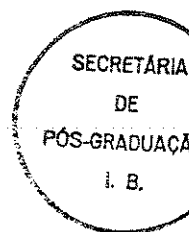


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ELIANA PATRON CHAPIRA VINER

INTRODUÇÃO DE UM NOVO MARCADOR
LABORATORIAL DE ATIVIDADE
INFLAMATÓRIA ASSOCIADA À INFECÇÃO.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Eliana Patron Chapiro Viner
Morton A. Scheinberg
e aprovada pela Comissão Julgadora
14/7/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP, para obtenção do Título de
MESTRE, em Ciências Biológicas, na área de
Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Morton Aaron Scheinberg

CAMPINAS
1999

9716341



U.	BC
N.	10/11/99
V.	Ex.
T. MBO BC/	38585
MBO.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	31/08/99
N.º OFD.	

CM-0012564B-1

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Viner, Eliana Patron Chapira

V751i

Introdução de um novo marcador laboratorial de
atividade inflamatória associada à infecção/Eliana
Patron Chapira Viner. - - Campinas, SP: [s.n.], 1999.
57f.:ilus.

Orientador: Morton Aaron Scheinberg

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

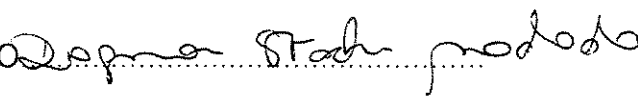
1. Infecção. 2. Septicemia. 3. Inflamação. I. Scheeinberg,
Morton Aaron II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

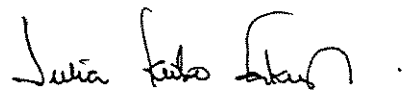
Data da Defesa:14/07/99

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. MORTON AARON SCHEINBERG (Orientador).....

Profa. Dra. DAGMAR RUTH STACH MACHADO.....

Profa. Dra. JULIA KEIKO SAKURADA.....

SUPLENTE:

Profa. Dra. LEONILDA MARIA BARBOSA DOS SANTOS.....

Trabalho realizado com apoio recebido do **CAPES** através
de concessão de bolsa de mestrado
e do **LABORATÓRIO de INVESTIGAÇÕES DIAGNÓSTICAS(LID)** através do
uso do Laboratório e Materiais

Ao meu filho Gabriel,
razão do meu viver,
meu tesouro.

Ao meu marido Henrique,
por ser do jeito que é.

Ao meu falecido pai Orseu,
e minha mãe Esther,
pelo amor incondicional.

A todos que estiveram
presentes neste caminho,
especialmente Dr. Morton
e Dra. Leonilda.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Morton A. Scheinberg, pela orientação desta tese, e de minha vida profissional.
- À Dra. Leonilda M. B. Santos, pelo apoio nestes anos de estudo nesta Universidade.
- À Sueli B. Maciel, Carolina, Lourdes e Celia Regina Pavan pelo auxílio no laboratório.
- A Dra. Júlia Tizue Fukushima pelo auxílio na análise estatística.
- À Lourdes, Secretária da Pós-Graduação, pelo auxílio enestimavel em todo processo administrativo dentro da Universidade.
- À Margarete B. Oliveira dos Santos e ao Fernando Arakaki pelas dicas no uso dos programas de computador, e pela paciência em minhas frequentes chamadas.
- Ao Terry Esko Micael Murto e Pedro Luiz Ribeiro pela habilidade e conhecimento em informatica e pelo bom humor, sem os quais eu não superaria as deficiências de meu computador.
- À CAPES agradeço pela concessão de bolsa de mestrado.
- Ao Laboratório de Investigação Diagnóstica (LID) agradeço a gentileza da diretoria no uso de materiais e area física

ÍNDICE:

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4. RESULTADOS.....	20
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES.....	40
7.REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
8. APÊNDICE.....	47

RESUMO

Evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que interleucinas proinflamatórias ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8) são as mais importantes mediadoras na patogênese da Síndrome Séptica. Elas levam às flutuações de glóbulos brancos, elevações de proteínas de fase aguda como PCR e consequentemente a alteração na viscosidade das hemácias(VHS).

Uma vez que estes marcadores apresentam comportamento variável em diversos estados clínicos de processos inflamatórios no homem, novos marcadores como a Procalcitonina(PCT) foram sendo descobertos. A PCT é um polipeptídeo de 116 aminoácidos e 13 kDa, é um precursor da calcitonina sem atividade hormonal. Em nosso estudo avaliamos os níveis de PCT, PCR, VHS e contagem do número de glóbulos brancos em 22 pacientes infectados, 12 portadores de infecção severa generalizada(Grupo I) e 10 portadores de patologias crônicas e infecções localizadas(Grupo II). Os resultados destes pacientes foram comparados aos resultados obtidos em indivíduos sadios do grupo controle.

A Procalcitonina mostrou-se útil em diferenciar os grupos estudados de forma significativa ao contrário dos outros elementos que se mostraram inespecíficos.

SUMMARY

Clinical and experimental evidence have demonstrated that proinflammatory interleukines (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) are the most important mediators in the pathogenesis of the Sepsis Syndrome. They lead to the fluctuation of the white blood cells, a rise in the acute phase proteins as CRP, and of consequence, the alteration in the viscosity of the blood leading to disturbance in the velocity of sedimentation (ESR).

One of the new markers showing variation in several clinic conditions is Procalcitonin (PCT). The PCT is a polypeptide of 116 aminoacids and 13kDa, it is a precursor of Calcitonin without hormonal activity. In our study we have evaluated the level of PCT, CRP, ESR, and enumerated the number of whiteblood cells in 22 infected patients, 12 with severe generalized infection (Sepsis)(Group I) and 10 with cronic pathologies and localized infections. The results obtained in healthy individuals of the control group were compared with the ill patients.

The Procalcitonin (PCT) was shown to be useful to differentiate the groups studied in a statistic significant way, contrary to the others markers of inflammation described so far that are non specific.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANCA	-Anticorpo anti neutrófilo
IFN	-Interferon
IL-1	-Interleucina 1
IL-2	-Interleucina 2
IL-6	-Interleucina 6
IL-8	-Interleucina 8
LTs	-Leucotrienos
PAF	-Fator Ativador de Plaquetas
PCR	-Proteína -C reativa
PCT	-Procalcitonina
PG _s	-Prostaglandinas
SIRS	-Síndrome de Resposta Inflamatória Aguda
TGF	-Fator de Transformação de Crescimento
TNF	-Fator de Necrose Tumoral
VHS	-Velocidade de Hemossedimentação

1.INTRODUÇÃO

1.1. A Resposta Inflamatória Aguda

A inflamação aguda é uma resposta fisiológica a traumas ou infecções que ocorrem em organismos normais. Pode ser dividida em duas fases. A resposta localizada, envolvendo coagulação, produção de cininas, metabolismo de fosfolípides com vaso dilatação e migração celular; e a resposta sistêmica que inclui febre, leucocitose, e o aumento da concentração plasmática de proteínas derivadas dos hepatócitos. (STADNYK & GAULDIE, 1991) Seja um agente infeccioso ou um trauma, o evento inflamatório agudo, ao nível celular, é totalmente dependente da presença do neutrófilo levando e/ou mediando a injúria tissular.

Independente do evento inicial, habitualmente a evolução do processo patológico está associada à habilidade do neutrófilo de liberar diversas substâncias capazes de destruir células normais. Embora inicialmente atuando contra microorganismos, o neutrófilo não tem capacidade de distinguir o que é próprio do organismo ("self") do que não é próprio (não "self"), dependendo de outros elementos do sistema imune para atuar no tecido alvo (anticorpos, complemento, citocinas). Se tecidos próprios são inadequadamente identificados, haverá uma resposta autóloga gerando doença autoimune. (PROUD & KAPLAN, 1988)

O neutrófilo provoca inflamação aguda através de dois componentes: a membrana plasmática e os grânulos intracelulares. Na membrana celular o sistema NADPH oxidase se envolve a capacidade de liberar radicais livres, enquanto os grânulos intracelulares são liberados através de mecanismos de

ativação celular envolvendo sinais pró-inflamatórios. Os eventos mais tardios, após ativação, envolvem a fusão dos grânulos com a membrana plasmática liberando seu conteúdo no meio extracelular e no vacuolo fagocítico (ROITT et al, 1999).

Finalmente deve-se mencionar que os mecanismos de atividade inflamatória não degradam os tecidos de forma contínua, existindo um sistema de antiproteínases capaz de atuar como inibidor deste processo e cuja a eficiência de atuação depende da intensidade da presença de um meio oxidante. Estes antioxidantes atenuam a intensidade da resposta inflamatória aguda quando o hospedeiro não consegue fazê-lo de forma mais eficaz. (Figura 1)

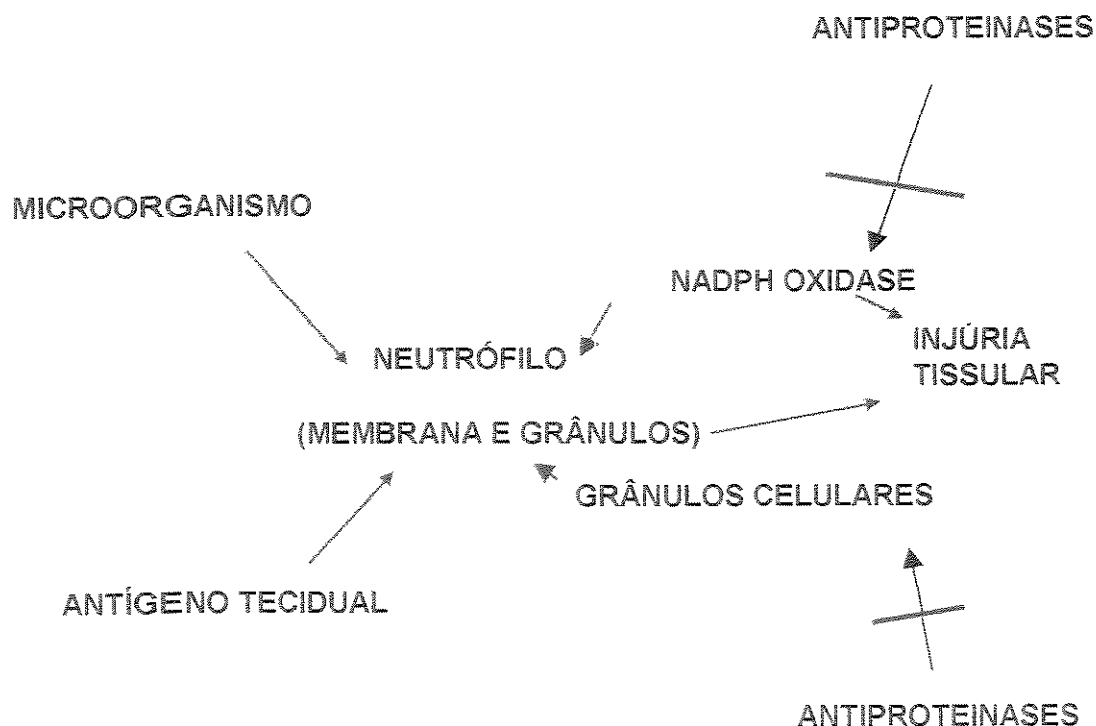


Figura 1- Representação esquemática do que ocorre na Resposta Inflamatória Aguda.

1.2. Mediadores da Inflamação na Sepsis.

Evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que as citocinas proinflamatórias, Fator de Necrose Tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e Interleucina -1 beta ($\text{IL-1}\beta$), são as mais importantes mediadoras na patogênese da Síndrome Séptica e do Choque Séptico (CALANDRA, et al., 1990)

A Interleucina-6 (IL-6) sugere ser um marcador da presença da atividade de mediadores proinflamatórios (FISHER, et al., 1991; RITALA et al., 1995), suas ações podem ser bem visualizadas na Figura- 2; enquanto a Interleucina-8 (IL-8) aparentemente faz parte na ativação neutrofílica. (VAN ZEE et al., 1991)

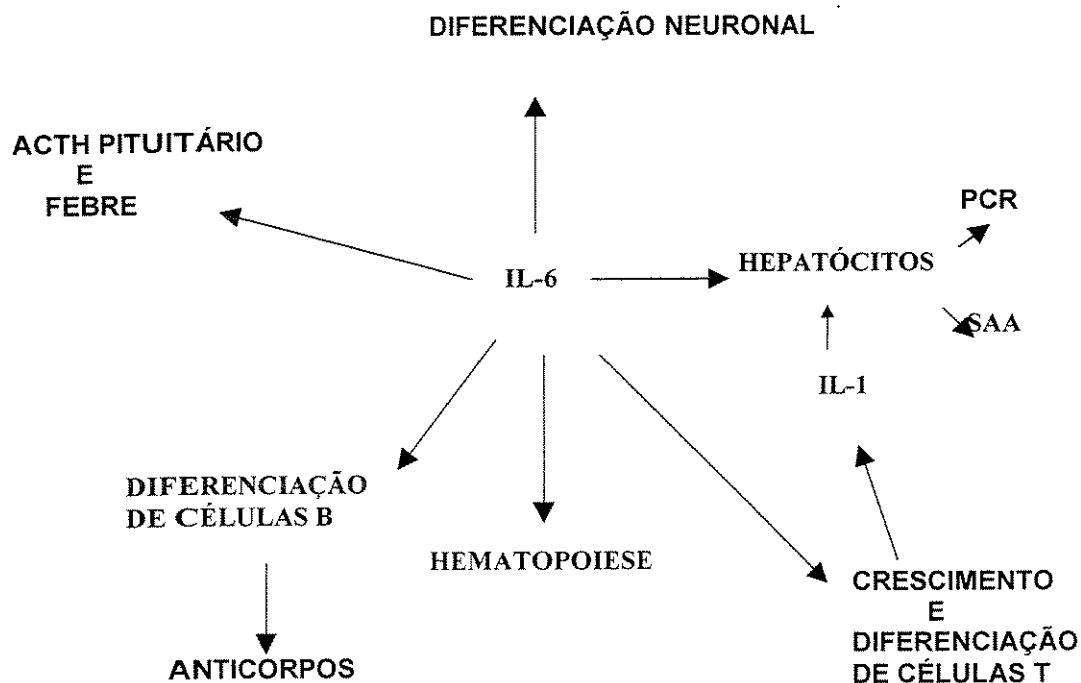


Figura-2 Ações pluripotenciais da Interleucina - 6 (adaptado de ROITT et al)

A presença de bacteremia ou endotexemia pode desencadear a produção de uma cascata de mediadores endógenos. Componentes celulares bacterianos, como endotoxinas, ácido teicoico, entre outros, ou mesmo exotoxinas liberadas, iniciam uma resposta inflamatória sistêmica no hospedeiro.

Macrófagos teciduais e monócitos circulantes no sangue são células importantes neste processo, geralmente surgem em maior quantidade após as primeiras horas, fazem parte das células que são responsáveis pela apresentação do antígeno aos linfócitos T CD₄, liberam uma série de importantes interleucinas (FISHER, C.J. & ZHENG, Y., 1996) e ainda, enviam sinais que auxiliam a desencadear uma cascata de acontecimentos que pode levar ao dano tecidual, falência de múltiplos órgãos e até a própria morte do indivíduo.

Observe-se na Figura-3 todo o processo descrito e ainda que os mediadores primários estimulam a cascata de mediadores secundários incluindo derivados do ácido araquidônico como a prostaglandina I₂ (PGI₂), tromboxane A₂, PGE₂, fator de ativação de plaquetas (PAF), bradicinina, histamina, serotonina e complemento.

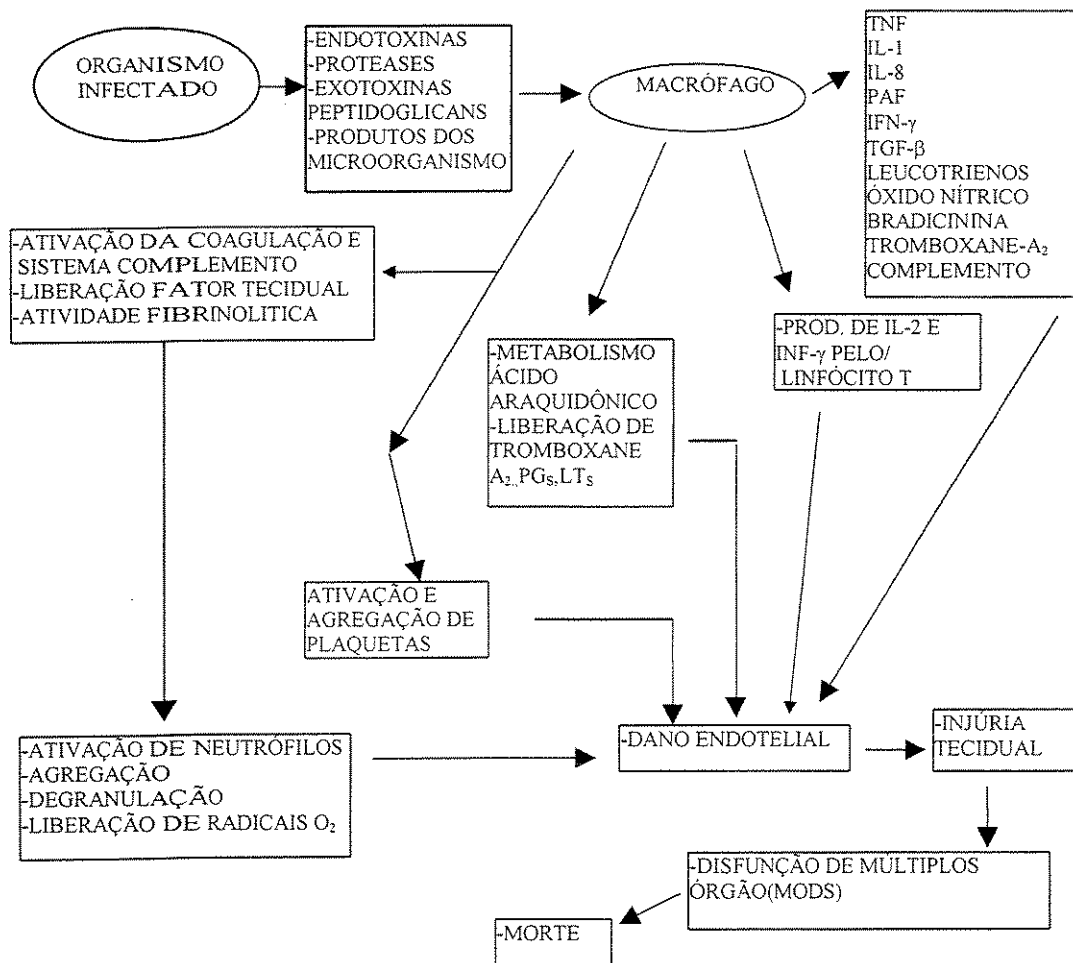


Figura-3 Rede de mediadores inflamatórios em sepsis (adaptado de FISHER et al)

A sepsis pode ser traduzida como uma perda da regulação nestas moléculas mensageiras e uma vez iniciada, pode se auto perpetuar independentemente da infecção original. O tempo de aparecimento no plasma de TNF- α e IL-1 β após administração de endotoxinas de *Escherichia coli* é bem precoce(ADI et al.,1992), enquanto a concentração de IL-6 e IL-8 é tardia (MICHIE, et al.,1988).

Existem evidências de liberação do Óxido Nítrico em sepsis, possivelmente participando das alterações vasculares durante a endotoxemia (SCHLAG et al., 1996); apesar de que durante traumas não se observou a formação de altos níveis de Nitrito/nitrato.

1.3. Marcadores séricos da Inflamação Aguda

O processo de inflamação aguda invariavelmente está associado a uma série de eventos que levam a flutuações nos glóbulos brancos circulantes e a síntese pelo hepatócito de proteínas também conhecidas como proteínas de fase aguda; estas moléculas são importantes na medida em que limitam a inflamação e possivelmente regulam a resposta imune. Os mecanismos associados à síntese destas proteínas envolvem a participação de interleucinas em particular a Interleucina-1 (IL-1) e a Interleucina-6 (IL-6) (Figura-4). O efeito das citocinas parece ocorrer ao nível de expressão gênica e síntese protéica. IL-1 e IL-6 atuam sobre alguns genes (por exemplo α_1 glico proteína ácida) de forma sinérgica, porém podem atuar de forma inibidora sobre outros genes (STADNYK, A. & GAULDINIE, J., 1991). Na Figura-4 mostramos as possíveis interações que podem ocorrer entre a injúria tissular e o aparecimento no soro de concentrações elevadas das proteínas de fase aguda.

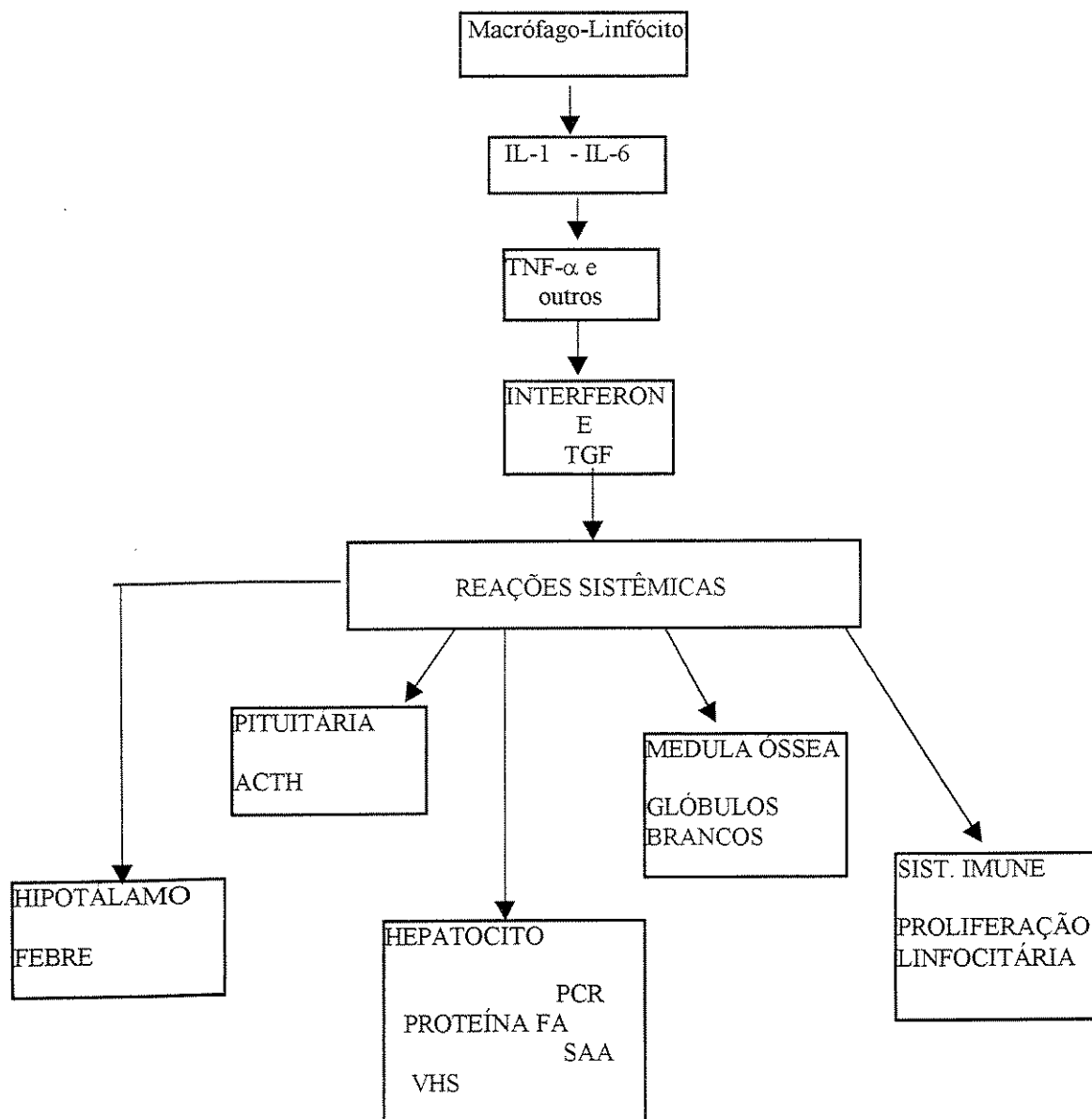


Figura 4- Reação de Fase Aguda

A Proteína C-Reativa (PCR) além de ser a primeira a aparecer após o estímulo inflamatório, o faz em quantidades elevadas, algumas vezes de 100 à 1000 vezes maior de que os níveis basais normalmente encontrados. Após vinte e quatro horas é que se começam a observar alterações na hemossedimentação e também viscosidade plasmática. (BULL et al, 1988) Os níveis séricos de PCR elevam-se frequentemente em infecções bacterianas e com menor freqüência em infecções virais (GUSSENTI et al, 1989). Em certas inflamações crônicas a quantificação de Proteína C-Reativa correlaciona-se com o grau de atividade da doença. Uma hierarquia sobre os níveis destas proteínas pode ser observada na Figura-5.

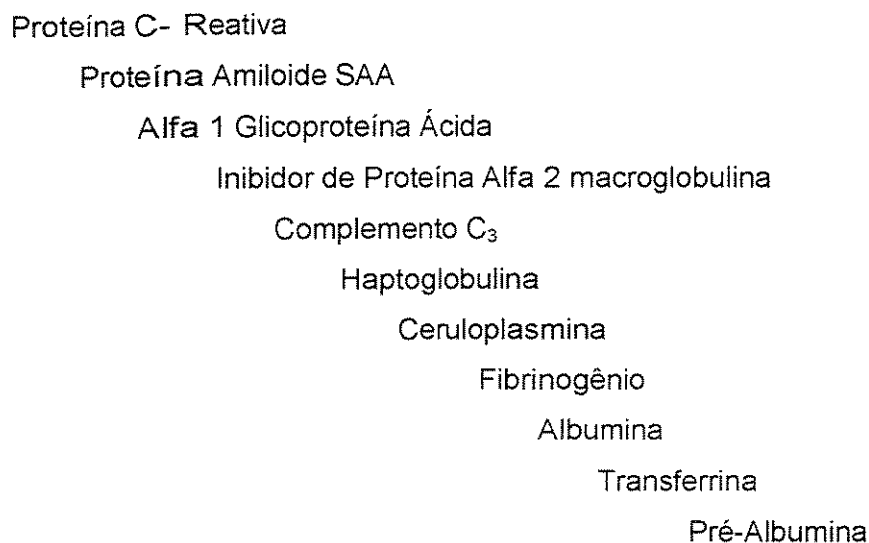


Figura 5-Gradiente de flutuação das proteínas da fase aguda após estímulo.

A proteína amilóide SAA é também um sensível marcador de inflamação aguda, podendo atingir níveis elevados na circulação sanguínea (SCHEINBERG, 1983). Tanto no caso da Proteína C-Reativa como no da

proteína amilóide SAA ocorrem simultaneamente à liberação de interleucinas(GANAPATHI et al, 1988). Na circulação, a proteína amilóide SAA encontra-se ligada a lipoproteínas de alta densidade. A forma clínica da doença amilóide do tipo secundário é composta de depósitos de SAA, não havendo correlação com os níveis séricos de SAA ou a intensidade do estímulo inflamatório no grau de atividade da doença(SCHEIBERG et al, 1996).

A velocidade de hemossedimentação, que mede a velocidade com que as hemácias se sedimentam, sofre a influência da concentração destas proteínas e conseqüentemente apresenta uma correlação importante com o grau de atividade inflamatória. A velocidade de hemossedimentação é útil na avaliação das formas mais crônicas de inflamação(KATZ et al, 1990). Nem a hemossedimentação nem as proteínas de fase aguda refletem com precisão a presença de infecção associada à inflamação e ou a inflamação isoladamente; isto nos levanta a possibilidade de estudar e partir à procura de novos marcadores.

1.4. A Procalcitonina(PCT)

Uma vez que os marcadores séricos de inflamação apresentam comportamentos variáveis em diversos estados clínicos de processos inflamatórios no homem, a procura de novas substâncias que pudessem refletir este cenário continua sendo um elemento importante de investigação clínica.

Em experimentos descritos em 1989 (GUILANI et al., 1989) foi possível demonstrar que certas infecções bacterianas levam ao aparecimento no soro de precursores da calcitonina na ausência do hormônio maduro e ativo. Este precursor conhecido como procalcitonina passou a ser visto como um marcador em potencial de atividade inflamatória em humanos (BRUNKHORST et al., 1996). A procalcitonina é um polipeptídio que possui 116 aminoácidos, e peso molecular de 13 kDa, (SNIDER et al., 1997). É um prohormônio precursor da calcitonina, sem atividade hormonal, que após clivagem por protease específica dá origem a três moléculas conhecidas como aminoprocitonina, calcitonina imatura e um peptídeo de 21 aminoácidos conhecido como Katalcicina(LE MOULLEC et al., 1984).

Em contraste à pequena meia vida da calcitonina que é de 10 minutos, a procalcitonina tem meia vida longa de 25 à 30 horas(MEISNER, 1996). E em indivíduos sadios os seus níveis são indetectáveis ou inferiores a 0,1 ng/ml(KARZAI et al., 1997). Os primeiros relatos da eventual utilização da PCT como marcador de atividade inflamatória surgiram em 1993 (ASSICOT et al., 1993), em estudos realizados em crianças hospitalizadas em terapia intensiva. Os resultados deste estudo mostraram de forma inequívoca que a procalcitonina encontrava-se elevada em crianças com septicemia e sua regressão após tratamento com antibioticoterapia específica. Crianças com infecções limitadas apresentavam valores substancialmente mais baixos de

PCT no soro. Estudos subsequentes utilizando protocolos semelhantes confirmaram estas observações(CHIESA et al., 1998; GENDREL et al.,1997), e o que se pode sugerir destes estudos é que a infecção bacteriana severa é a que parece levar a níveis substancialmente elevados de Procalcitonina.

Em patologias autoimunes habitualmente os marcadores convencionais parecem não diferenciar inflamação de infecção, situação clínica importante, visto que estes pacientes, ao utilizarem medicação imunossupressora, passam a se expor a processos infecciosos importantes onde o diagnóstico precoce pode ser vital. EBERHARD et al.(1997) estudaram este grupo de pacientes portadores de Lupus Eritematoso Sistêmico e Vasculites associados à presença de anticorpo citoplasmático anti-neutrófilos (ANCA) em presença ou não de infecção sistêmica generalizada. Foram realizadas dosagens de Procalcitonina, IL-6, Proteína C-Reativa e Neopterina. Como resultado observaram que os pacientes portadores de doenças autoimunes em vários graus de atividade inflamatória e sem sinais e sintomas de infecção bacteriana não apresentaram elevação dos níveis séricos de PCT, ao contrário dos que apresentaram quadros infecciosos sistêmicos; por outro lado todos os outros marcadores referidos estavam aumentados em ambos os grupos, infectados ou não, de forma não específica.

1.5.Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica(SIRS) e Sepsis.

SIRS pode ser definida como uma síndrome clínica cujo diagnóstico diferencial inclui infecções bem como um grande número de processos não infecciosos como traumas, queimaduras, extensas cirurgias, pancreatite aguda entre outros. Sepsis é resultado de uma infecção (invasão de um

microorganismo ou de suas toxinas) que evolui para uma resposta sistêmica do hospedeiro.(NATENS et al., 1996).

Na prática médica SIRS e SIRS/Sépsis apresentam-se sob a forma de um grave quadro clínico cuja evolução pode levar ao choque e à morte. No intuito de conceituar em uma linguagem universal os termos mais frequentemente utilizados, o Colégio Americano de Médicos Intensivistas e especialistas em tórax reuniram-se (1991) e convencionaram que para o diagnóstico se SIRS/Sepsis seriam necessários dois de quatro critérios descritos a seguir: a temperatura do paciente deve ser maior que 38°C ou menor que 36°C, os batimentos cardíacos superiores a 90 batimentos /minuto, a frequência respiratória maior que 20 movimentos por minuto ou a PaCO₂ menor que 32mmHg, e, finalmente, que a contagem total de Glóbulos Brancos deva ser menor que 4.000 mm³ ou maior que 12.000 mm³. Existem graus de severidade para cada caso, em casos graves usam-se os termos Sepsis Severa, quando existe disfunção de múltiplos órgãos, ou Choque Séptico quando existe a necessidade do uso de medicamentos inotrópicos para manter a pressão arterial média, pois não há resposta apenas ao volume empregado.

Estudos têm demonstrado que a bacteremia gram negativa ocorre em aproximadamente 30 % de pacientes em SIRS/Sepsis(BONE, 1995); endotoxina, especialmente LPS (componente da parede celular de bactérias gram negativas) é responsável por muitas das manifestações sistêmicas severas encontradas. Endotoxinas produzidas por bactérias gram negativas foram injetadas em voluntários humanos saudáveis(DANDONA, P et al, 1994) Várias amostras de sangue foram colhidas de cada indivíduo; antes e após a 1ª, 2ª, 4ª, 6ª, 8ª e 24ª hora. Foram quantificados concentrações de procalcitonina, Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF α), e Interleucina 6 (IL-6). Os resultados mostraram que os níveis de TNF α subiram rapidamente

desde a primeira hora, com pico em noventa minutos e voltando a valores próximos ao normal na sexta hora; IL-6 apresentou um aumento mais gradual, com valores picos em três horas e normais em oito horas. A concentração de procalcitonina era indetectável no início do estudo. Em 4 horas passou a poder ser observada, apresentou pico em 6 horas e platô entre a 8ª e a 24ª hora; não houve aumento na produção de calcitonina. Pode ser concluído que as endotoxinas induzem ao aumento de procalcitonina sistematicamente e esta deve ser a razão do aumento deste prohormônio nas septicemias.

2. OBJETIVOS

2.1. Determinar se os marcadores laboratoriais convencionais de infecção distinguem os pacientes definidos como cronicamente doentes e portadores de infecções localizadas, daqueles pacientes que são portadores de infecção severa generalizada

2.2. Avaliar se o novo marcador laboratorial de infecção Procalcitonina é capaz de distinguir as duas entidades clínicas mencionadas.

2.3. Comparar os marcadores convencionais com a Procalcitonina no mesmo cenário clínico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1 População de pacientes

Foram estudados 22 pacientes, 12 do sexo feminino e 10 do sexo masculino; com idades variando entre 45 e 89 anos, admitidos em Unidade de Terapia Intensiva.

Os pacientes foram caracterizados em dois grupo. O Grupo I, constituído-se de 12 pacientes portadores de infecção severa generalizada (SIRS/Sepsis), e o Grupo II, constituído-se de 10 pacientes portadores de doenças crônicas como Diabetes Melitus, Acidente Vascular Cerebral, Insuficiência Renal, Cirrose Hepática, Neoplasias entre outras, que desenvolveram SIRS e infecções localizadas. Na Tabela I é apresentada a relação de todos os pacientes estudados com a idade, sexo, e os diagnósticos das patologias desenvolvidas. Quando os agentes infecciosos puderam ser obtidos em cultura, foram adequadamente citados.

3.1.2. População Controle.

Foram utilizados neste estudo o sangue e o soro de vinte e cinco indivíduos saudáveis doadores de banco de sangue.

TABELA I - Relação de todos os pacientes estudados.

NOME	Id.	SEXO	DIAGNÓSTICO	OUTROS
K.H.S	66	M	Tumor de bexiga, Metástase Pulmonar, Broncopneumonia, Infecção do Trato Urinário.	Streptococos, Enterococcus Fecalis
F..M.	75	M	Broncopneumonia, Insuficiência Respiratória.	Pseudomonas no Escarro
Z B M D	55	F	Infarto Agudo Miocardio, Coma, Broncopneumonia.	Pseudomonas
Y. S.R.	53	F	Broncopneumonia	Pseudomonas Multi-resistente ,s/Antibiótico
L. P. O .	69	F	Alzheimer, Infecção Pulmonar.	
R.M.S.	59	F	Pós operatório Estenose Aortica, Choque, Bronco-pneumonia.	
A .S.	59	M	Endocardite, Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico, Coma.	Em uso de vários antibióticos diferentes
O . R.	61	M	Acidente Vascular Cerebral, Insuf. Renal, Infecção Pulmonar	Staphilococos no escarro, c/ Antibiótico.
C.S.	51	M	Hemi-colectomia grave, Infecção Pulmonar. Febril	Enterobacter c/ Antibiótico
D. G. B.	72	F	Hemi-colectomia, Infecção Pulmonar,	Pseudomonas
B. G. G.	81	M	Diabetes Melitus, Insuficiência Renal Aguda, Infecção Renal	Pseudomonas Multi-Resistente.
B.F.F.	87	F	Trombose Venosa Profunda, Embolia Pulmonar, Infecção pulmonar	
M.L.M.	84	F	Cirrose, Insuficiência Hepática, Infecção .	Líquido Peritonial Bukholderia sp.
R P S F	45	M	Cirrose, Insuficiência Renal Crônica, Infecção Pulmonar.	Mal Estado Geral , Melena.
M.I.S.M.	55	F	Insuficiência Renal Cron. D. Melitus Descomp. Infecção renal	
A .S.B.	74	F	Acidente Vascular Cerebral , Choque.	Infecção de pele staphilococos
ERCM	89	F	Colecistite Aguda, derrame pleural.	Infecção localizada
J. M. V	81	F	Asmático , Broncopneumonia	Pseudomonas
Z.K.G.	55	M	Dermatopolimiosite, Infecção de pele Importante	
E.Z.J.	69	M	Fasciotomias Membro Inf. Esq., C/Infecção Purulenta Severa.	Staphilococos, Grave fez uso Papa de Hemac.
E.T.	63	M	Parada Cardio Respiratória.	Staphilococos em Secreção Traqueal.
N.P.L.	64	F	Acidente Vascular Cerebral . Escaras disseminadas.	Pseudomonas

3.2. Determinação da velocidade de hemossedimentação

A velocidade de hemossedimentação foi realizada pelo método de Westergreen. O sangue de pacientes e controles foi aspirado em um tubo a vácuo com EDTA. Colocou-se o sangue aspirado na marca superior do suporte e após exata uma hora foi realizada a leitura da coluna hemática. Como valor de referência, consideramos normal até 10 mm na primeira hora. Os materiais utilizados neste procedimento foram as pipetas de Westergreen e suporte para pipetas.

3.3. Contagem de glóbulos brancos

A contagem de glóbulos brancos foi realizada por método automático, pelo Coulter T 890, onde se utiliza sangue com EDTA, e a leitura é feita por métodos eletrônicos.

3.4. Determinação da quantificação de Proteína C- Reativa

A dosagem de proteína C-reativa foi realizada no soro dos pacientes e controles, após obtenção do sangue colhido em tubo seco e centrifugado 10 minutos a 1500 rpm.

Utilizada técnica quantitativa, com amostras à temperatura ambiente (15°C-25°C). Em uma placa de vidro com fundo escuro colocam-se em campos distintos, 50 µl da amostra do paciente, 50µl de soro controle positivo, e 50µl de soro controle negativo; adicionam-se 50µl da solução de absorção junto às amostras e controles; com um palito mesclador

descartável faz-se uma solução uniforme e imprimem-se movimentos rotatórios. Dispara-se o cronômetro por 2 minutos, observa-se se houve a ocorrência de aglutinação. Em casos positivos, titulam-se os soros através de uma série de diluições. O reagente utilizado (Rapitex CRP) consiste de partículas de poliestireno sensibilizadas com uma gama globulina específica anti-Proteína-C Reativa, em uma concentração de aproximadamente 6mg/l. Assim sendo, ao se obterem reações positivas de aglutinação em diluições, cujos títulos sejam de $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, estamos obtendo as concentrações de 12mg/l, 24mg/l, 48mg/l, 96mg/l, 192mg/l de Proteína C-Reativa no soro do paciente.

3.5. Quantificação dos níveis de Procalcitonina

A procalcitonina foi medida por ensaio imunoluminométrico com reativos obtidos da B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH. Dois anticorpos monoclonais antígeno específicos que se ligam à procalcitonina (o antígeno) em dois diferentes sítios de ligação, o da Katalcalcina (na sequência de aminoácidos entre 96 a 106) e o da Calcitonina são colocados em excesso. Um dos anticorpos descritos é luminescente, conhecido como o marcador ("Tracer"), e o outro é fixado na porção interna dos tubos . Durante período de incubação, ambos os anticorpos reagem com as moléculas de procalcitonina da amostra para formar um complexo conhecido como "sanduíche". Como resultado o anticorpo com atividade luminescente se liga à superfície interna do tubo. Finda a reação o excesso do marcador é completamente removido do tubo. Então, o que ficou do marcador nas paredes do tubo de teste foi quantificado pela medida do sinal luminescente automaticamente através de um aparelho luminométrico e dos reagentes do kit básico do LUMItest. A intensidade do sinal luminescente é diretamente

proporcional à concentração de Procalcitonina da amostra e a leitura final feita no luminômetro de marca MGM Instruments Inc., modelo Optocomp II, série 121043 (New Haven- USA).

Na realização deste experimento é importante observar que os tubos de reagentes e soros estejam em temperatura ambiente; os calibradores, controles, o marcador e a solução de lavagem devam estar reconstituídos; os tubos devem ser protegidos da luz durante a incubação.

Indivíduos normais apresentam concentrações de Procalcitonina menores de 0,5 ng/ml. A padronização de uma curva de dose clássica pode ser vista no apêndice.

3.5. Análise estatística

A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Estes testes não paramétricos foram escolhidos devido ao fato de que os valores encontrados não apresentavam distribuição normal em curva de Gauss.

4. RESULTADOS

Todos os resultados encontrados nas quantificações de PCT e PCR, na contagem total de glóbulos brancos e na verificação do VHS podem ser observadas e individualizadas nos diferentes grupos.

Na Tabela- II estão discriminados os valores encontrados para o grupo I, constituído de pacientes em SIRS/Sepsis. Observe-se que os valores da dosagem quantitativa de Proteína C- reativa estão muito aumentados, nenhum destes pacientes apresentou valores próximos ao normal que é de 6 mg/l; 5 de 12 pacientes apresentaram 96mg/l, 4 pacientes chegaram ao valor de 192mg/l,o máximo encontrado foi de 384mg/l.Quanto aos valores de velocidade de hemossedimentação, nota-se que existe uma grande variação. Mais da metade dos pacientes (7 indivíduos) deste grupo exibem valores entre 15 e 34 mm; existem 3 pacientes na faixa de 100mm, este é considerado um valor alto na prática clínica. Os valores da contagem de glóbulos brancos apresentam desde um caso de leucopenia de 900 por mm^3 até dois casos com leucocitose acima de 20.000 glóbulos brancos por mm^3 ; a maior parte dos pacientes apresentam números elevados, porém na faixa de 10.000 à 15.000 glóbulos brancos por mm^3 .Os valores de Procalcitonina quantificados neste grupo estão todos acima do normal de 0,5ng/ml; nota-se que são valores muito elevados com casos de 68,8ng/ml, 174ng/ml e o máximo de 207ng/ml.

Na Tabela-III encontram-se os pacientes do grupo II, portadores de patologias crônicas e infecções localizadas. A quantificação de Proteína C-reativa neste grupo, apesar de apresentar um valor de 192mg/l , revela alguns casos dentro da normalidade(3 pacientes); metade dos pacientes apresentam valores aumentados entre 48mg/l e 96mg/l.Quanto aos valores

na mensuração da velocidade de hemossedimentação, nota-se que estão também aumentados, com apenas um valor exorbitante de 107 mm, a metade dos pacientes encontra-se na faixa de 30 à 50 mm na primeira hora. Não se observa leucopenia neste grupo e apenas um valor de 23.900mm^3 , 3 pacientes apresentam valores dentro do normal considerado de 5.000 à 10.000 glóbulos brancos por mm^3 , mais da metade dos pacientes deste grupo apresentam discreta leucocitose.

Os resultados encontrados no grupo controle estão na Tabela IV, trata-se de indivíduos sãos e que portanto apresentam a maior parte dos valores dentro da normalidade.

As comparações entre os diferentes grupos e os valores encontrados de PCR, VHS, número de glóbulos brancos e PCT serão apresentados a seguir

TABELA II-PACIENTES DO GRUPO I (PORTADORES DE SIRS /SEPSIS)

PACIENTES	P.C.R.(mg/l)	V.H.S.(mm)	P.C.T.(ng/ml)	GLOB. BR./mm ³
K.H.S.	192	120	12,8	13.000
F.M.	96	15	12,9	12.100
Z.B.M.D.	48	65	174,5	13.100
Y.S.R.	96	95	207,0	15.500
A.S.	96	34	16,1	23.300
R.M.S.	48	25	2,24	22.800
C.S.	192	127	1,29	7.800
D.G.B.	96	29	1,7	12.200
B.G.G.	192	22	4,1	5.200
R.P.S.F.	96	30	7,2	900
J.M.V.	192	32	68,8	8.900
E.Z.S.	384	100	66,0	10.900

TABELA-III- GRUPO II (PACIENTES PORTADORES DE PATOLOGIAS CRÔNICAS E INFECÇÕES LOCALIZADAS)

PACIENTES	P.C.R.(mg/l)	V.H.S.(mm)	P.C.T.(ng/ml)	GLOB. BR./mm ³
L.P.O.	48	33	0,03	16.000
O.R.	06	16	0,007	17.600
N.P.L.	96	29	1,7	12.200
B.F.F.	96	107	0,05	11.300
M.L.M.	48	80	0,6	19.000
A.S.B.	04	25	0,007	8.400
M.I.S.M.	04	50	0,2	12.400
E.R.C.M.	92	40	0,4	23.900
E.T.	192	50	0,01	9.700
Z.K.G.	24	10	0,03	8.000

TABELA-IV- GRUPO CONTROLE (INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS)

PACIENTES	P.C.R.(mg/l)	V.H.S.(mm)	P.C.T.(ng/ml)	GLOB. BR./mm³
1	3	10	0,11	5100
2	3	9	0,1	4.200
3	3	9	0,1	3.700
4	0	9	0,14	6.100
5	3	8	0,02	7.200
6	6	7	0,12	7.500
7	3	8	0,66	9.100
8	3	7	0,08	10.000
9	3	10	0,12	7.500
10	6	8	0,02	4.300
11	6	8	0	3.800
12	6	8	0,01	4.900
13	6	7	0,10	5.000
14	3	2	0,10	9.000
15	6	5	0	3.000
16	6	4	0,1	7.000
17	4	8	0,04	5.900
18	6	10	0,04	6.000
19	6	7	0	4.800
20	6	5	0,1	7.000
21	6	4	0,9	6.800
22	3	11	0,1	8.000
23	3	3	0,1	7.200
24	0	2	0,06	7.800
25	0	10	0	6.200

4.1.Valores quantificados de Proteína C-Reativa no soro dos pacientes dos grupos I, II e controle.

A Proteína C-Reativa (PCR) apresenta seus valores máximos de 394mg/l e 192mg/l; os valores mínimos de 48,0mg/l e 3mg/l respectivamente nos grupos I e II; a mediana e a média são de 96,0mg/l , 144,0mg/l no grupo I e 48,0mg/l , 60,8mg/l no grupo II .

Como não houve uma distribuição normal, nestes e nos outros parâmetros avaliados foi utilizado um teste não paramétrico chamado de Kruskal-Wallis, para indicar a presença de diferença entre os grupos estudados . Para complementar a análise foi utilizado o Teste de Dunn que discrimina os valores diferentes. Desta forma ao verificar a Tabela- V nota-se a letra A, indicando que o grupo de controle diferencia-se dos grupos I e II que receberam a letra B. Portanto, as semelhanças encontram-se nos grupos I e II. De acordo com os testes aplicados, podemos afirmar com significância estatística ($p<0,001$) que estes grupos são diferentes do controle e que consequentemente os grupos de doentes apresentam aumento significativo de Proteína C-Reativa, ao contrário do grupo de controle que se constitui de indivíduos sadios.

Na Figura-6 estão representados grupos I e II. 50% dos valores de PCR encontrados no grupo I, estão acima da mediana traçada em negrito. No Grupo II os valores médios e a mediana estão mais próximos e este fato pode ser observado na figura.

O grupo de controle apresenta todos os seus valores iguais ou abaixo de 6mg/l o que faz com que a média, a mediana e enfim todos os valores encontrados estejam muito próximos

A Proteína C- Reativa não diferencia os grupos de pacientes em SRIS/Sépsis dos com infecção localizada , embora seja capaz de diferenciar indivíduos doentes de saudáveis (grupo controle).

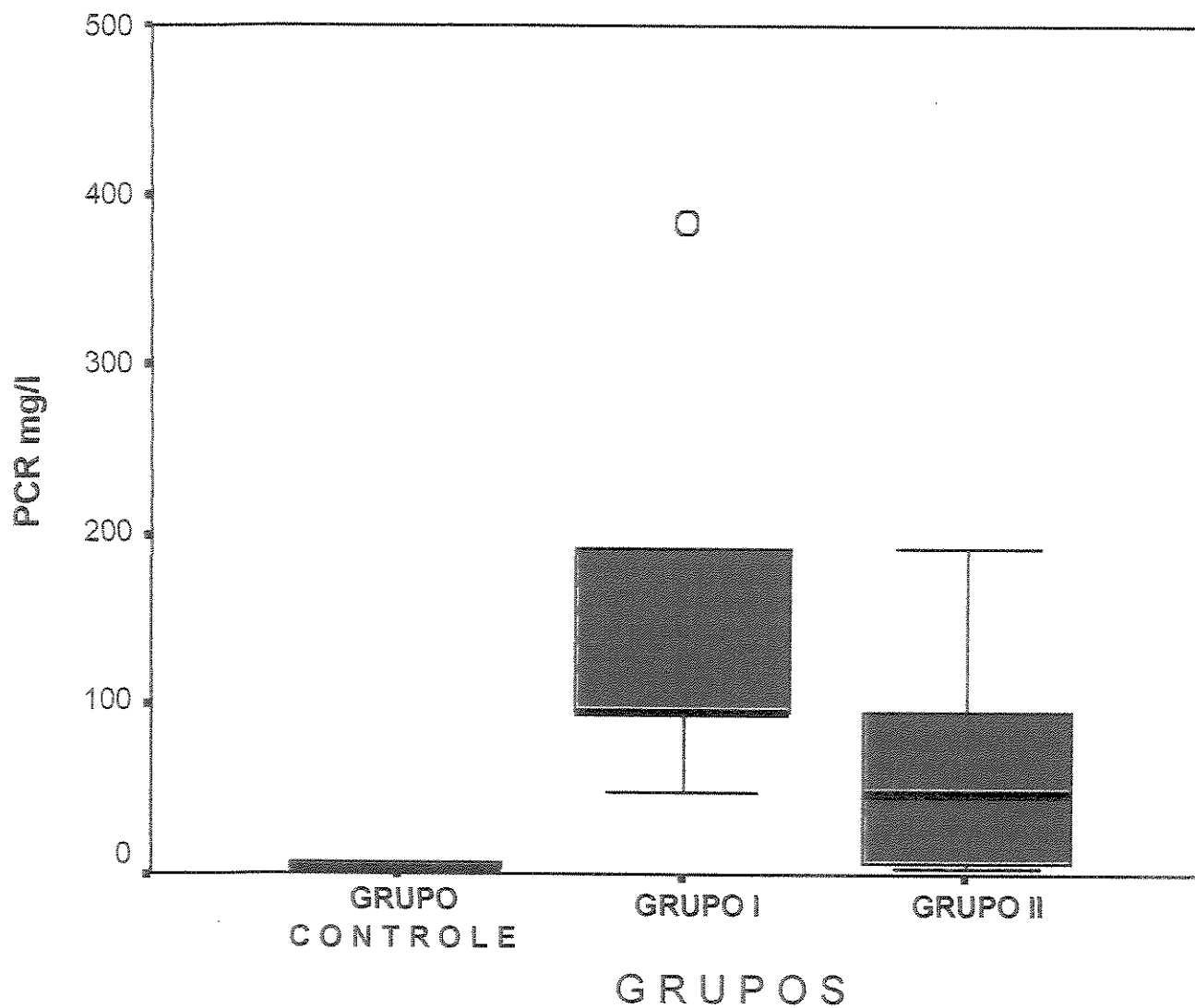


Figura 6 - Valores médios de Proteína C-Reativa (mg/l) quantificada no soro de pacientes dos Grupos I (Portadores de infecção severa-SIRS/Sépsis), II (portadores de patologias crônicas e infecções localizadas) e Controle (indivíduos normais).

4.2 Verificação da velocidade de hemossedimentação (VHS)

Os valores médios de VHS são altos e próximos nos grupos I e II, 56,17 mm e 44,00 mm respectivamente, diferentes da média de 7,16mm do grupo controle. O mesmo ocorre com a mediana de 33,0mm no grupo I, 36,5mm no grupo II e 8 mm no grupo controle. Consequentemente, temos que os valores máximos e mínimos encontrados para os grupos I e II também são próximos(Tabela-V). Todos os valores foram mensurados na 1^a hora.

O aumento na velocidade de hemossedimentação se deu nos grupos de doentes em sepsis ou com infecção localizada de forma semelhante. Este parâmetro não é capaz de diferenciá-los, embora os diferencie do grupo controle com significância estatística. No teste de Dunn ambos recebem a letra B, enquanto o grupo controle recebe a letra A; na Figura-7, observam-se graficamente os dados da Tabela-V e a expressão de todos os valores mencionados.

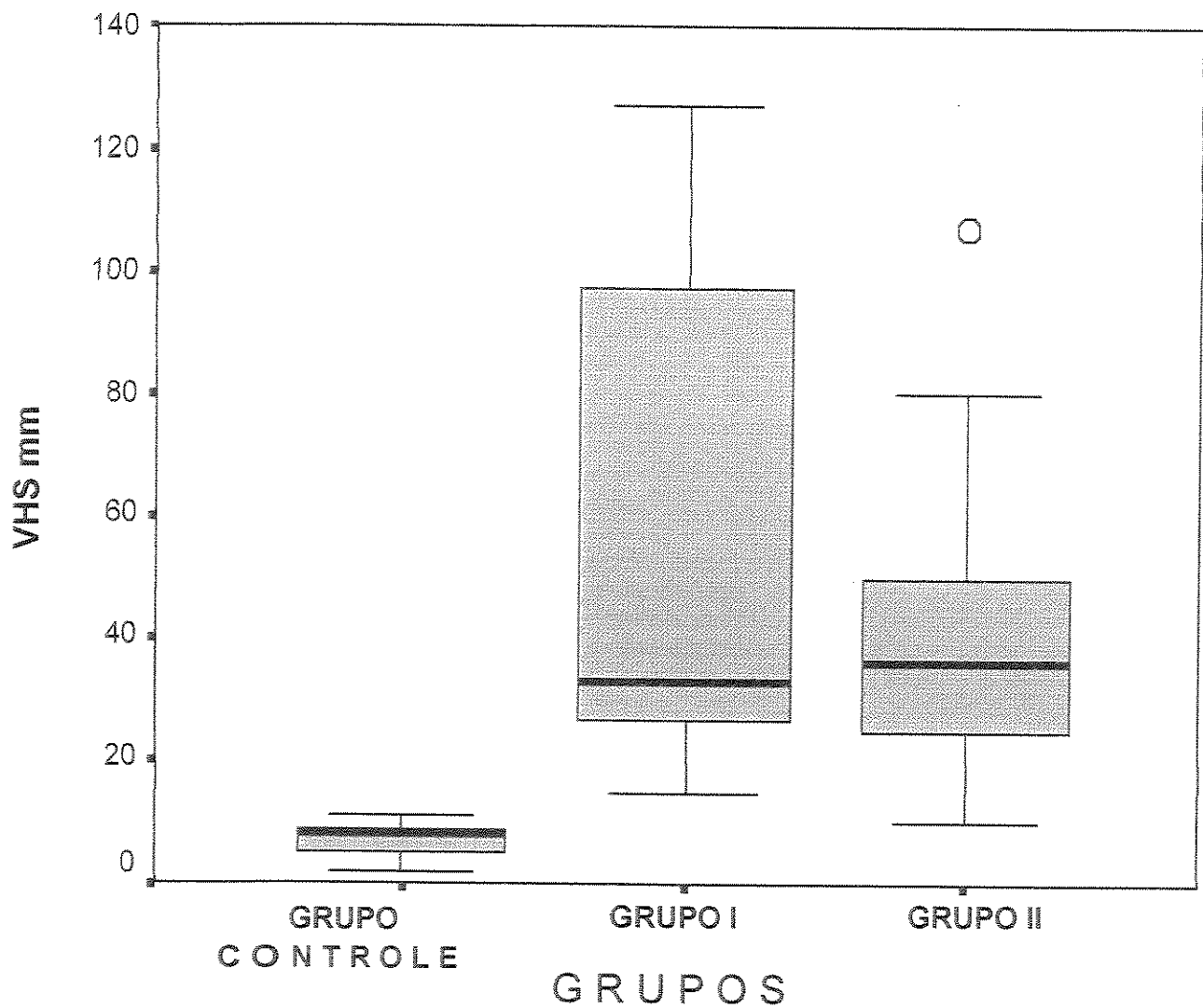


Figura 7 - Valores médios da Velocidade de Hemossedimentação(mm) nos Grupos I(Portadores de infecções severas generalizadas-SIRS/Sépsis), II(portadores de patologias crônicas e infecções localizadas) e Controle(indivíduos normais)

4.3. Avaliação dos valores encontrados na contagem total de Glóbulos Brancos

A contagem total de glóbulos brancos encontra-se dentro de valores estipulados como normais nos indivíduos do grupo controle.

Os valores máximos de contagem nos grupos I e II foram de 23.300 e 23.900 respectivamente. Valores mínimos de 12.150 no grupo I e de 12.300 no grupo II. Valores de média e mediana também muito próximos entre o grupo de doentes.

Contudo, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos($p= 0,045$). Na Figura-8 podem ser visualizados os grupos e o conjunto de valores encontrados agrupados em percentual da mesma forma que nas figuras anteriores.

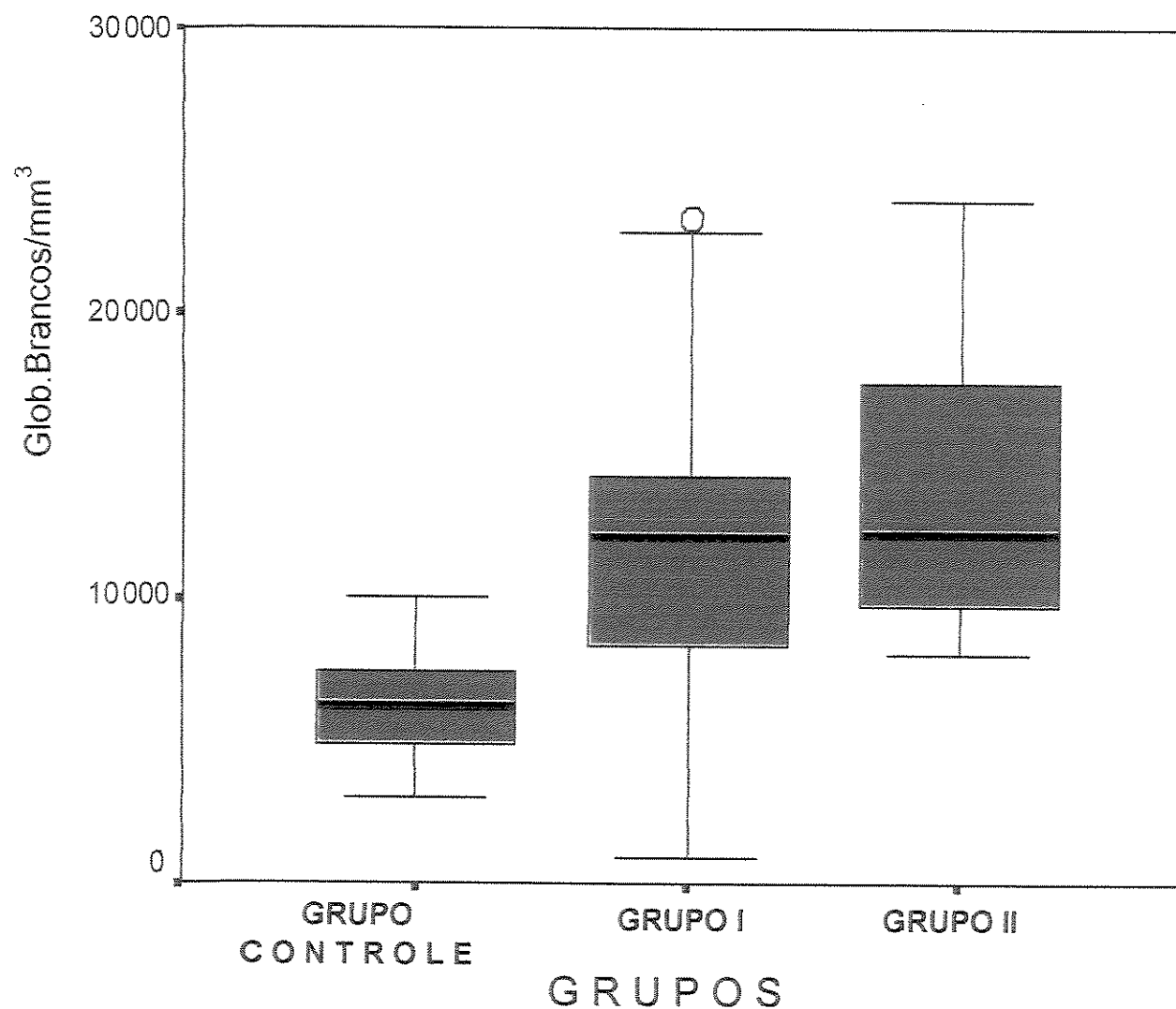


Figura 8 - Valores médios do número de Glóbulos Brancos nos Grupos I (Portadores de infecção severa generalizada-SIRS/Sépsis), II (portadores de patologias crônicas e infecções localizadas) e Controle (indivíduos normais)

4.4. Concentração de Procalcitonina no soro de pacientes dos grupos I, II e controle.

O grupo I, apresenta uma grande variação entre os valores mínimos e máximos de PCT (1,29ng/ml e 207,0ng/ml); a média é de 47,89ng/ml e a mediana 12,85ng/ml.

O grupo II apresenta o valor mínimo de 0,01ng/ml e o máximo de 1,7ng/ml, a média de 0,30ng/ml e a mediana de 0,04ng/ml. Considerando-se normais as quantificações inferiores a 0,5ng/ml, nota-se que não houve uma elevação expressiva neste grupo de pacientes portadores de patologias crônicas.

O grupo de indivíduos controle apresentou um único valor acima do normal sem nenhum significado estatístico.(0,9ng/ml).

A visualização destas informações pode ser obtida através das caixas de agrupamento de valores ou "Box plot" (Figura-9); a linha em negrito no interior do retângulo amarelo que representa o grupo I indica a mediana, no interior do retângulo estão os valores médios, abaixo e acima encontram-se 25% dos valores. Nota-se que os valores dos grupos II e controle são próximos e não chegam a ter uma expressão gráfica importante.

A procalcitonina consegue diferenciar o grupo de pacientes em SIRS/Sepsis (grupo I) do grupo de doentes portadores de infecção localizada (grupo II). Esta observação é muito importante. Notemos que foi o único marcador capaz de diferenciar o grupo I dos grupos II e controle, na Tabela V comprova-se a diferença pelas letras recebidas (grupo controle e grupo II apresentam a letra A, enquanto o grupo I recebeu a letra B, existe significância estatística com $p < 0,001$).

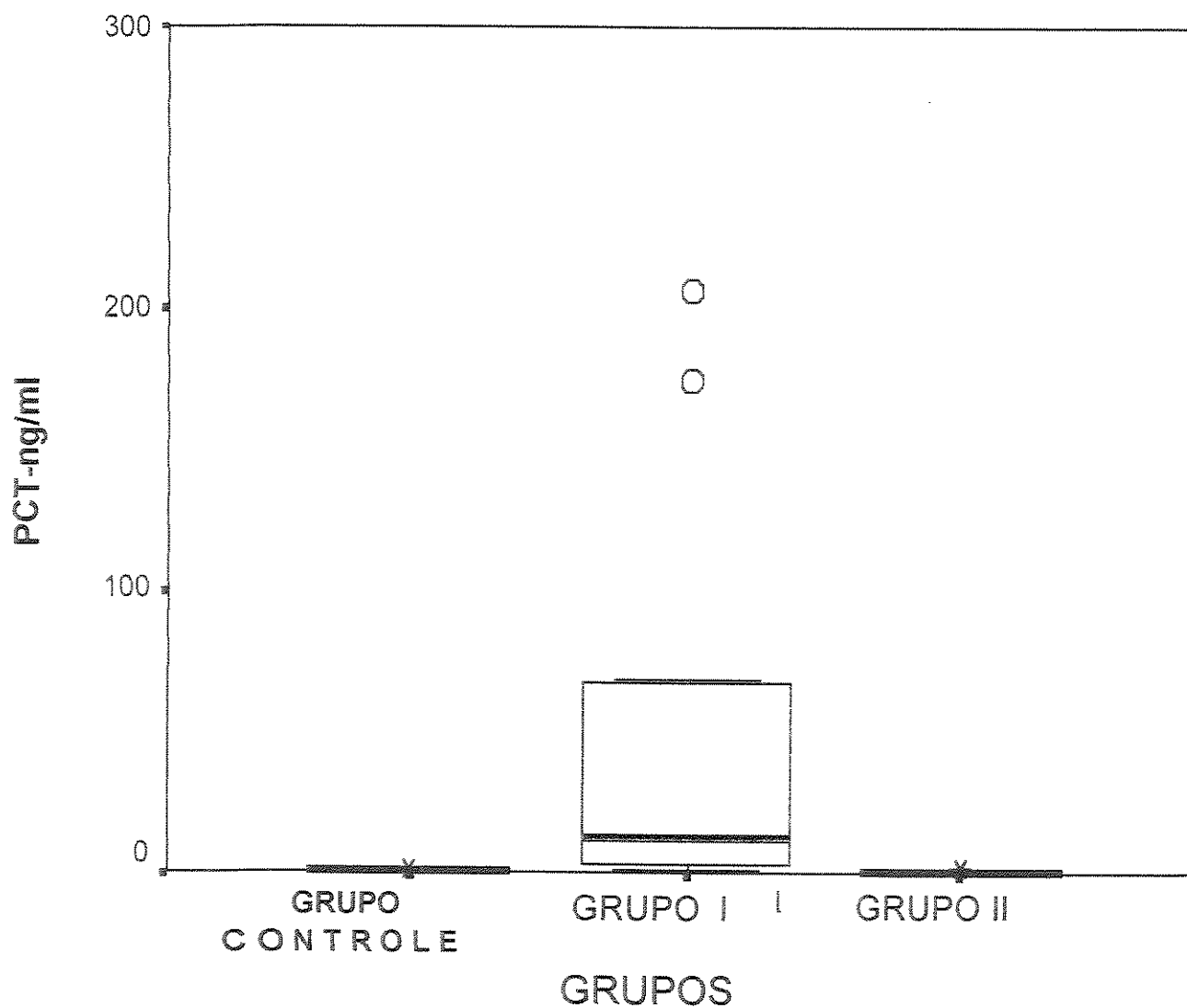


Figura 9- Valores médios de Procalcitonina(ng/ml) quantificada no soro de pacientes dos Grupos I(Portadores de infecção severa generalizada- SIRS/Sépsis), II(Portadores de patologias crônicas e infecções localizadas) e Controle(indivíduos normais).

DISCUSSÃO

O presente estudo visa avaliar a possibilidade de que a Procalcitonina(PCT), um novo marcador sérico, possa ser útil para discriminar a intensidade da atividade inflamatória e infecciosa aguda no homem. Os trabalhos iniciais a respeito, sugerem que a Procalcitonina possa ser um marcador de resposta inflamatória, apresentando um comportamento que lembra o das proteínas de fase aguda, liberadas pelo hepatócito através da ação das interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6)(SCHLAG & REDL, 1996). Os dados que obtivemos neste estudo parecem indicar que a PCT, um marcador independente da ação de interleucinas, sugere refletir com mais precisão o que parece ocorrer clinicamente no paciente grave infectado. Nossos dados estão de acordo com alguns dos autores da literatura(WANG et al, 1998; ASSICOT et al, 1993;KARSAI et al, 1997 entre outros)

Quando pacientes em SIRS(Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica) e infecção restrita ou localizada foram avaliados, observamos que o comportamento da PCT é idêntico ao do grupo controle, portanto estes dados novamente nos levam a deduzir que a PCT não deve sofrer o estímulo de interleucinas proinflamatórias como a IL-6(FASSBENDER et al, 1996). Entretanto, pacientes com intensa atividade inflamatória, na maioria das vezes provocadas por infecção generalizada, apresentaram um importante aumento nas concentrações de PCT. Estas observações permitem que possamos diferenciar estes grupos através da PCT , o que não ocorre com as proteínas de fase aguda interleucina dependentes como a proteína c-reativa.

Na revisão da literatura pertinente, é possível verificar que infecções bacterianas severas (sepsis) com manifestações sistêmicas, estão associadas ao aumento dos níveis séricos de Procalcitonina (KARSAI, W et

al, 1997), o mesmo não ocorre em casos de infecções virais ou de infecções bacterianas localizadas (ASSICOT et al., 1993). Nossos resultados apontam para a mesma direção. Como pode ser observado na tabela-II os valores de P.C.T. em pacientes do grupo I, criticamente comprometidos com infecções sistêmicas, estão todos aumentados. Valores estatisticamente significantes diferindo este grupo de doentes que passamos a chamar de críticos dos indivíduos dos grupos II (pacientes com infecções localizadas) e os controle.

Alguns autores demonstraram que os valores da concentração de PCT são úteis em diferenciar a etiologia de agentes infecciosos. Conseguiram diferenciar quadros de meningites de origem viral de outros de origem bacteriana e demonstraram que os pacientes com níveis de PCT iguais ou superiores a 5ng/ml eram portadores de quadros bacterianos. (GENDREL et al, 1997). Em casos de pacientes portadores do vírus da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) concomitantes com infecções bacterianas generalizadas, os valores de PCT aumentaram muito, evento que não ocorreu quando foram analisados portadores do vírus da AIDS com infecções localizadas, mesmo em estágios terminais de doença (GÉRARD et al, 1997). Estes dados abrem uma perspectiva importante no sentido da escolha de um tratamento mais adequado. (o uso de antibiótico terapia ou antivirais ou mesmo antifúngicos).

Outros autores conseguiram correlacionar diretamente a gravidade da doença e a quantidade de PCT dosada no soro dos pacientes (DE WERRA et al, 1997). Nossos dados também apontam para valores mais elevados de procalcitonina de acordo com a gravidade dos casos, e em muitos destes casos, por infecção de origem causada por bactérias Gram negativas, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, é possível que as toxinas liberadas por estas bactérias elevem especialmente os níveis de P.C.T. (DANDONA et al., 1994).

As determinações de Procalcitonina podem ser também utilizadas com valor prognóstico, orientando os casos mais graves quando são encontradas concentrações mais elevadas, e sugerindo boa resposta terapêutica nos casos em que ocorra uma diminuição e até normalização de seus valores, após tratamento com antibioticoterapia. O valor prognóstico da Procalcitonina pode vir a ser um bom uso deste marcador de infecções severas generalizadas (WHANG et al, 1998). Trabalhos futuros devem ser iniciados para responder estas observações.

Muito antes da descoberta da Procalcitonina, a Proteína C-Reativa vinha se mostrando útil para diferenciar processos inflamatórios de infecciosos, segundo alguns autores (PELTOLA et al., 1998; HASSON et al., 1993). A PCR obteve sucesso em diferenciar pneumonias verdadeiras de infecções endotraqueais, em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (SMITH et al., 1995); ao detectar sepsis em pós operatório de crianças (CHWALS et al 1994) e até mesmo ao diferenciar uma infecção bacteriana de uma viral (SHAW, 1991.). Em um recente estudo, a Proteína C-Reativa e a Procalcitonina foram simultaneamente avaliadas em crianças portadoras de doenças infecciosas. A PCT apresentou determinações com aumentos precoces, assim como retornou seus valores ao normal mais rapidamente que a PCR. (MONENERET et al., 1997). Nossos resultados também demonstram uma significativa elevação da concentração de PCR nos casos de infecção dos grupos I e II, os quais, apresentaram elevadas concentrações de PCR, se comparados ao grupo controle. Porém, demonstram que a PCR não é capaz de mensurar a gravidade dos casos. A Procalcitonina sugere ser um melhor marcador durante infecções com manifestações sistêmicas generalizadas (SIRS/Sepsis).

A PCR e o VHS são considerados marcadores de atividade inflamatória aguda (SOX et al, 1986). Nós encontramos elevação dos valores de VHS, nos Grupos I e II (Tabela-V e Figura 7). Nota-se que os valores máximos, as médias e medianas, apresentam determinações similares nos dois grupos; ambos, são constituídos de indivíduos infectados, de forma sistêmica ou localizada, o que demonstra a não especificidade deste marcador em diferenciar quadros sépticos de infecções localizadas. Observe-se que são todos pacientes internados em uma Unidade de Terapia Intensiva, alguns com mau prognóstico devido à idade e o acometimento de várias patologias, como insuficiência renal, diabetes, seqüelas de acidente vascular cerebral entre outros. Tanto para os gregos como para a medicina atual, a determinação da velocidade de hemossedimentação é um método laboratorial, aonde seria possível detectar a presença de maus “humores” orgânicos, hoje conhecidos como inflamação. É inespecífico, em geral reflete o aumento do fibrinogênio. (BRIDGEN, M., 1998 e BEDDEL, S.E., et al, 1985).

Finalmente, um outro marcador indireto de resposta inflamatória sistêmica e infecções, seria a contagem do número total de glóbulos brancos, que apresentou grandes variações sem significância estatística entre os grupos por nós avaliados. Ao correlacionar a influência da leucopenia e as concentrações de Procalcitonina, AL-NAWAS et al, 1996, não conseguiu significância estatísticas em suas avaliações, embora, tenha observado que não existe influência da leucopenia na produção de PCT, ou seja, que a imunossupressão não interfere na produção de PCT.

Em suma, o nosso estudo demonstra pela primeira vez na literatura, com as características do grupo de pacientes estudados, que o marcador sérico Procalcitonina (aparentemente não interleucina dependente) sugere

ser superior a outros marcadores imunológicos para detectar intensidade de atividade inflamatória associada à infecção severa generalizada.

Estudos futuros devem procurar correlacionar os achados de PCT, um elemento biológico de natureza não imunológica, com a proposta de que certas interleucinas poderiam ser utilizadas com o mesmo objetivo.

O uso de PCT poderá se mostrar útil, como vêm demonstrando alguns trabalhos na monitorização de pacientes em SIRS que venham a desenvolver infecção sistêmica. Os grupos de pacientes que se incluiriam nestes casos seriam aqueles submetidos a grandes cirurgias ou traumas(MIMOZ et al, 1998), imunossuprimidos(EBERHARD et al, 1997; AL-NAHWAS & SHAH, 1996) e pacientes com infecções localizadas que, devido a internação hospitalar(FASSBENDER et al, 1996), podem vir a ser acometidos de bactérias multiresistentes evoluindo para septicemia. Portadores de pancreatites agudas(RAU et al, 1997), e pacientes transplantados(GÉRARD et al, 1995) também poderão se beneficiar deste método.

6. CONCLUSÕES

1.O novo marcador sérico, a Procalcitonina, de acordo com nossos resultados, mostrou-se útil para diferenciar estados inflamatórios e infecciosos severos.(SRIS/Sepsis).

2.As dosagens de VHS , PCR e a contagem total do número de glóbulos brancos não diferenciam SIRS de SIRS/Sepsis, ou seja não discriminam de forma significativa a atividade inflamatória sistêmica isolada de quadros infecciosos .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADI, S., POLLOCK, A .S., SHIGENAGA, J.K., MOSERA .H., FEINGOLD, K.R., GRUNFELD,C. Role for monokines in the metabolic effects of endotoxin. *J.Clin. Invest.* **89**: 1603-1609 , 1992.
- AL-NAWAS, B.,SHAH, P.M. Procalcitonin in patients with immunossuppression and sepsis. *Infection* **24**:434-436, 1996.
- American College of Chest Physician/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit.Care Med.*, **20**:864-874, 1992.
- ASSICOT, M., GENDREL, D., CARSIN, H.,RAYMOND, J., GUILBAUD, J., BOHUON, C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*, **341**:515-518, 1993.
- BEDDEL,S. E., BUSH, B.T. Erythrocyte sedimentation rate : from folklore to facts. *Am. J. Med* **78**:1001-1009, 1985.
- BONE, R.C. Sepsis, Sepsis syndrome and the systemic inflammatory response syndrome(SIRS). *JAMA*, **273**:155-156, 1995.
- BRIDGEN, M. The erythrocyte sedimentation rate. *Post. Grad. Med.* **103**:257-274,1998.
- BRUNKHORST,F.M.,FORYCKI,Z.F.,WAGNER,J.:Identification of immune activation of infectious origin by procalcitonin immunoreactivity in different body fluids. *Clin. Intensive Care* **7**:41 Abstr., (1996).
- BULL, B.S., CHIEN,S., DORMANDY,J.A . Laboratory techniques: guidelines on selection of laboratory tests for monitoring the acute phase response. *J.Clin.Pathol.***41**:1203-1212, 1988.
- CALADRA, T.,BAUMGARTNER, J.D., GRAM, E.G. Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha and

- interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. *J.Infect. Dis.* **161**: 982-986, 1990.
- CHIESA, C., PANERO, A., ROSSI, N., STEGAGNO, M., DE GIUSTI, M., OSBORN, J.F., PACIFICO, L. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of Sepsis in critically ill neonates. *Clin. Infect. Dis.*, **26(3)**: 664-672, 1998.
- CHWALS, W.J., FERNANDES, M.E., JAMIE, ^aC., CHARLES, B.J., RUSHING, J.T. Detection of postoperative sepsis in infants with the use of metabolic stress monitoring. *Arch. Surg.* **129**: 437-442, 1994.
- DANDONA, P., NIX, W., WILSON, M.F., ALJADA, A., LOVE, Y., ASSICOT, M., BOHUON, C. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **79**: 1605-1608, 1994.
- DE WERRA, I., JACCARD, C., CORRADIN, S. B., CHIOLERO, R., YERSIN, B., GALLATI, H., ASSICOT, M., BOHUON, C., BAUMGARTNER, J.D., GLAUSER, M. P., HEUMANN, D.: Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: Comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit. Care. Med* **25**: 607-613, 1997.
- EBERHARD, O. K., HAUBITZ, M., BRUNKORST, F.M., KLIEN, V., KOCH, K.M., BRUNKORST, R. Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease (Systemic Lupus Erythematosus/ Systemic Antineutrophil Cytoplasmic Antibody- associated Vasculitis) and invasive bacterial infection. *Arthritis Rheum.* **40**: 1250-1256, 1997.
- FASSBENDER, K., PARGGER, H., MULLER, W., ZIMMERLI, W. Interleukin-6 and acute-phase protein concentrations in surgical intensive care unit patients: diagnostic signs in nosocomial infection. *Crit. Care Med.* **21**: 1175-1180, 1996.
- FISHER, C.J., OPAL, S.M., DHAINAUT, J.F. et al. Anti-TNF IgG monoclonal antibody (CB0006) in sepsis syndrome: pharmacokinetics, safety and

- role of pretreatment IL-6 as a predictor of time of survival. *Circ. Shock* **34**: 167, 1991.
- FISHER, C.J., ZHENG Y. Potential strategies for inflammatory mediator manipulation: retrospect and prospect. *World. J.Surg.* **20**:447-453, 1996.
- GANAPATHI, M.K., MAY,L.T.,SCHULTZ, D., BRABENEE, A ., WEINSTEIN,J., SEGAL, P.B., KUSHNER, I. Role of interleukin-6 in regulating synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in human hepatoma cell lines. *Biochem.Biophys.Res.Comm* **157**:271-277, 1988.
- GENDREL, D., BOHUON, C. Procalcitonin, a Marker of Bacterial Infection. *Infection* **25**: 133-134, 1997.
- GENDREL, D., RAYMOND, J., ASSICOT, M., MOULIN, F.,INIGUEZ, J-L., LEBON, P., BOHUON, C. Measurement of Procalcitonin Levels in Children with Bacterial or Viral Meningitis. *Clin.Infec.Des.* **24**:1240-1242, 1997.
- GÉRARD, Y., HOBER, D., ASSICOT, M., ALFANDARJ, S., AJANA, F.,BOUREZ, J.M., CHIDIAC, C., MOUTON,Y., BOHUON, C., WATTRE, P. Procalcitonin as a marker of bacterial Sepsis in patients infected with HIV-1 .*Journal of Infection*, **35**:41-46, 1997.
- GÉRARD,Y., HOBER, D., PETITJEAN, M., ASSICOT, M., BOHUON, C., MOUTON, Y., WATTRÉ. High serum Procalcitonin level in a 4- year-old liver transplant recipient with a disseminated candidiasis.*Infection* **23**:310-311, 1995.
- GUILLANI, P.P., MOTTÉ, P., TROALEN, F., JULLIENNE,A ., GARDET, P., CHEVALIER, T.L., ROUGIER, P., SCHLUMBERGER, BOHUON, C., BELLET, D. Identification and measurement of calcitonin precursors in serum of patients with malignant diseases. *Cancer* **49**:6845-6851, 1989.

- GUSSENTI, N. RUGA, E., GIACHINTO, C., MEMO, L., CASELLATO, R.D. Is C-reactive protein a reliable indicator of bacterial infection in the newborn. *J. Infect. Dis.* **160**:909-910, 1989.
- HASSON, L.O., AXELSSON, G., LINNÉ, T., AURELIUS, E., LINDQUIST, L. Serum C-reactive protein in the differential diagnosis of acute meningitis. *Scan. J. Infect. Dis.*, **25**:625-630, 1993.
- KARZAI, W., OBERHOFFER, M., MEIER-HELLMANN, A., REINHART. Procalcitonin- a new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection*, **25**:329-334, 1997.
- KATZ, P.R., KARUZA, J., GUTMAN, S.L., BARTHOLOMEW, W., RICHMAN, G. A comparison between erythrocyte sedimentation rate (ESR) and selected acute phase proteins in elderly. *Am. J. Clin. Pathol.* **94**:637-640, 1990.
- LE MOULLEC, J.M., JULLIENNE, A., CHENAIS J., LASMOLES F., GULIANA, J.M., MILHAUD, G., MOUKHTAR, M.S. The complete sequence of human preprocalcitonin. *FEBS Lett*, **167**:93-97, 1984.
- MEISNER, M. PCT-procalcitonin. A new and innovative parameter in diagnosis of infections. *B.R.A.H.M.S. Diagnostica*, Berlin 14-60, 1996.
- MICHIE, H.R., MONOGUE, K.R., SPRIGGS, D.R., et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N. Engl. J. Med.* **318**: 1481-1482, 1988.
- MIMOZ, O., BENOIST, J.F., EDOUARD, A.R., ASSICOT M, BOHUON, C., SAMI, K. Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* **24**:185-188, 1998.
- MONNERET, G., LABAUNE, J.M., ISAAC, C., BIENVENU, F., PUTET, G., BIENVENU, J. Procalcitonin and C-reactive protein levels in neonatal infections. *Acta. Paediatr.* **86**: 209-212, 1997.
- NATHENS, A.B., MARSHALL, J.C. Sepsis, SIRS, and MODS. What's in a name? *World J. Surg.*, **20**:386-391, 1996.

- PELTOLA, H., JAAKKOLA, M. C-reactive protein in early detection of bacteremic versus viral infections in immunocompetent and compromised children. *J. Pediatr.*, **113**:641-646, 1998.
- PROUD, D., KAPLAN, A. P. Kinin formation: mechanism and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol.* **6**:49-83, 1988.
- RAU, B., STEINBACH, G., GANSAUGE, F., MAYER, J.M., GRNERT, A., BEGER, H.G. The potential role of procalcitonin and IL-8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut*, **41**: 832-840, 1997.
- RITALA, E., PULKKI, K., MERTSOLA, J., NEVALAINEN, T., NIKOSKELAINEN, J. Endotoxin, interleukin-6 and phospholipase A 2 as markers of Sepsis in patients with hematological malignancies. *Scand. J. Infect. Dis.*, **27**:39-43, 1995.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Migração Celular e Inflamação. *IMUNOLOGIA* **5**ª ed:61-69, 1999.
- SCHEINBERG, M.A. Another look at serum amyloid protein SAA. *Clin. Rheumatol.* **2**:431-433, 1983.
- SCHEINBERG, M. A. Serum amyloid protein and C reactive protein in Systemic Amyloidosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **4**:191, 1996.
- SCHLAG, G., REDL, H. Mediators of injury and inflammation. *World J. Surg.*, **20**:406-410, 1996.
- SHAW, A. C. Serum C-reactive protein and neopterin concentrations in patients with viral or bacterial infection. *J. Clin. Pathol.* **44**:596-599, 1991.
- SMITH, R.P., LIPWORTH, B.J. C-reactive protein in simple community acquired pneumonia. *Chest* **107**: 1028-1031, 1995.
- SNIDER, R.H., NYLEN, E.S., BECKER, K.L. Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation : immunochemical characterization. *J. Invest. Med.*, **45**:552-560, 1997.

- SOX, C. H., LIANG, M. H. Erythrocyte sedimentation rate, guidelines for rational use. *Ann. Intern. Med.* **104**:515-523, 1986.
- STADNYK, A. W. & GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. *Immunology. Today* :A7-A13, 1991.
- VAN ZEE, K.J., FISHER, E., HAWES, A. S., et al. IL-8 in septic shock, endotoxemia and after IL-1 administration. *J. Immunol.* **146**: 3478, 1991.
- WHANG, K.T., STEINWALD, P.M., WHITE, J.C., NYLEN, E.S., SNIDER, R.H., SIMON, G.L., GOLDBERG, R.L., BECKER, K.L. Serum Calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **83**:3296-3301, 1998.
-

8.APÊNDICE

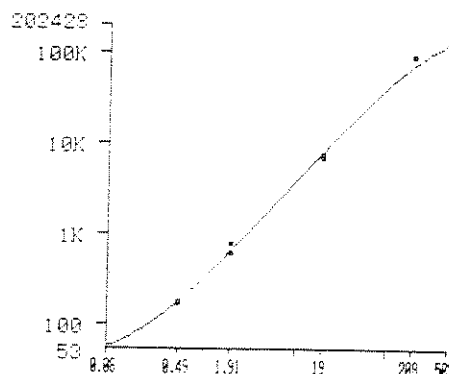
TUES	STD	RLU	FLAG	NG/ML
1	1	56	EDITED	0.08
2	1	53	EDITED	0.08
CV= 2.9% AVG		55		
3	2	170	EDITED	0.49
4	2	175	EDITED	0.49
CV= 1.5% AVG		173		
5	3	599	EDITED	1.91
6	3	759	EDITED	1.91
CV= 12% AVG		684		
7	4	7052	EDITED	19
8	4	5894	EDITED	19
CV= 3.2% AVG		7123		
9	5	92089	EDITED	208
10	5	92884	EDITED	208
CV=1.49% AVG		92487		
11	6	193113	EDITED	500
12	6	222428	EDITED	500
CV= 2.5% AVG		197771		

ONEWE TEST:

STD. CONC.	BACKFIT CONC.	% DIFF.
0.08	0.08	0.001
0.49	0.4886	-0.255
1.91	1.999	4.63
19	17.79	-6.34
208	275.2	32.3
500	1767	252

MEAN VARIATION : 49.5%
 EL 50% 304.70

LOG-LOG PLOT



<u>TUBE</u>	<u>CONTROL</u>	<u>RLU</u>	<u>FLAG</u>	<u>NG/ML</u>
13	1	295	EDITED	0.8705
14	1	270	EDITED	0.7939
CV= 4.4% AVG		283	*HIGH*	0.8332
15	2	10071	EDITED	25.60
16	2	2721	EDITED	25.99
CV= 5.3% AVG		10326	*HIGH*	25.64

8.1.Padronização de uma curva de dose clássica