comprovada, determinaram um valor de 25,7 pg/ml como o limite de corte.

Os métodos de dosagem nos três trabalhos acima descritos com sepse tardia são diferentes do estudo em questão, e isso poderia justificar a diferença encontrada entre eles nos valores.

As crianças com infecção provável apresentaram um desempenho semelhante nos níveis séricos da citocina, também demonstrando que provavelmente estavam infectados. Outros estudos sobre o marcador têm associado os casos de sepse “verdadeira” com infecção provável e têm encontrado resultados semelhantes (BUCK et al., 1994; KALMAN et al., 1999; SILVEIRA e PROCIANOY, 1999; ROMAGNOLI et al., 2001).

Doze recém-nascidos apresentaram níveis séricos de IL-6 abaixo da linha de corte na primeira avaliação, quando o poder discriminatório é maior. Todos eram prematuros (entre 28 e 32 semanas de idade gestacional) exceto uma criança (38 semanas). Nove recém-nascidos eram de muito baixo peso ao nascer. Sete deles apresentaram sepse sangüínea por estafilococos coagulase-negativos (seis causadas por *S. epidermidis* e uma por *S. simulans*), dois casos de sepse por duplo agente (*S.aureus* e *S.hominis*; *S.aureus* e *P. aeruginosa*) e dois casos de sepse por gram-negativo (uma por *E.coli* e uma por *P. aglomerans*). Houve apenas um caso de choque (sepse por *S.aureus*) e nenhum óbito.

Uma hipótese para explicar isso seria a relação temporal entre o início dos sintomas e a coleta, já que a meia-vida da citocina é curta (BONT et al., 1993; NG et al., 2003). Isso, porém, não parece ser o caso uma vez que a primeira amostra foi colhida no momento da suspeita clínica.

GROLL et al. (1992) citam dois casos (gêmeos) em seu trabalho que não apresentaram nenhuma resposta de IL-6, com PCR alterada e hemocultura positiva para *S. epidermidis*. HARDING et al (2003) aventam a hipótese de que recém-nascidos prematuros com uma variação funcional do gene da IL-6 (IL-6 – 174GG) estão associados a um risco duas vezes maior de desenvolver sepse uma vez que o aumento da produção de IL-6 em resposta à sepse parece estar relacionado fortemente ao alelo C.

Em suma, evidencia-se que a principal utilidade da citocina é no momento do início dos sintomas (marcador precoce) e medidas posteriores não teriam valor diagnóstico e na verdade poderiam ser dispensáveis pois poderiam ser confundidoras (PANERO et al., 1997; KÄLLMAN et al., 1999; SILVEIRA e PROCIANOY, 1999).

Em relação ao TNF- α , seus níveis séricos nos pacientes não infectados permaneceram baixos e estáveis durante as três coletas. No grupo com sepse comprovada, as medianas do marcador apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo não infectado. Os níveis séricos das medianas foram decrescentes ao longo do tempo, o que é concordante com o perfil dinâmico da citocina, como explicado anteriormente e já demonstrado em outros estudos (ROMAN et al., 1993 SILVEIRA e PROCIANOY, 1999; NG et al., 2003).

Houve queda nos parâmetros de sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo ao longo do tempo, com acurácia praticamente mantida. Tais índices diagnósticos foram inferiores ao da PCR e da IL-6 e melhores que o do leucograma. GIRARDINI et al. (1990) e ROMAN et al. (1993) encontraram valores mais elevados de sensibilidade e especificidade (88 e 91,3% e 98 e 100%). Porém, a população estudada foi bem menor que o estudo em questão e com proporção maior de crianças com evolução desfavorável para choque e óbito. NG et al. (1997), em um estudo de sepse tardia em 68 recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer demonstraram valores elevados de

sensibilidade (82%), especificidade (86%), valor preditivo positivo (82%) e valor preditivo negativo (85%), mantendo-se um índice de sensibilidade elevado mesmo depois de 24-48 horas da primeira amostragem (82%).

HARRIS et al. (1994) não observaram diferença nos níveis séricos da substância em recém-nascidos com sepse comprovada, naqueles com enterocolite necrosante e nos controles.

Além das diferenças metodológicas existentes entres os vários trabalhos, especialmente o método de dosagem, o número de pacientes estudados e a definição de sepse, é possível explicar as grandes diferenças na avaliação do marcador devido à relação temporal entre o início do quadro séptico, a ascensão da citocina e o aparecimento dos sintomas. Como o TNF- α eleva-se precocemente na infecção, porém de modo transitório e rápido, o intervalo entre o início dos sintomas e a coleta da primeira amostra é variável, de modo que poderia haver falha em demonstrar níveis mais elevados do marcador (HARRIS et al., 1994; KINASEWITZ et al., 2004).

A definição dos valores de normalidade do teste também é controversa devido a diferenças metodológicas entre os trabalhos. ÜLRICH et al. (2001) encontraram uma média de $13,01 \pm 9,57$ pg/ml e sugeriram que um valor superior a 32,14 pg/ml deveria ser considerado como suspeitos de sepse.

Em trabalhos com sepse tardia, GIRARDINI et al. (1990), em trabalho com nove recém-nascidos com sepse comprovada, encontraram um valor de corte de 15 pg/ml. SILVEIRA & PROCIANOY (1999) encontraram um limite de corte de 12 pg/ml, obtido pela análise da curva ROC e proveniente de um estudo de 66 recém-nascidos, sendo 13 com infecção comprovada por cultura, e com idade até cinco dias à suspeita do quadro de sepse.

Resumidamente, o marcador mostrou-se superior ao leucograma, comparável a IL-6 no primeiro momento e superior nas outras aferições, e inferior a PCR. No entanto, no grupo de infecção provável, o marcador não demonstrou ter um bom poder discriminatório em relação às crianças não infectadas.

Embora o número de crianças seja pequeno para se avaliar, o choque e o óbito foram mais frequentes nos casos de sepse por gram-negativos. STOLL e HANSEN (2003) em estudo com 1313 episódios de sepse tardia, também demonstraram que, apesar de os cocos gram-positivos serem responsáveis por 70,2% dos casos de sepse, a taxa de óbito relacionado a esses agentes foi de 11,2%. Por outro lado, os quadros determinados por bactérias gram-negativas e fungos, apresentaram-se de forma fulminante e foram responsáveis por 36,2% e 31,8% dos óbitos, respectivamente. KARLOWICZ et al. (2000) avaliaram que em casos fulminantes de sepse tardia, os bacilos gram-negativos foram os agentes preponderantes, respondendo por 69% dos casos, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*.

Uma vez que os quadros sépticos podem estar associados à evolução desfavorável como choque, disfunção orgânica múltipla, coagulação intravascular disseminada e óbito, o estudo avaliou os três marcadores séricos em relação ao choque e óbito.

Não se observou nenhuma anormalidade nas medianas dos marcadores quando a evolução foi complicada apenas por choque, sem evolução para óbito. Porém, quando a evolução foi complicada por óbito relacionado à sepse, a interleucina-6 mostrou níveis bem elevados já na primeira avaliação, não ocorrendo com os dois outros marcadores. Na terceira medida, os três exames se mostraram bastante alterados, demonstrando que a manutenção de níveis elevados dos testes seria uma indicação de evolução para óbito.

Alguns trabalhos também procuraram correlacionar os níveis desses marcadores com a evolução desfavorável. GIRARDINI et al. (1990) e ROMAN et al. (1993) demonstraram níveis elevados de TNF- α naqueles sujeitos com evolução para choque e óbito. HARRIS et al. (1994) não encontraram essa alteração para o TNF- α e evidenciando concentrações elevadas de IL-6 na primeira e terceira medidas nos não sobreviventes. ROMAGNOLI et al. (2001) não evidenciaram alteração nas concentrações de IL-6 nos sujeitos que não sobreviveram, porém com valores elevados de PCR nos recém-nascidos que evoluíram para óbito. KURTOGLU et al. (2003) não demonstraram diferenças nas concentrações de IL-6 e de TNF- α nos não-sobreviventes e nos sobreviventes.

Em adultos, níveis altos de IL-6 têm sido correlacionados como um indicativo de evolução desfavorável (OBERHOLZER, et al., 2005, ODA et al., 2005).

Na literatura, apesar das evidências das citocinas serem indicadores de má evolução, não há um limite de corte estabelecido no qual se consideraria como indicador prognóstico. Uma consideração que se faz é que o número de crianças com evolução complicada por choque e óbito é pequeno para poder se extrapolar de forma segura sobre o papel desses marcadores nesse sentido.

Com a finalidade de melhorar a precisão diagnóstica na suspeita de sepse estudou-se a associação dos exames, para verificar se haveria melhora da performance individual. Como a IL-6 e o TNF- α apresentaram seus melhores desempenhos na primeira aferição, a combinação de seus desempenhos com aquele da primeira medida da PCR, produziu um aumento significativo dos seus parâmetros, e a acurácia diagnóstica máxima foi alcançada pela associação de PCR e TNF- α (94,7%).

NG et al. (1997) mostraram que em casos de sepse tardia em prematuros de muito baixo peso ao nascer, a associação dos três marcadores também foi útil, e melhorando o desempenho individual. A combinação da PCR com IL-6 ou TNF- α no momento da suspeita clínica mostrou índices de sensibilidade e valor preditivo negativo altos, respectivamente, 93% e 95% para a primeira associação e 91% e 92% na segunda. A sensibilidade se mantém elevada 24-48 horas depois, sendo de 93% e 97%, respectivamente.

SILVEIRA e PROCIANOY (1999) encontraram um aumento na sensibilidade da IL-6 e TNF- α quando os dois exames foram analisados em associação, atingindo uma sensibilidade de 98,5% e valor preditivo negativo de 90%. GRACÍA et al. (2003), em estudo sobre sepse neonatal precoce, obtiveram índice de quase 100% de sensibilidade na combinação IL-6 e PCR ou IL-6 e TNF- α .

DØLLNER et al. (2001), em estudo de sepse na primeira semana de vida demonstrou que a PCR apresentava um desempenho diagnóstico melhor que a IL-6 e associação de PCR \geq 1,0 mg/dl e/ou IL-6 \geq 20 pg/ml identificou praticamente todos os

recém-nascidos verdadeiramente infectados (sensibilidade de 96%), e quando agrupou as crianças com sepse comprovada por cultura e aquelas com infecção provável, a sensibilidade foi de 85%.

SANTANA REYES et al. (2003) também encontraram que a PCR apresentou taxas de sensibilidade e especificidade melhores que a da IL-6 (80% - 92% contra 61% - 80%, respectivamente) e acurácia diagnóstica também melhorou com a associação. A especificidade das associações nos dois trabalhos foi considerada limitada (58-62%), mas os autores argumentam que a identificação dos recém-nascidos infectados deva ser a prioridade e assim tais resultados positivos de sensibilidade dariam um suporte laboratorial para indicar o início do tratamento.

No trabalho em discussão, observou-se ainda que a combinação dos dois primeiros desempenhos da PCR também melhorou a acurácia, à qual atingiu 91,5%. A associação dessa primeira aferição com a primeira medida da IL-6 e do TNF- α também foi significativa na melhora dos índices.

A combinação do desempenho da segunda medida da PCR com o leucograma, o qual constituiu um marcador apenas regular de sepse neonatal, melhorou sobremaneira a performance diagnóstica deste último, com a sensibilidade e o valor preditivo negativo atingindo 100% e a acurácia de 97,5%, o mais alto índice obtido no estudo. Como estes dois exames são os mais rotineiramente usados na prática clínica, esses achados tornam-se relevantes. Além disso, a medição da IL-6 e do TNF- α no momento da suspeita clínica, associada aos dois exames mais rotineiros, também seria de grande valia no diagnóstico da doença.

Novos estudos com uma casuística maior seriam necessários para a confirmação dos dados obtidos, mas já há evidências suficientes para que esses novos exames pudessem ser incorporados à prática clínica diária.

6- CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que:

- 1- O leucograma teve uma acurácia apenas regular.
- 2- A proteína C-reativa mostrou a acurácia diagnóstica elevada, a maior dos quatro exames, principalmente se avaliada na forma seriada.
- 3- A IL-6 e o TNF- α apresentaram uma boa performance diagnóstica, melhor que o leucograma e inferior ao exibido pela PCR.
- 4- A associação dos exames melhora significativamente o desempenho individual de cada exame.
- 5- A manutenção de níveis elevados dos três marcadores séricos poderia ser um indicador de evolução desfavorável (óbito)

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBENDER, E.; CABATU, E.E.; GUZMAN, D.M. Serum C-reactive protein and problems of newborn infants. **J Pediatr**, 101(3): 438-40, 1982.

ADAMS-CHAPMAN, I.; STOLL, B.J. Prevention of nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. **Curr Opin Pediatr**, 14(2): 157-64, 2002.

ALBERTONI, A.C.S. **Impacto da dosagem seriada da proteína C-reativa na suspensão da antibioticoterapia no período neonatal**. São Paulo, 2004. (Dissertação – Mestrado – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina).

APGAR, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg*, 32: 260-7, 1953.

ASAMBLEA MEDICA MUNDIAL. Declaración de Helsinki: Recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica en seres Humanos/Helsinki's declaration: biomedical research in human bodies. **Bol Oficina Sanit Panam**, 108(5/6): 626-9, 1990.

BALLARD, J.K.; KHOURY, J.C. WEDIG, K.; EILERS-WALSMON, B.L.; LIPP, R. New Ballard score, expanded to include extremely premature infants. **J Pediatr**, 119(3): 417-23, 1991.

BALTIMORE, R.S. Neonatal sepsis – epidemiology and management. **Pediatr Drugs**, 5(11): 723-40, 2003.

BENITZ, W.E, HAN, M.Y.; MADAN, A.; RAMACHRANDA, P. Serial serum C-reactive levels in the diagnosis of neonatal infection. **Pediatrics**, 102(4)e41, 1998.

BENTLIN, M.R. **Determinação dos níveis séricos e urinários da interleucina 8 em recém-nascidos prematuros com sepse tardia**. Botucatu, 2003. (Tese – Doutorado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ Botucatu).

BENUCK, I.; DAVID, R.J. Sensitivity of published neutrophil indexes in identifying newborn infants with sepsis. **J Pediatr**, 103(6): 961-63, 1983.

BERGER, C.; UEHLINGER, J.; GHELFI, D.; BLAU, N; FANCONI, S. Comparison of C-reactive protein and white blood cell count with differential in neonates at risk for septicemia. **Eur J Pediatr**, 154: 138-44, 1995

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachetin: more than a tumor necrosis factor. **N Engl J Med**, 316(7): 379-85, 1987.

BHARTIYA,D.; KAPADIA, C.; SANGHVI, K.; SINGH, H.; KELKAR, R.; MERCHANT, R. Preliminary studies on IL-6 levels in healthy and septic Indian neonates. **Indian Pediatr**, 37: 1361-7, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus. IDBBrasil 2004 Brasília, DF, 2004. Disponível em <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>. Acesso em 17/01/2006.

BONT, E.S.J.M.; MARTENS, A.; RAAN, G.; SAMSON, W.P.F.; FETTER, A; OKKEN, A; LEIJ, L.H.M. de. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1- β , and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis. **Pediatr Res**, 33(4): 380-3, 1993.

BUCK, C.; BUNDSCHU, J.; GALLATI, H.; BARTMANN, P.; POHLANDT, F. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. **Pediatrics**, 93(1): 54-5, 1994.

BUCK, C.; POHLANDT, F. Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal infection. **Pediatr Infect Dis**, 14(12): 1119-20, 1995.

CALIL, R.; MARBA, S. T.M.; NOWAKONSKI, A .; TRESOLDI, A.T. Reduction in colonization and nosocomial infection by multiresistant bacteria in a neonatal unit after institution of educational measures and restriction in the use of cephalosporins. **Am J Infect Control**, 29(3): 133-8, 2001

CAPURRO, H.; KONICHEZKY, S.; FONSECA, D.; CALDEYRO-BARCIA, R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. **J Pediatr**, 93(1):120-2, 1978.

CECCON, M.E.J.R. **Análise do uso das interleucinas 6 e 8 e proteína C-reativa para diagnóstico e seguimento terapêutico de recém-nascidos com sepse tardia internados na unidade de cuidados intensivos neonatais**. São Paulo, 2002. (Tese – Livre Docência – Universidade de São Paulo).

CHIESA, C.; PANERO, A.; ROSSI, N.; STEGAGNO, M.; de GIUSTI, M.; OSBORN, J.F.; PACIFICO, L. Reliability of procacitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. **Clin Infect Dis**, 26(3): 664-72, 1998.

CHIESA, C.; SIGNORE, F.; ASSUMA, M.; BUFFONE, M.; TRAMONTOZZI, P.; OSBORN, J.P.; PACIFICO, L. Serial measurements of C-reactive protein and interleukin-6 in the immediate postnatal period: reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. **Clin Chem**, 47(6): 1016-22, 2001.

CHIESA, C.; PELLEGRINI, G.; PANERO, A.; OSBORN, J.; SIGNORE, F. ; ASSUMA, M.; PACIFICO, L. C-reactive protein, interleukin-6 and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. **Clin Chem**, 49(1): 60-8, 2003.

CHIESA, C.; PANERO, A.; OSBORN, J.F.; SIMONETTI, A.F.; PACIFICO, L. Diagnosis of neonatal sepsis: a clinical and laboratory challenge. **Clin Chem**, 50(2): 279-87, 2004.

DØLLNER, H.; VATTEN, L.; AUSTGULEN, R. Early diagnosis markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. **J Clin Epidemiol**, 54: 1251-7, 2001.

EHL, S.; GERING, B.; BARTMANN, P.; HÖGEL, J.; POHLANDT, F. C-reactive protein is a useful marker for guiding duration of antibiotic therapy in suspected neonatal bacterial infection. **Pediatrics**, 99(2): 216-21, 1997.

EHL, S.; GERING, B.; POHLANDT, F. A detailed analysis of changes in serum C-reactive protein levels in neonates treated for bacterial infection. **Eur J Pediatr**, 158: 238-42, 1999.

EMORI, T.G.; CULVER, D.H.; HORAN, T.C.; JARVIS, W.R.; WHITE, J.W.; OLSON, D.R. et al. National nosocomial infections surveillance system (NNIS): description of surveillance methods. **Am J Infect Control**, 19(1): 19-35, 1991.

ESCOBAR, G.J. Effect of the systemic inflammatory response on biochemical markers of neonatal bacterial infection: a fresh look at old confounders. **Clin Chem**, 49(1): 21-2, 2003.

FANAROFF, A.A.; KORONES, S.B.; WRIGHT, L.L.; VERTER, J.; POLAND, R.; BAUER, C.R. et al. Incidence, presenting features, risk factors and the significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. **Pediatr Infect Dis J**, 17(7): 593-8, 1998.

FISCHER, J.E.; HARBARTH, S.; AGTHE, G.; BENN, A.; RINGER, S.A. GOLDMANN, D.A.; FANCONI, S. Quantifying uncertainty: physicians' estimates of infection in critically ill neonates and children. **CID**, 38: 1383-90.

FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.E. **Clinical epidemiology, the essentials**. 3rd ed. Baltimore: Williams&Wilkins, 1996. p. 43-74.

FRANZ, A.R.; BAUER, K; SCHALK, A.; GARLAND, S.M.; BOWMAN,E.D.; REX, K. et al. Measurement of interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: a multicenter, randomized, controlled trial. **Pediatrics**, 114(1): 1-8, 2004.

GARNER, J.S.; JARVIS, W.R.; BENORI, T.G.; HORAN, T.C.; HUGHES. J.M. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. **Am J Infec Control**, 16(3):128-140, 1988.

GAYNES, R.P.; EDWARDS, J.R.; JARVIS, W.R.; CULVER, D.H.; TOLSON, J.S.; MARTONE, W.J. Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States. **Pediatrics**, 98(3): 357-61, 1996.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and others systemic responses to inflammation. **N Engl J Med**, 340(6): 448-54.

GERDES, J.S. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. **Clin Perinatol**, 18(2): 361-81, 1991.

GERDES, J.S. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. **Pediatr Clin N Am**, 51: 939-959, 2004.

GIRARDINI, E.P.; BERNER, M.E.; GRAU. G.E.; SUTER, S. LACOURT, G.; PAUNIER, L. Serum tumour necrosis factor in newborns at risk for infections. **Eur J Pediatr**, 149: 645-7, 1990.

GOLDSTEIN, B.; GIROIR, B.; RANDOLPH, A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organs dysfunctions in pediatrics. **Pediatr Crit Care Med**, 6(1): 2-8, 2005.

GONZALES, B.E.; MERCADO, C.K.; JOHNSON, L.; BRODSKY, N.L.; BHANDARI, V. Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. **J. Perinat. Med**, 31: 60-8, 2003.

GRASA ULRICH, J.M.; RITE GRACÍA, S.; GRASA BIEC, J.M.; MARCO TELLO, A.; RITE MONTANES, S. Valores de referencia de interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en recién nacidos sanos. **An Esp Pediatr**, 54(5): 526-7, 2001.

GUILLOIS, B.; DONNOU, M.D.; SIZUN, J.; BENDAOU, B.; YOUINO, P. Comparative study of four testes of bacterial infection in the neonate. **Biol Neonate**, 66:175-81, 1994.

GROLL, A. H.; MEISER, A.; WEISE, M.; RETTWITZ-VOLK, W.; LOEWENICH, V.; GUSSETIS, E.S.; et al. Interleukin-6 as early mediator in neonatal sepsis. **Ped Infect Dis J**, 11(6): 496-7, 1992.

HAQUE, K.N. Definitions of bloodstream infection in the newborn. **Pediatr Crit Care Med**, 6(3): S45-7, 2005.

HARRIS, M.C.; COSTARINO, A.T.; SULLIVAN, J.S.; DULKERIAN, S.; MCCAWLEY, L.; CORCORAN, L. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing. **J Pediatr**, 124(1): 105-11, 1994.

HARDING, D.; DHAMRAIT, S.; MILLAR, A.; HUMPHRIES, S.; MARLOW, N.; WHITELAW, A. MONTGOMERY, H. Is interleukin-6 – 174 genotype associated with development of septicemia in preterm infants? **Pediatrics**, 112(4): 800-3, 2003.

HILL, H.R. Biochemical, structural, and functional abnormalities of polymorphonuclear leucocytes in the neonate. **Pediatr Res**, 22(4): 375-82, 1987.

HORAN, T.C.; GAYNES, R.P. Surveillance of nosocomial infections. In: **Hospital Epidemiology and Infection Control**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Willians; 2004. p.1659-1702.

HUGONNET, S.; SAX, H.; EGGIMANN, P.; CHEVROLET, J-C.; PITTET, D. Nosocomial bloodstream infection and clinical sepsis. *Emerg Infec Dis*, 10(1): 76-81, 2004.

HURST, M.K.; YODER, B.A. Detection of bacteremia in young infants: is 48 hours adequate? **Pediatr Infect Dis J**, 14(8): 711-3, 1995.

ISHIBACHI, M.; TAKEMURA, Y.; ISHIDA, H.; WATANABE, K.; KAWAY, T. C-reactive protein kinetics in newborns: application of a high-sensitivity analytic method in its determination. **Clin Chem**, 48(7): 1103-6, 2002.

JACKSON, G.L.; ENGLE, W.D.; SENDELBACH, D.M.; VEDRO, D.A.; JOSEY, S.; VINSON, J. et al. Are complete blood cell counts useful in the evaluation of asymptomatic neonates exposed to suspected chorioamnionitis? **Pediatrics**, 113(5):1173-80, 2004.

JAYE, D.L.; WAITES, K.B. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. **Pediatr Infect Dis J**, 16(8): 735-46, 1997.

KARLOWICZ, M. G.; BUESCHER, S. E.; SURKA, A. E. Fulminant late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit, 1988-1997, and the impact of avoiding empiric vancomycin therapy. **Pediatrics**, 106(6): 1387-90, 2000.

KÄLLMAN, J.; EKHOLM, L.; ERIKSSON, M.; MALMSTRÖM, B.; SCHOLLIN, J. Contribution of interleukin-6 in distinguishing between mild respiratory disease and neonatal sepsis in the newborn infant. **Acta Paediatr**. 88(8): 880-4, 1999.

KAUFMAN, D.; FAIRCHILD, K.D. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very low-birth weight infants. **Clin Microbiol Rev**, 17(3): 638-80, 2004.

KAWAMURA, M.; NISHIDA, H. The usefulness of serial C-reactive protein measurement in managing neonatal infection. **Acta Paediatr**, 84: 10-13, 1995.

KINASEWITZ, G.T.; YAN, S.B.; BASSON, B.; COMP, P.; RUSSEL, J.A.; CARIOU, A. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism. **Crit care**, 8(2): r82-90, 2004.

KLEIN, J., MARCY, M.S. Bacterial sepsis and meningitis. In: REMINGTON, J.S., KLEIN, J. O. **Infectious diseases of the fetus & newborn infant**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991. p.835-890.

KURTOGLU,S.; CAKSEN, H.; HALLAC, I. K.; USTINBAS, H.B.; UZUM,K. Serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 levels in neonatal sepsis. **Pediatr Emerg Care**, 19(3): 219-20, 2003.

KÜSTER, W.; WEISS, M.; WILLEITENER, E.; DETLEFSEN, S.; JEREMIAS, I; SJOBAN, J et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. **Lancet**, 352(9136): 1271-7, 1998.

LABORADA, G.; REGO, M.; JAIN, A.; GULIANO, M.; STAVOLA, J.; BALLABH, P. et al. Diagnostic value of cytokines and C-reactive protein in the first 24 hours of neonatal sepsis. **Am J Perinat**, 20(8): 491-501, 2003.

LE, J.; VILCEK, J. Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase response. **Lab Investig**, 61(6): 588-602, 1989.

LEMONS, J.A.; BAUER, C.R.; OH, W.; KORONES, S.B.; PAPILE, L-A.; STOLL, B. et al. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996. **Pediatrics**, 107(1) e1, 2001.

LEVY, M.M.; FINK, M.P.; MARSHALL, J.C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. **Crit Care Med**, 31(4):1250-5, 2003.

LLOYD, B.W.; OTTO, A. Normal values for mature and immature neutrophils in very preterm babies. **Arch Dis Child**, 57(3): 233-5, 1982.

LUBCHENCO, L.O.; SEARLS, D.T.; BRTAZIE, J.V. neonatal mortality rate: relationship to birth weight and gestational age. **J Pediatr**, 81(4): 814-22, 1972.

MAHESHWARI, A.; CHRISTENSEN, R.D. Developmental granulocytopoiesis. In: POLIN, R.A; FOX, W.N.; ABMON, S.H. **Fetal and neonatal physiology**. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 2004. p. 1388-95.

MANROE, B.L.; WEINBERG, A.G.; ROSENFELD, C R.; BROWN, R. The neonatal blood count in health and disease I. Reference values for neutrophilic cells. **J Pediatr**, 95(1): 89-98, 1979.

MARCHINI, G.; BERGGREN, V.; DJILALI-MERZOUG, R.; HANSSON, L.O. The birth process initiates an acute phase reaction in the fetus-newborn infant. **Acta Paediatr**, 89(9):1082-6, 2000.

MARTIN, H.; OLANDER, B.; NORMAN, M. Reactive hyperemia and interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of early onset neonatal sepsis. **Pediatrics**, 108 (4): e61, 2001.

MATHERS, N. J.; POHLANDT, F. Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection. **Eur J Pediatr**, 146(2): 147-51, 1987.

MELDRUN, D. R. Tumor necrosis factor in the heart. **Am J Physiol**, 274: 577-95, 1998.

MEHR, S.; DOYLE, L. W. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. **Pediatr Infect Dis J**, 19(9): 879-87, 2000.

MESSER, J.; EYER, D; DONATO, L.; GALLATI, H.; MATIS, J.; SIMEONI, U. Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. **J Pediatr**, 129(4): 574-80, 1996.

MICHIE, H.R.; SPRIGGS, D.R.; REVHAUG, A.; O'DWYER, S.; DINARELLO, C.A. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. **N Engl J Med**, 318(23): 1481-6, 1988.

MOUZINHO, A.; ROSENFELD, C.; SANCHES, P. .; RISSER, R. Revised references ranges for circulating neutrophils in very-low birth-weight neonates. **Pediatrics**, 94(1): 76-82, 1994.

NESIN, M.; CUNNINGHAN-RUNDLES, S. Cytokines and neonates. **Am J Perinat**, 17(8): 393-404, 2000.

NG, P.C.; CHENG, S.H.; CHUI, K.M.; FOK, T. F.; WONG, M.Y.; WONG, W. et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, 77(3): F221-7, 1997.

NG, P.C.; LI, K.; WONG, R.P. O.; CHUI, K.; WONG, E.; LI, G.; FOK, T.F. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm with systemic infections. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, 88: F209-13, 2003.

NG, P.C. Diagnostic markers of infection in neonates. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, 89: F229-35, 2004.

OBERHOLZER, A.; SOUZA, S.M.; TCHOEKE, S.K.; OBEERHOLZER, C.; ABOUHAMZE, A; PRIBBLE, J.P.; MOLDAWER, L.L. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. **Shock**, 23(6):488-93, 2005.

ODA, S.; HIRASAWA, H.; SHIGA, H.; NAKANISHI, K.; MATSUDA, K-I.; NAKAMUA, M. Sequential measurements in IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. **Cytokine**, 29(4): 169-75, 2005.

PANERO, A.; PACIFICO. L.; ROSSI, N.; MANCUSO, G.; STEGAGNO, M.; CHIESA, C. Interleukin 6 in neonates with early and late onset infection. **Pediatr Infect Dis J**. 16(4): 370-5, 1997.

PESSOA-SILVA, C.L.; RICHTMANN, R.;CALIL, R.; SANTOS, R.M.R.S.;COSTA, M.L.M.; FROTA, A.C.C.; BARSANTI,S. Healthcare associated infections among neonates in Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 25: 772-7, 2004.

PHILIP, A.G.S.; MILLS, P. C. Use of C-reactive protein in minimizing antibiotic exposure: experience with infants initially admitted to a well-baby nursery. **Pediatrics**, 106(1) e 4, 2000.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, 14: 185-91, 2003.

PIZZINI, C.; MUSSAP, M.; PLEBANI, M.; FANOS, V. C-reactive protein and serum amyloid A protein in neonatal infections. **Scand J Infect Dis**, 32(3): 229-35, 2000.

POLL T. ; BULLER, H.R.; CATE, H.; WORTEL, C.H.; BAUER, K.A.; DEVENTER, S.J. et al. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. **N Engl J Med**, 322(23): 1622-7, 1990.

POURCYROUS, M.; BADA, H. S.; KORONES, S.B.; BASELSKI, V.; WONG, S.P. Significance of serial C-reactive protein responses in neonatal infection and others disorders. **Pediatrics**, 93(4): 693-4, 1994.

PUOPOLO, K.M. Infecções bacterianas e fúngicas. IN: CLOHERTY, JP.; EICHENWALD, E.C.; STARK, A.R. **Manual de Neonatologia**. Tradução de Setúbal, S. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 243-65.

RITE GRACIA, S.; GRASA ULRICH, J.M.; CUESTA MARTIN, C.R.; GRASA BIEC, J.M.; REBAGE MOISÉS, V.; MARCO TELLO, A.; RITE MONTANÉS, S. Interleucina-6 y factor de necrosis tumoral- α como marcadores de infección neonatal de transmisión vertical. **An Pediatr (Barc)**, 59(3): 246-51, 2003.

RODWELL, R.L.; LESLIE, A.L.; TUDEHOPE, D. I. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. **J Pediatr**, 112(5): 761-7, 1988.

RODWELL, R.L.; TAYLOR, K.M.; TUDEHOPE, D.I.; GRAY, P.H. Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns. **Pediatr Infect Dis J**, 12(5): 372-6, 1983.

ROMAGNOLI, C.; FREZZA, S.; CINGOLANI, A.; LUCA, A de .; PUOPOLO, M.; CAROLIS, M.P de. et al. Plasma levels on interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. **Eur J Pediatr**, 160: 345-50, 2001.

ROMAN, J.; FERNANDEZ, F.; VELASCO, F.; ROJAS, R.; ROLDAN, M.R.; TORRES, A. Serum TNF levels in neonatal sepsis and septic shock. **Acta Paediatr**, 82: 352-4, 1993.

RONNESTAD A.; ABRAHAMSEN, T.G.; GAUSTAD, P.; FINNE, P.H. C-reactive protein (CRP) response patterns in neonatal septicaemia. **APMIS**, 107(6): 593-600, 1999.

ROSSUM A. M.; WULKAN, R. W.; OUDESLUYS-MURPHY, A. M. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. **Lancet Infect Dis**, 4(10): 620-30.

ROY, S.; HILL, A.V.; KNOX, K.; GRIFFITHS, D.; CROOK, D. Association of common genetic variant with susceptibility to invasive pneumococcal disease. **BMJ**, 324(7350): 1369, 2002.

RUGOLO, L.M.S.S. Infecções adquiridas. In RUGOLO, L. M.S.S. (ed). **Manual de Neonatologia**. 2^a ed. rev. e ampl. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p. 221-6.

SANTANA REYES, C.; GARCIA-MUNOZ, F.; REYES, D.; GONZÁLES, G.; DOMINGUEZ, C.; DOMENECH, E. Role of cytokines (interleukin1- β , 6, 8, tumor necrosis factor- α , and soluble receptor of interleukin-2) and C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis. **Acta Pediatr**, 92: 221-7, 2003.

SARFF, L.D.; PLATT, L.H.; McCracken, G.H. Jr. Cerebrospinal fluid evaluation in neonates: comparison of high-risk infants with and without meningitis. **J Pediatr**, 88(3): 473-7, 1976.

SCHELONKA, R.L.; YODER, B.A.; HALL, R.B.; TRIPPETT, P.M.; LOUDER, D.S.; HICKMAN, J. R.; GUERRA, G.G. Differentiation of segmented and band neutrophils during the early newborn period. **J Pediatr**, 127(2): 298-300, 1995.

SCHELONKA, R.L.; MOSER, S. A. Time to positive culture results in neonatal Candida septicemia. **J Pediatr**, 142(5): 564-5, 2003.

SCHOUTEN-VAN MEETEREN, N.Y.; RIETVELD, A.; MOOLENAAR A.J.; BEL, F. Influence of perinatal conditions on C-reactive protein production. **J Pediatr**, 120(4 Pt 1): 621-4, 1992.

SHINE, B.; GOULD, J.; CAMPBELL, C.; HINDOCHA, P.; WILMOT, R.P.; WOOD, C.B.S. Serum C-reactive protein in normal and infected neonates. **Clin Chim Acta**, 148(2): 97-103, 1985.

SILVA, O.; OHLSSON, A.; KENYON, C. Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. **Pediatr Infect Dis J**, 14: 362-66, 1995.

SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for early diagnosis of neonatal sepsis. **Acta Paediatr**, 88(6): 647-50., 1999

STOLL, B.J.; HOLMAN, M.S.; SCHUCHAT, A. Decline in sepsis-associated neonatal and infant deaths in the United States, 1979 through 1994. **Pediatrics**, 102(2) e18, 1998.

STOLL, B.J.; HANSEN, N.; FANAROFF, A.A.; WRIGHT, L.L. CARLO, W.A.; EHRENKRANZ, A. et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of NICHD neonatal research network. **Pediatrics**, 110(2): 285-91, 2002.

STOLL, B.J.; HANSEN, N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD neonatal research network. **Semin Perinatol**, 27(4): 293-301, 2003.

STOLL, B. .; HANSEN, N.; FANAROFF, A.A.; WRIGHT, L.L.; CARLO, W.A. EHRENKRANZ, R.A. et al. To tap or not to tap: high likelihood of meningitis without sepsis among very low birth weight infants. **Pediatrics**, 113(5): 1181-6, 2004.

STOVER, B.H., SHULMAN, S.T.; BRATCHER, D.F.; BRADY, M.T.; LEVINE, G.L.; JARVIS, W.R. Nosocomial infection rates in US children' s hospitals' neonatal and pediatric intensive care units. **Am J Infect Control**, 29(3): 152-7, 2001.

SZALAI, A.J.; MCCRORY, M.A. Varied biologic functions of C-reactive protein: lessons learned from transgenic mice. **Immunol Res**, 26(1-3):279-87, 2002.

VAZZALWAR, R. PINA-RODRIGUES, E.; PUPPALA, B.L.; ANGST, D.B.; SCHWEIG, L. Procalcitonin as a screening test for late-onset sepsis in preterm very low birth weight infants. **J Perinatol**, 25(6): 397-402.

VERGNANO, S.; SHARLAND, M.; KAZEMBE, P.; MWANSAMBO, C.; HEATH, P.T. Neonatal sepsis: an international perspective. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.** 90: 220-4, 2005.

VIEIRA, A.A. **Avaliação do comportamento da interleucina-6 e da proteína C-reativa em recém-nascidos com sepse.** Rio de Janeiro, 2001. (Dissertação – Mestrado – Fundação Osvaldo Cruz - Instituto Fernandes Figueira).

VOLANAKIS, J.E. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. **Mol Immunol**, 38(2-3): 189-97, 2001.

VOLANTE, E.; MORRETI, S.; PISANI, F.; BEVILACQUA, G. Early diagnosis of bacterial infection in the neonate. **J Matern Neonatal Med**, 16(2): S13-6.

WALSH, M.C.; KLIEGMAN, R.M. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. **Ped Clin North Am**, 33: 179-201, 1986.

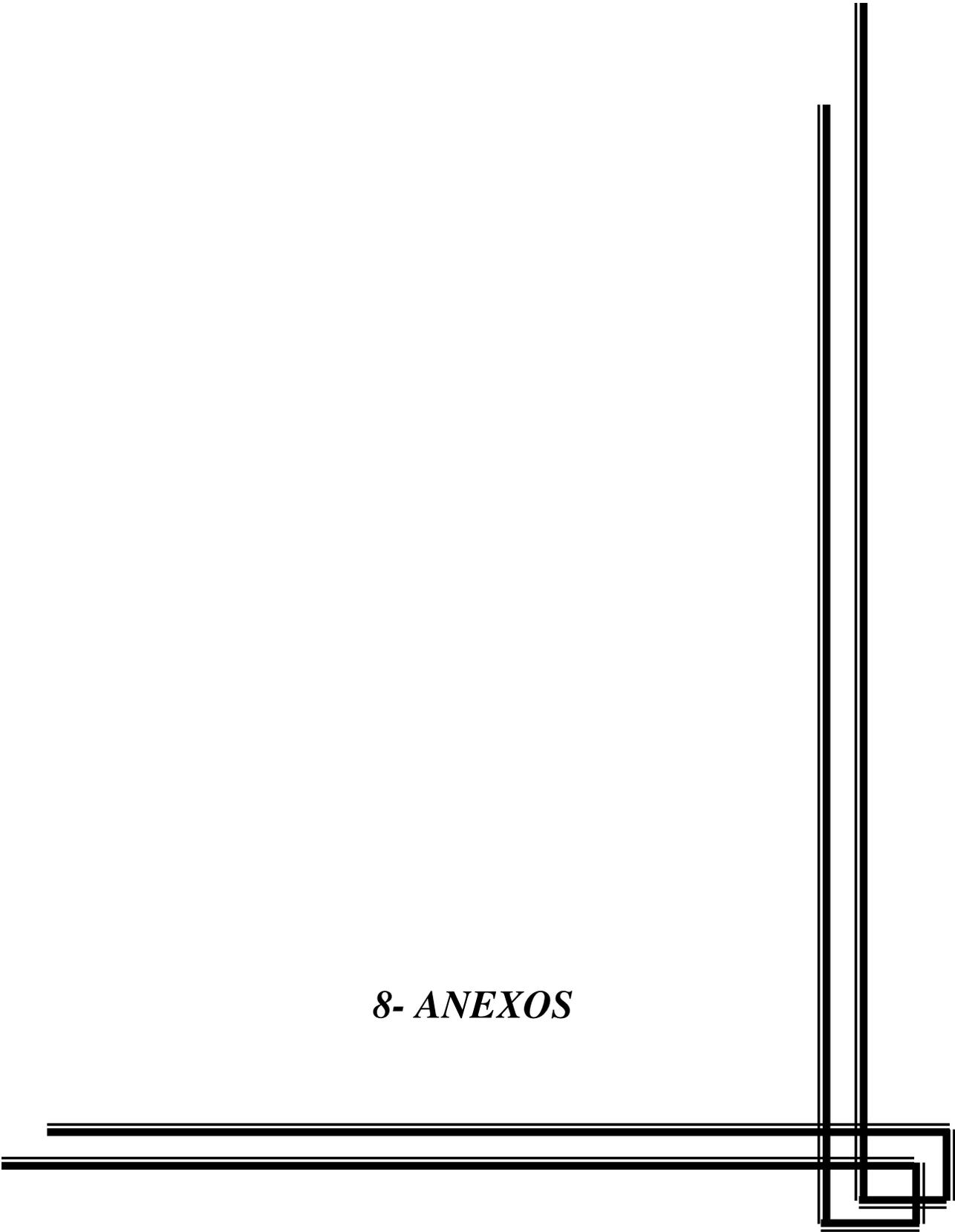
WHO – Consultation on definitions and standards related to maternal and child health and the perinatal period (1987: Washington, D.C., 30 March to 3 April; report). Disponível em http://whqlibdoc.who.int/hq/1987/WHO_DES_ICD_PE_87.1.pdf. Acesso em 17/01/2006.

WHO – Health Bulletin. Basel, Switserzerland, World Health Organization, 2005. Disponível em <http://www.who.int/whr/2005/annexes-pr-pdf>. Acesso em 19/01/2006.

ZAFAR, N.; WALLACE, C. KIEFFER, P.; SCHROEDER, P.; SCHOOTMAN, M.; HAMVAS, A. Improving survival of vulnerable infants increases neonatal intensive care unit nosocomial infection rate. **Arch Pediatr Adolesc Med**, 155(10): 1098-104, 2001.

ZUBROWN, AB.; HULMAN, S.; KUSHNER H.; FALKNER, B. Determinants of blood pressure in infants admitted to neonatal intensive care units: a prospective multicenter study. Philadelphia Neonatal Blood Pressure Study Group. **J Perinatol**, Nov-Dec;15(6):470-9, 1995.

8- ANEXOS



NOME:

HC:

SINAIS DE SUSPEIÇÃO:

palidez cutânea () enchimento capilar alterado () hipoatividade () bradicardia () taquicardia () apnéia ()
taquipnéia () piora respiratória () hipotermia () hipertermia () crises de cianose () resíduo gástrico ()
oligúria () icterícia () distensão abdominal () vômitos () sufusões hemorrágicas () hipotensão ()
alteração de pulso () irritabilidade () rendilhado cutâneo () gemência () escleredema () distensão
abdominal () dor abdominal () vômitos () coma () convulsão ()

HEMOGRAMA: Neutrófilos Totais...../ml normal () alterada ()

Relação I/T..... normal () alterada ()

PROTEÍNA C-REATIVA:

Dia 0.....mg/dl

Dia 1.....mg/dl

Dia 5.....mg/dl

INTERLEUCINA-6:

Dia 0.....

Dia 1.....

Dia 2.....

FATOR DE NECROSE TUMORAL:

Dia 0.....

Dia 1.....

Dia 2.....

HEMOCULTURA: negativa () positiva () agente:.....

Tempo de positividade < 24 h () 24-48 h () 48-72h () > 72 h ()

CULTURA DE LÍQUOR: negativa () positiva () agente:.....

RX tórax normal () pneumonia () DMH () TTRN () pneumotórax () ECN ()

Choque: sim () não () Óbito: sim () não ()

OUTROS DIAGNÓSTICOS:

DIAGNÓSTICO FINAL:

RN COM SEPSE COM CULTURA POSITIVA []

RN COM SEPSE COM CULTURA NEGATIVA []

RN NÃO INFECTADO []

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: O USO DE PROTEINA C-REATIVA, INTERLEUCINA-6 E FATOR DE NECROSE TUMORAL α COMO MARCADORES DE SEPSE NEONATAL

Eu, Sra _____ e/ou Sr _____, mãe e pai do menor _____, HC nº _____, que está internado no Centro de Atenção À Saúde da Mulher (CAISM), no Setor de Neonatologia (Berçário) fui informada de que meu filho(a) participará desta pesquisa em que serão colhidos 6 ml de sangue de veia ou do pezinho para ver se ele possui alguma infecção. As informações sobre meu filho(a) permanecerão no anonimato e somente o médico pesquisador saberá de quem se trata aquelas amostras de sangue e as fichas ficarão de posse do Dr Jamil Pedro de Siqueira Caldas, que manterá sigilo das informações.

Sei que este estudo tem como objetivo procurar encontrar no sangue das crianças substâncias que podem indicar se ela está com infecção. Mas esses exames serão feitos depois e não interferirão com a conduta a ser tomada com o meu filho(a), que continuará a receber os cuidados normalmente na internação.

Fui esclarecida quanto ao meu direito de não participar da pesquisa e de meu filho(a) continuar a ser atendido(a) no Berçário sem prejuízo de sua assistência médica. Em caso de dúvidas ou esclarecimento, tenho o direito de telefonar para o doutor Jamil Pedro de Siqueira Caldas nos números 788-9344 ou 788-7412. Este estudo não implica em remuneração financeira.

Campinas, _____ de _____ de _____.

Assinatura da mãe e/ou pai

Jamil Pedro de Siqueira Caldas

Grupos com sepse comprovada e com infecção provável associados

Tabela 26- Características gerais dos recém-nascidos dos grupos com infecção comprovada e provável, associados, e dos recém-nascidos não infectados

	Sepse comprovada + provável (58)	Não infectados (24)	p
Peso ao nascer (g)*	1340 (470-4100)	1627,5 (830-3770)	0,2426**
Idade gestacional (semanas)*	31 (25-41)	32 (24-41)	0,5626**
Idade à suspeita (dias)*	14 (3-30)	10,0(4-29)	0,1968**
Apgar 1o minuto ≥ 7 (%)	29 (50,0)	18 (75)	0,0373#
Apgar 5o minuto ≥ 7(%)	53 (91,4)	23 (95,8)	0,6656#
PIG (%)	21 (36,2)	0	<0,0001 α
Sexo masculino (%)	33 (56,9)	13 (54,2)	0,8207#

* Valores de mediana. **Teste de Wilcoxon. # Teste de qui-quadrado. α Teste exato de Fischer

Tabela 27- Sintomatologia mais freqüente encontrada nos grupos de recém-nascidos com infecção comprovada e provável, associados, e nos recém-nascidos não infectados

	Sepse comprovada + infecção provável	Não infectado
Hipoatividade	49 (84,5)	15 (62,5)
Palidez	41 (70,7)	4 (16,7)
Apnéia	31 (53,4)	5 (20,8)
Perfusão alterada	21 (36,2)	2 (8,3)
Taquipnéia	20 (34,5)	6 (25,0)
Hipertermia	14(24,1)	7 (29,2)
Cianose	14(24,1)	0
Resíduo gástrico	13 (22,4)	0
Bradycardia	12 (20,7)	3 (12,5)
Hipotermia	12 (20,7)	3 (12,5)
Distensão abdominal	11(19,0)	3 (12,5)
Icterícia	11(19,0)	2 (8,3)
Oligúria	11(19,0)	0
Piora respiratória	10 (17,2)	5 (20,8)
Recusa alimentar	10 (17,2)	2 (8,3)
Hipotensão	9 (15,5)	0
Taquicardia	9 (15,5)	1 (4,2)
Rendilhado cutâneo	8 (13,8)	1 (4,2)
Alteração de pulso	7 (12,1)	0
Escleredema	6 (10,3)	0
Sangramentos	6 (10,3)	0
Outros	21(36,2)	7 (29,2)

Número de ocorrências (percentagem)

Tabela 28- Leucograma nos grupos com sepse comprovada e infecção provável, associados, e nos recém-nascidos não infectados

	Infecção comprovada + provável (58)	Não infectados (24)
Normal	20 (34,5)	18 (75,0)
Alterado	38 (65,5)	6 (25,0)

Número de casos (percentagem)

Tabela 29- Valores de mediana da PCR, IL-6 e TNF- α nos grupos com sepse comprovada e infecção provável, associados, e nos recém-nascidos não infectados

	Infecção comprovada e provável (58)	Não infectados (24)	p*
PCR 1ª medida	4,66 (0,19 - 31,30)	0,28 (0,01-3,61)	<0,0001
PCR 2ª medida	9,93 (0,29 - 83,20)	0,51 (0,01-2,38)	<0,0001
PCR 3ª medida	6,00 (0,11 - 144,00)	0,33 (0,02-3,20)	<0,0001
IL-6 1ª medida	67,75 (0,99 - 29079,00)	5,00 (2,10 - 69,50)	<0,0001
IL-6 2ª medida	18,25 (1,40 - 23818,00)	5,00 (1,30 - 52,30)	0,0015
IL-6 3ª medida	8,90 (0,00 - 19998,00)	5,00 (1,00 - 40,10)	0,0163
TNF-α 1ª medida	20,10 (0,02 - 397,00)	6,40 (2,10 - 29,70)	0,0002
TNF-α 2ª medida	17,15 (2,00 - 376,00)	6,60 (0,75 - 30,40)	0,0011
TNF-α 3ª medida	12,30 (1,40 - 238,00)	7,00 (3,70 - 17,30)	0,0245

* Teste de Wilcoxon

Tabela 30- Ocorrência de choque e óbito nos grupos de recém-nascidos com infecção comprovada e provável e não infectados

	Infecção comprovada + provável (58)	Não infectados (24)	p*
Choque	21 (36,2)	0	< 0,0001
Óbito	5 (8,60)	0	0,3147

Número de ocorrências (percentagem)

* Teste de associação: exato de Fisher

Tabela 31- Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e acurácia para os quatro exames estudados

	Sens	Esp	VPP	VPN	Acurácia
Leucograma	65,5	75,0	86,4	47,4	68,3
PCR 1ª medida	81,0	87,5	94,0	65,6	82,9
PCR 2ª medida	89,7	87,5	94,5	77,8	89,0
PCR 3ª medida	84,5	91,7	96,1	71,0	86,0
IL-6 1ª medida	76,8	87,0	93,5	60,6	79,7
IL-6 2ª medida	70,7	70,8	85,4	50,0	70,7
IL-6 3ª medida	63,2	66,7	85,7	46,2	66,7
TNF-α 1ª medida	69,4	77,3	87,2	53,1	71,8
TNF-α 2ª medida	71,2	72,7	86,0	51,6	71,6
TNF-α 3ª medida	53,8	95,2	96,6	45,5	65,8

Limites de cortes obtidos pelo ponto de maximização - curva ROC

Valores de PCR, IL-6 e TNF- α em todos os sujeitos estudados

Sujeito	PCR	PCR	PCR	IL-6	IL-6	IL-6	TNF	TNF	TNF
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
	medida								
1	0,56	3,47	1,32	13,50	1,60	5,00	7,10	6,00	7,30
2	0,64	0,64	0,31	5,00	5,00	5,00	19,5	24,1	22,0
3	1,00	1,20	1,60	28,50	36,20	8,90	12,5	51,8	19,5
4	1,00	13,4	16,8	117,0	111,00	7,60	--	75,8	23,7
5	1,03	1,00	4,29	73,50	71,60	9,20	34,4	33,2	35,0
6	1,22	1,50	,74	38,80	5,00	6,80	63,7	26,0	34,4
7	1,28	11,4	7,75	69,00	31,60	35,50	--	15,6	18,0
8	1,73	6,24	4,72	153,0	16,20	8,90	40,9	21,3	14,6
9	2,09	3,82	1,88	185,0	39,80	5,60	--	--	--
10	2,98	1,95	,90	8,00	5,00	5,00	24,7	16,8	9,20
11	2,99	6,92	4,85	44,20	33,70	24,60	29,9	52,6	4,40
12	3,31	24,7	38,6	1940,0	218,00	425,00	36,7	62,3	68,2
13	3,54	7,61	3,72	--	64,70	16,90	--	35,2	27,1
14	3,72	7,57	12,3	16,90	114,00	14,70	27,1	17,5	7,30
15	4,22	5,89	2,39	9,80	5,00	5,00	29,7	10,2	8,50
16	4,39	12,4	51,2	2958,0	719,00	19998	397	376	101
17	5,00	10,2	5,51	6,40	15,10	4,70	7,70	--	8,40
18	5,18	5,52	2,45	59,80	3,10	1,20	8,10	5,30	1,40
19	5,18	6,68	4,64	26,10	17,10	4,60	4,80	5,20	2,00
20	5,19	9,59	3,64	273,00	3,60	,00	7,30	5,60	13,6
21	6,30	15,2	7,57	--	77,0	24,00	--	22,5	16,7
22	7,64	8,46	1,99	32,00	4,00	6,00	7,10	6,00	7,30
23	8,69	8,32	5,97	193,00	4,30	52,70	41,5	11,0	8,40
24	9,60	16,5	25,8	30,80	168,00	111,00	13,7	29,8	27,0
25	10,1	83,2	144	29079	23818	4830,0	--	55,8	--
26	11,9	24,2	6,33	3288,0	10,30	0,85	14,5	14,2	13,1
27	14,1	7,91	4,40	29,00	14,00	5,00	35,0	38,5	23,6
28	16,0	12,7	7,17	25,80	14,50	2,30	32,0	19,2	5,60
29	16,0	14,5	23,7	66,50	89,90	109,00	25,6	18,4	20,6
30	19,7	13,5	7,62	11,90	5,30	,28	9,70	5,30	--
31	30,4	20,2	13,7	6764,0	74,00	82,00	259	176	156
32	30,6	16,7	35,7	78,80	22,40	1267,0	31,5	17,5	238

Sujeito	PCR	PCR	PCR	IL-6	IL-6	IL-6	TNF	TNF	TNF
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
	medida								
33	12,6	14,7	4,83	117,00	8,60	1,90	13,1	4,30	4,20
34	15,7	27,1	42,4	29,20	1210,0	298,00	50,8	64,0	28,5
35	3,71	14,4	15,9	1001,0	1234,0	32,50	62,2	35,1	21,1
36	11,9	23,6	17,1	545,00	79,00	40,20	42,3	5,40	3,80
37	0,64	0,29	0,11	3,00	1,60	1,40	20,1	10,0	12,5
38	7,30	12,6	14,5	1001,0	1001,0	1001,0	--	45,2	44,1
39	8,29	10,3	8,18	85,30	36,40	16,00	9,70	4,30	3,70
40	7,56	55,0	53,1	119,00	225,00	99,90	13,0	11,8	15,0
41	2,27	1,16	0,49	7,40	3,60	3,20	5,70	4,90	4,00
42	1,04	0,29	0,72	32,10	5,80	19,80	10,9	--	--
43	0,01	0,01	0,14	5,00	5,00	5,00	5,10	1,60	6,90
44	0,01	0,20	0,10	5,00	5,00	5,00	13,5	13,3	10,9
45	0,01	0,71	0,80	5,00	5,00	5,00	4,50	6,40	5,90
46	0,01	1,14	0,52	5,00	5,00	5,00	6,50	4,60	5,30
47	0,03	0,18	0,64	3,60	18,60	1,00	12,9	10,8	8,70
48	0,03	0,92	0,36	2,90	5,00	5,00	--	5,80	3,70
49	0,04	0,02	0,03	5,00	5,00	2,10	5,10	8,00	--
50	0,06	0,03	0,02	3,60	5,70	7,50	7,50	--	5,30
51	0,10	0,06	0,06	5,00	5,00	5,00	2,10	--	--
52	0,14	0,08	0,02	18,00	3,00	5,00	29,10	15,8	10,00
53	0,18	0,17	0,28	16,40	11,20	5,00	12,30	10,70	10,40
54	0,22	0,25	0,17	5,00	5,00	3,00	3,90	4,00	4,20
55	0,33	0,53	0,28	5,00	6,40	5,00	2,50	2,90	8,30
56	0,40	0,29	0,21	2,10	5,00	5,00	9,90	9,40	7,00
57	0,45	0,33	0,19	5,00	5,00	5,00	5,70	4,70	3,90
58	0,58	0,48	0,29	5,60	9,00	1,80	8,70	7,30	9,40
59	1,21	0,75	0,54	19,50	28,00	29,90	9,90	7,80	8,60
60	1,33	0,56	0,66	4,70	52,30	40,10	3,60	3,70	6,30
61	1,36	0,69	0,39	5,30	1,30	5,00	5,40	6,50	4,70
62	2,38	1,31	0,73	3,30	5,00	5,00	12,0	9,00	7,80
63	2,52	1,81	1,09	34,40	12,60	9,00	29,70	30,40	17,30
64	2,65	2,20	3,20	69,50	5,80	35,60	6,30	6,70	7,40
65	3,61	2,38	1,92	5,00	5,00	5,00	5,00	0,75	4,00
65	1,10	0,90	0,88	40,40	1,50	3,40	9,90	7,80	7,60

Sujeito	PCR	PCR	PCR	IL-6	IL-6	IL-6	TNF	TNF	TNF
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
	medida								
66	0,36	0,54	1,12	--	16,00	9,40	--	2,60	--
67	1,12	1,14	0,64	43,60	1,40	5,00	--	2,00	3,80
68	1,70	14,60	14,80	1916,0	80,00	139,0	47,70	37,20	28,50
69	2,27	3,29	3,94	129,0	4,20	18,10	7,60	6,10	6,70
70	2,27	30,6	18,80	3,80	294,0	44,70	9,70	--	--
71	2,72	10,10	14,00	2219,00	16,00	5,00	13,30	--	11,10
72	3,83	29,10	60,90	8746,00	1047,00	80,60	42,20	20,50	13,70
73	4,44	2,18	1,01	20,80	5,00	6,30	9,80	8,10	9,10
74	4,72	6,71	--	63,80	26415,00	--	15,90	13,70	--
75	4,87	4,90	6,39	5,0	8,90	6,70	3,00	3,90	3,10
76	4,89	13,80	12,20	1600,00	110,00	24,60	--	15,30	13,70
77	6,47	3,42	1,77	43,20	11,70	5,90	23,30	22,40	12,10
78	7,79	11,3	5,00	329,00	7,90	5,00	2,40	2,90	2,30
79	13,70	9,67	5,29	8,00	5,00	5,00	41,10	5,10	4,10
80	18,30	23,9	23,90	294,00	42,00	38,00	7,00	2,50	4,20
81	31,30	31,9	8,00	138,00	13,40	2,40	24,20	--	5,20
82	2,94	9,76	6,02	,99,00	25,80	--	0,02	8,80	5,00

Sujeitos de 1 a 42 – Sepse comprovada por cultura

Sujeitos de 43 a 66 – Não infectados

Sujeitos de 67 a 82 – Infecção provável

-- = amostra insuficiente para dosagem