

MARIA REGINA BENTLIN

***Determinação dos níveis séricos e urinários da
Interleucina 8 em recém-nascidos prematuros
com sepse tardia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Pediatria -
Área de Concentração em "Pediatria" da Faculdade de Medicina
de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Lígia Maria Suppo Souza Rugolo

BOTUCATU

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Bentlin, Maria Regina.

Determinação dos níveis séricos e urinários da Interleucina 8 em recém-nascidos prematuros com sepse tardia / Maria Regina Bentlin. – 2003.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

Orientadora: Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo

Assunto CAPES: 40101088

1. Prematuros - Infecções - Diagnóstico

CDD 618.9201

Palavras-chave: Recém-nascido; Prematuro; Sepse tardia; Interleucina 8;
Urina; Infecção

Dedico este trabalho:

Aos meus pais,

Milton Bentlin e Penha Pizeta Bentlin,

Por todo carinho, amor e paciência e
apoio em todas as fases desta jornada.

Ao meu avô,

Roberto Bentlin,

exemplo de homem digno, honesto e justo.

O meu mais sincero agradecimento:

À minha orientadora,

Profa. Dra. Lígia M S S Rugolo,

por toda dedicação, dinamismo e competência
com que me orientou,

por me incentivar, apoiar, questionar,

mas acima de tudo por me fazer acreditar

que sempre vale a pena.

Ao meu Deus,

Agrada-te do Senhor,
e Ele satisfará aos desejos do teu coração.
Entrega o teu caminho ao Senhor,
confia nele, e o mais Ele fará.

Agradecimentos

À todos os meus amigos, em especial a Grasiela Bossolan, Míriam Hashimoto, Antonio Rugolo Jr. e João César Lyra, pela amizade, incentivo, solidariedade e compreensão nos momentos mais complicados desta jornada.

Ao Fabiano Luís Michelin que no momento do imprevisto, prontamente se dispôs a me ajudar na editoração desta tese.

Ao curso de Pós-Graduação em Pediatria, pela oportunidade, incentivo e recurso financeiro, sem o qual não seria possível a realização desta pesquisa.

Aos colegas da Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pelo apoio e colaboração.

À Dra. Cleide Enoir Petean Trindade, exemplo de dedicação e competência.

Aos professores e colegas do Departamento de Pediatria e do curso de Pós-Graduação em Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo incentivo.

Aos colegas da secretaria do Depto de Pediatria, Adriana Bazzo Tavares, Paulo César Lopes, Marcelo Antonio Alves, pelo pronto atendimento e auxílio nas etapas desta tese.

À bióloga Sueli Calvi que com muita presteza e competência efetuou as dosagens da Interleucina-8.

À Neuza Maria Ferreira, que me acompanhou nas dosagens, com todo rigor e perfeição, valorizando ainda mais a pesquisa.

Ao Prof. Adalberto José Crocci, pela análise estatística dos dados e sugestões sempre pertinentes.

Aos residentes da Neonatologia que souberam compreender as ausências em visitas e discussões e que sempre cuidaram dos nossos recém-nascidos com carinho e dedicação, digno das grandes pessoas.

Às funcionárias da UTI Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio nas coletas e pela dedicação à UTI.

Aos funcionários do laboratório clínico do HC, do laboratório experimental de Pediatria, do laboratório de Moléstias Infeciosas e Parasitárias, pela realização dos exames.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até o final desta jornada.

Aos recém-nascidos da UTI, minha paixão, e objetivo maior desta pesquisa, a minha eterna gratidão e o meu respeito.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AIG	=	Adequado para idade gestacional
CDC	=	Center for Disease Control
CIVD	=	Coagulação intravascular disseminada
DBP	=	Displasia broncopulmonar
E	=	Especificidade
EPM	=	Escola Paulista de Medicina
EUA	=	Estados Unidos da América
FMB	=	Faculdade de Medicina de Botucatu
FUNASA	=	Fundação Nacional de Saúde
g	=	Gramas
G	=	Grupo
G-CSF	=	Fator estimulante de colônia de granulócito
GIG	=	Grande para idade gestacional
GNI	=	Grupo não infectado
GRE	=	Glucocorticoid responsive element
GS	=	Grupo séptico
HC	=	Hospital das Clínicas
HE	=	Hiperecogenicidade
HPIV	=	Hemorragia peri-intraventricular
I /M	=	Relação formas imaturas / maduras
IC	=	Intervalo de confiança
ICAM	=	Molécula de adesão intercelular
IG (A,M,D,E)	=	Imunoglobulina (A,M,D,E)
IG	=	Idade Gestacional
IL	=	Interleucina
IL ur/cr	=	Interleucina urinária/ creatinina urinária
IL-r	=	Receptor de Interleucina
IP	=	Infecção precoce
IPN	=	Idade pós-natal
LCR	=	Líquor cefalorraquidiano
M1	=	Momento inicial da avaliação
M2	=	24 - 48 horas após o início do estudo

mm ³	=	Milimetros cúbicos
NICHD	=	National Institute Child Health Development
OMS	=	Organização Mundial da Saúde
PAM	=	Pressão arterial média
PCA	=	Persistência do canal arterial
PCR	=	Proteína C reativa
PCT	=	Procalcitonina
P	=	Significância estatística
P (25-75)	=	Percentil (25-75)
pg	=	Picograma
PIG	=	Pequeno para idade gestacional
PMN	=	Polimorfonuclear
PN	=	Peso de Nascimento
r	=	Coefficiente de correlação
RN	=	Recém-nascido
ROC	=	Curva de operação resposta
s	=	Desvio-padrão
S	=	Sensibilidade
SCN	=	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
SDR	=	Síndrome do desconforto respiratório
SDRA	=	Síndrome do desconforto respiratório agudo
sem	=	Semanas
SRIS	=	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF	=	Fator de necrose tumoral
TTRN	=	Taquipnéia transitória do recém-nascido
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista
UNIFESP	=	Universidade Federal de São Paulo
UTI	=	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
VPN	=	Valor preditivo negativo
VPP	=	Valor preditivo positivo
x	=	Média
μ l	=	Microlitro
ng	=	Nanograma

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. Importância do problema	2
2. Definição	4
3. Fisiopatologia	6
4. Peculiaridades das infecções nos recém-nascidos	7
Resposta imune	7
Susceptibilidade às infecções	8
Dificuldades diagnósticas	10
5. Citocinas na sepse neonatal	11
Ação e classificação	11
Fator de Necrose Tumoral- α , Interleucina 1, Interleucina 6 e Interleucina 8	12
Níveis do TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 na sepse neonatal	15
OBJETIVOS	28
CASUÍSTICA E METODOLOGIA	30
1. Casuística	31
1.1 - Aspectos éticos	31
1.2 - Descrição da amostra	31
1.3 - Definição da sepse neonatal tardia	31
1.4 - Padrão ouro	32
1.5 - Tipo de estudo	32
1.6 - Local do estudo e características da Unidade	32
1.7 - Critérios de inclusão	33
1.8 - Critérios de exclusão	34
1.9 - Formação de grupos e momentos da coleta	34

2. Variáveis de estudo	35
2.1 – Clínicas	36
Caracterização dos recém-nascidos	36
2.2 – Laboratoriais	38
Hemograma e dosagens bioquímicas	38
Líquor	38
Culturas	39
Considerações quanto às coletas e dosagens	39
2.3 - Interleucina 8 sérica e urinária	41
Técnica de coleta	41
Método de dosagem	42
3. Análise estatística	43
3.1 - Ponto de corte	43
3.2 - Acurácia do teste diagnóstico	44
3.3 - Probabilidade de sepse tardia	44
RESULTADOS	46
1. Variáveis clínicas	47
1.1 - Caracterização dos recém-nascidos estudados	47
2. Variáveis laboratoriais	51
2.1 - Hemograma e dosagens bioquímicas	51
2.2- Culturas	53
3. Interleucina 8	54
3.1 - Determinação dos níveis séricos e urinários	54
3.2 - Correlação dos níveis séricos e urinários da IL-8	63
3.3 - Cálculo do ponto de corte dos níveis da Interleucina 8 sérica, urinária e IL-8 ur/cr	64
3.4 - Cálculo da acurácia diagnóstica da Interleucina 8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr	67
3.5 - Comparação da Interleucina 8 sérica e urinária com outros parâmetros laboratoriais de sepse	68

DISCUSSÃO	70
1. Casuística e Metodologia	71
1.1 – Casuística	72
1.2 - Variáveis de estudo	76
1.3 - Análise estatística	81
2. Resultados	84
2.1 - Caracterização dos recém-nascidos	84
2.2 - Variáveis laboratoriais	89
2.3 - Determinação dos níveis séricos e urinários da IL-8	93
3. Considerações finais	115
CONCLUSÕES	116
RESUMO	119
SUMMARY	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	138

INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico evidenciado nas últimas décadas vem propiciando o aumento da sobrevivência de recém-nascidos com idade gestacional e peso de nascimento cada vez menores, atingindo taxas de até 70% de sobrevivência naqueles com mais que 26 semanas de idade gestacional (LORENZ, 2000). Com o aumento da sobrevivência destes pequenos prematuros outro desafio começa a fazer parte do dia a dia de todos os profissionais que se dedicam aos cuidados destes pacientes: a redução da morbidade e consequente melhora na qualidade de vida.

É neste contexto que a infecção hospitalar, especialmente a sepse neonatal tardia, surge como uma das grandes responsáveis pelo aumento da morbimortalidade, prolongando o tempo de hospitalização, elevando os custos sociais e econômicos e comprometendo o prognóstico dos recém-nascidos prematuros. Destaca-se ainda que a sepse tardia é uma das principais causas de óbito neonatal a partir da segunda semana de vida (BENTLIN, 1997; STOLL, 1997).

1. Importância do problema

As infecções hospitalares no período neonatal merecem destaque pela alta mortalidade. A incidência é variável e depende de características dos recém-nascidos como peso de nascimento, idade gestacional e pós-natal, procedimentos utilizados, métodos de avaliação diagnóstica e protocolos de vigilância de cada Unidade.

Em 1996 a Organização Mundial da Saúde (OMS) avaliou a mortalidade perinatal com o objetivo de determinar as taxas de mortalidade em diferentes regiões do mundo e a percentagem de mortes atribuídas à infecção em recém-nascidos. Os dados obtidos foram alarmantes, de um total de 27 estudos revisados, 17 mostraram que a infecção esteve associada à mortalidade neonatal em taxas que variaram de 4 a 56%. Especificamente com relação à mortalidade neonatal tardia, 5 trabalhos registraram a infecção como sua principal causa, presente entre 30 e 73% dos casos (WHO, 2002).

Estas estimativas são preocupantes não apenas nos países em desenvolvimento mas também nos desenvolvidos. Na Espanha, estudo realizado em 29 Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, mostrou incidência de sepse tardia de 11,4% (SOHN *et al.*, 2001). Nos Estados Unidos em 1996, em um dos maiores estudos multicêntricos já realizados envolvendo 7861 recém-nascidos de muito baixo peso, de 12 Unidades do *National Institute of Child Health and Human Development* (NICHD) *Neonatal Research Network*, a incidência de sepse tardia variou de 11,5 a 32,4% e a mortalidade atribuída à infecção ocorreu em média, em 44,3% dos casos (STOLL *et al.*, 1996a). Em 2002 a incidência de sepse tardia nestes mesmos centros foi em média de 21% (STOLL *et al.*, 2002).

Outra pesquisa publicada recentemente envolvendo 5555 recém-nascidos de muito baixo peso em Israel, mostrou 30% de ocorrência de sepse tardia, com taxas de mortalidade significativamente maiores nos recém-nascidos sépticos, comparados com aqueles sem infecção, 16,9% x 8,6% respectivamente (MAKHOUL *et al.*, 2002).

Na literatura latino-americana são escassos os dados epidemiológicos referentes à sepse tardia. O Peru registra incidência de 29,3%, enquanto o México, de 15,5% (ZAMORA-CASTORENA, 1998).

No Brasil os dados não são diferentes. NASCIMENTO (1997) mostrou incidência acumulada de infecção hospitalar de 25,6 recém-nascidos infectados/100 internados na UTI Neonatal do Hospital São Paulo - EPM - UNIFESP. A infecção mais freqüente foi a sepse, responsável por 48% das infecções. Em estudo realizado na UTI Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, BENTLIN (1997) registrou incidência de sepse tardia de 20% nos recém-nascidos de muito baixo peso, com taxa de mortalidade de 37%. Neste estudo a sepse tardia foi responsável por 30% dos óbitos na Unidade.

Dados da Fundação Nacional da Saúde (FUNASA) de agosto de 2000, mostraram que um dos principais componentes da mortalidade em crianças menores de 5 anos no Brasil, é a mortalidade neonatal, que tem como uma das principais causas a sepse neonatal (DRUMOND JÚNIOR & LIRA, 2002).

Ao se projetar a estimativa de que 30 a 40% das mortes neonatais estão associadas com infecção e utilizando-se os dados da OMS que

estimou 4.733.330 mortes neonatais/ano em 2002 nos países menos desenvolvidos, conclui-se que a infecção será responsável por 1,4 a 1,9 milhões de mortes/ano ou 3900 a 5200 mortes/dia no mundo (WHO, 2002).

2. Definição

Para melhor compreensão da sepse tardia é importante conceituar infecção hospitalar. O *Center for Disease Control and Prevention* – CDC - define como infecção hospitalar todas as infecções adquiridas intra-parto, durante a hospitalização ou até 48 horas após a alta, com exceção às infecções transplacentárias. É considerada como de origem materna a infecção que ocorre até 48 horas de vida e de origem ambiental, após 48 horas de vida (GAYNES *et al.*, 1996; MUSSI-PINHATA & NASCIMENTO, 2001).

No Brasil, a portaria de nº 2616/98 do Ministério da Saúde classifica toda infecção neonatal como hospitalar, com exceção das adquiridas via transplacentária ou associadas à rotura de membranas por período superior a 24 horas antes do parto (BRASIL, 1998).

A sepse neonatal é definida como síndrome clínica que se manifesta no primeiro mês de vida, caracterizada por sinais sistêmicos de infecção e acompanhada frequentemente de bacteremia (SIEGEL & Mc CRACKEN, 1981).

Em 1991, nos EUA, o Colégio Americano de Pneumologia e a Sociedade de Terapia Intensiva estabeleceram um consenso para a definição de sepse e falência orgânica. Houve normatização das definições utilizadas na prática clínica e em pesquisa, visando o diagnóstico mais preciso e a possibilidade de comparação entre investigações clínicas (ACCP/SCCM, 1992).

Em 1993, SAEZ-LLORENZ & Mc CRACKEN normatizaram esta terminologia para o paciente pediátrico:

- > **Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)** - dois ou mais dos seguintes achados: temperatura > 38°C ou < 35,5°C; FC >160 bpm; FR > 60 ipm; leucocitose/ leucopenia ou mais que 10% de formas jovens;
- > **Sepse** - SIRS secundária à infecção;

- > **Síndrome Séptica** - sepse com disfunção orgânica, hipotensão, ou hipoperfusão tecidual, caracterizada por acidose láctica, oligúria, ou alteração aguda do estado de consciência;
- > **Choque Séptico** - sepse com hipotensão não responsiva à ressuscitação hídrica;
- > **Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas** - comprometimento progressivo da perfusão de órgãos, representado por qualquer combinação de distúrbios como: coagulação intravascular disseminada (CIVD), síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), insuficiência renal, insuficiência hepática ou disfunção neurológica.

No recém-nascido outro aspecto importante é a classificação do quadro séptico. A sepse neonatal é classificada em duas formas: precoce e tardia.

A forma precoce ocorre até o quarto dia de vida (KLEIN & MARCY, 1995). Relaciona-se com complicações obstétricas como rotura prematura de membranas, trabalho de parto prematuro, corioamnionite, febre intra-parto e colonização vaginal materna. Os agentes etiológicos são provenientes do trato genital materno, entre eles a *Escherichia coli*, o *Streptococcus agalactiae* e a *Listeria monocytogenes* (STOLL *et al.*, 1996b, KAUSHIK *et al.*, 1998).

A sepse tardia ocorre a partir do quinto dia de vida (KLEIN & MARCY, 1995), entretanto em função do conceito do CDC que define infecção hospitalar de origem ambiental aquela que ocorre a partir de 48 horas, a definição de sepse tardia após 48 horas também pode ser utilizada (NNISS, 1994; GAYNES *et al.*, 1996). Esta forma relaciona-se com o ambiente pós-natal, características próprias do recém-nascido e do seu atendimento, procedimentos utilizados, antibioticoterapia prévia, nutrição parenteral, manipulação do recém-nascido, infecção cruzada entre outros (FREIJ & Mc CRACKEN, 1994). Os principais agentes são os *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram-negativas e fungos (STOLL *et al.*, 1996a; BENTLIN, 1997; NASCIMENTO, 1997; ANWER *et al.*, 2000; STOLL *et al.*, 2002).

3. Fisiopatologia

As vias de transmissão da sepse neonatal relacionam-se diretamente com o tempo de aparecimento do quadro. Na precoce, a infecção pode ocorrer por via ascendente ou hematogênica caracterizando a infecção intra-amniótica, ou ainda ao nascimento, via canal de parto. Na tardia, são mais frequentes a transmissão hematogênica, a entrada de microorganismos por soluções de continuidade da pele dos recém-nascidos e a infecção cruzada (KLEIN & MARCY, 1995; POLZIN & BRADY, 1998).

Seja qual for a via de infecção as bactérias irão multiplicar-se no foco primário podendo atingir outros órgãos e sistemas através da corrente sangüínea, instalando-se assim o quadro séptico. Até há pouco tempo, acreditava-se que o microorganismo invasor agredisse diretamente o hospedeiro por meio de toxinas, entretanto vários estudos revelam que é o próprio sistema imune do hospedeiro que em resposta às toxinas bacterianas medeia a lesão tecidual e a agressão associada à sepse (SAEZ-LLORENZ & Mc CRACKEN, 1993). A resposta do hospedeiro depende da sua capacidade de reconhecimento e neutralização do microorganismo na corrente sangüínea e nos tecidos. Os eventos fisiopatológicos que ocorrem neste processo são mediados por citocinas, ativadas em resposta à presença de componentes bacterianos dentro do compartimento vascular.

Vias bioquímicas, neuroendócrinas e imunológicas são ativadas na tentativa de controlar a invasão bacteriana. Ocorre ainda ativação da cascata do complemento e da coagulação, estimulação do sistema caliceína-cinina, produção de beta endorfinas e alterações das propriedades cinéticas e funcionais de polimorfonucleares (SAEZ-LLORENZ & Mc CRACKEN, 1993).

O estresse da sepse ativa o sistema opióide endógeno e libera beta endorfinas que estão envolvidas na gênese do choque, causando depressão cardiovascular, vasodilatação e hipotensão (HOLADAY, 1983).

Os neutrófilos têm importante participação no processo séptico. Os mediadores da resposta inflamatória especialmente as citocinas, são responsáveis pela adesão do neutrófilo ao endotélio, pela estimulação de suas funções, entre elas a quimiotaxia, a fagocitose e a lise bacteriana. Desses

eventos, resulta a degranulação dos neutrófilos com liberação de enzimas proteolíticas e radicais livres de oxigênio que são lesivos aos tecidos locais, aumentando a permeabilidade endotelial e colaborando para o extravasamento capilar, que é um importante mecanismo na gênese do choque séptico (LEHRER *et al.*, 1988; TERASHIMA *et al.*, 1998).

4. Peculiaridades das infecções nos recém-nascidos

Resposta imune

O sistema imune atua como sistema integrado de defesa do hospedeiro para eliminar o agente infeccioso e oferecer proteção duradoura. Por outro lado, os microorganismos apresentam ou desenvolvem mecanismos de evasão que podem levar à infecção ou à lesão tecidual. A resposta imune à infecção ocorre em três fases (GRUMACH & SILVA, 2001):

- > imunidade inata, que corresponde a primeira barreira para eliminar o organismo invasor, ativada imediatamente após a invasão deste organismo (até 4 horas) , de resposta rápida e não específica aos antígenos. Fazem parte da imunidade inata o sistema complemento, lisozimas, proteínas de fase aguda, células fagocíticas e natural *killer*. Quando esta linha de defesa é ultrapassada, a resposta imune adaptativa atua, gerando células antígeno-específicas e células de memória que impedem a infecção por aquele agente;
- > resposta induzida precocemente, que não gera proteção duradoura (4 a 96 horas) entretanto pode repelir o microorganismo ou mantê-lo sob controle até que ocorra a resposta adaptativa. As citocinas produzidas durante esta fase atuam no desenvolvimento da resposta adaptativa e podem determinar se a resposta será predominantemente humoral mediada por anticorpos, ou celular mediada por células T;
- > resposta adaptativa ou específica, que ocorre após 96 horas e compreende a resposta de anticorpos e linfócitos T.

A evolução do processo infeccioso envolve uma seqüência de interações entre microorganismo e hospedeiro. As características dos microorganismos determinam sua virulência, enquanto as peculiaridades do hospedeiro determinam a evolução da doença (GRUMACH & SILVA, 2001).

Susceptibilidade às infecções

A maior susceptibilidade do recém-nascido às infecções ocorre pela produção e função diminuídas dos componentes dos sistemas de defesa local e sistêmica, desde o comprometimento das barreiras naturais até as respostas dos mecanismos imunes inato e adaptativo (VILELA, 2001).

Até o nascimento o feto vive em ambiente estéril intra-útero, imunologicamente protegido pela mãe. Após o nascimento ele passa a ser colonizado com microorganismos do trato genital materno e também de fontes hospitalares. O sistema imunológico do recém-nascido é funcionalmente deficiente na produção de complemento e imunoglobulinas e na secreção de mediadores inflamatórios por leucócitos (GAUNT & RAMIN, 2001).

A pele do recém-nascido tem permeabilidade aumentada, menor queratinização, menor produção de melanina, maior susceptibilidade à colonização, além de ter sua integridade alterada facilmente por qualquer tipo de agressão local. O cordão umbilical com freqüência é fonte de infecção por sua proximidade com todo o sistema circulatório. O revestimento mucociliar nasal e a produção de lágrimas e saliva são deficientes. No trato gastrointestinal a limitada produção de imunoglobulina A (IG-A) secretora e de sais biliares, e a menor acidez gástrica favorecem a infecção (KLEIN & MARCY, 1995). A ausência de aleitamento materno também é fator determinante no desenvolvimento e controle de infecções (GAROFALO & GOLDMAN, 1999; NEU & BERNSTEIN, 2002).

A deficiência na resposta imune inata é decorrente da limitada capacidade de produção de neutrófilos, e inadequada função dos mesmos, da menor fração de precursores de granulócitos, baixa expressão de integrinas e L-selectinas ao neutrófilo e conseqüente deficiência da adesão ao endotélio, da migração e da quimiotaxia (VILELA, 2001). Estudos sobre o número e função de neutrófilos em recém-nascidos mostram pequeno *pool* de estocagem, aderência e

quimiotaxia diminuídas e baixa capacidade de morte intracelular, especialmente em prematuros (SPEER & JOHNSTON, 1998).

Os monócitos embora estejam normais em número, e realizem fagocitose e atividade microbicida com a mesma competência do adulto, apresentam quimiotaxia reduzida. Os macrófagos são imaturos para a atividade microbicida, fagocitose, apresentação de antígeno e produção de interleucinas. A atividade das vias clássica e alternativa do sistema complemento, especialmente no recém-nascido prematuro é menor que 50% do valor de adultos (WINKELSTEIN, 1998).

O sistema imune adaptativo também apresenta deficiências. A função da célula T no feto e recém-nascido é diminuída quando comparada ao adulto, incluindo a citotoxicidade mediada pela célula T nas infecções virais. No recém-nascido ocorre diminuição seletiva na produção de citocinas pelas células T, o que pode contribuir para a imaturidade de toda função imune celular. A falta de exposição prévia aos antígenos é a principal diferença em relação ao adulto, propiciando diferente resposta qualitativa aos antígenos e menor número de células de memória nos recém-nascidos (VILELA, 2001).

À semelhança da imunidade celular, a imunidade humoral tem características diferentes do adulto. A imunoglobulina G (IG-G) é transportada da mãe para o feto através da placenta, principalmente no último trimestre de gestação, propiciando concentração em cordão similar à da mãe. A IG-M não atravessa a barreira placentária e sua concentração é apenas 20% da observada em adultos. Os níveis das imunoglobulinas A, D e E são baixos ou indetectáveis no sangue de cordão umbilical, elevando-se no primeiro ano de vida. Não existe evidência que estas imunoglobulinas apresentem limitações em sua função no período neonatal (OGRA & RASSIN, 1995; VILELA, 2001).

Por tudo isto recém-nascidos apresentam maior risco para o desenvolvimento de infecções e sepse.

Dificuldades diagnósticas

Na maioria das vezes o alerta inicial para a suspeita da sepse consiste na impressão clínica de que o recém-nascido não está bem, apresentando-se hipoativo, com instabilidade térmica, resíduo gástrico, apnéia entre outras manifestações. Entretanto estes sinais e sintomas são inespecíficos e podem ser encontrados em processos não infecciosos, o que dificulta o diagnóstico (KLEIN & MARCY, 1995).

Os exames laboratoriais, principalmente o hemograma e reagentes de fase aguda como a proteína C reativa (PCR), utilizados em conjunto e de forma seriada, auxiliam no diagnóstico da sepse, mas também são inespecíficos (GERDES & POLIN, 1987; RODWELL *et al.*, 1988; POWELL & MARCY, 1995).

O padrão ouro para a definição da sepse é o isolamento do agente em fluidos corporais, especialmente no sangue e líquido. Entretanto a positividade destas culturas não é alta e seu resultado não é rápido, o que dificulta ainda mais o diagnóstico (POWELL & MARCY, 1995; BUTTERY, 2002).

As novas técnicas de biologia molecular têm propiciado grandes avanços no diagnóstico etiológico rápido e preciso da sepse. A amplificação da reação de polimerização em cadeia, utilizando seqüências de DNA encontradas em bactérias e outros microorganismos, permite a identificação rápida destes agentes com alta sensibilidade (Mc CABE *et al.*, 1995). Entretanto o alto custo, inviabiliza sua utilização de rotina.

Outros exames promissores, incluem a determinação dos níveis de citocinas em fluidos corporais e o estudo das moléculas de adesão intercelular - ICAM (MEADOW & RUDINSKY, 1995; PHILIP, 1996).

5. Citocinas na sepse neonatal

Ação e Classificação

As citocinas representam um grande grupo de proteínas solúveis que atuam na regulação de células de forma semelhante aos hormônios. Elas são sintetizadas e secretadas por células do sistema imune e não imune, em resposta a diferentes estímulos. São mediadores potentes que atuam via receptores de superfície, aos quais combinam-se com muita afinidade. A distribuição desses receptores nos diferentes tipos de células, determina o grau de interatividade da citocina. Muitas citocinas são secretadas e algumas são expressas na membrana celular ou armazenadas na matriz extracelular. Seus efeitos são autócrinos e parácrinos ou seja, atuam a curta distância, na intimidade dos órgãos linfóides. As citocinas possuem muitas propriedades entre elas: pleiotropia - uma única citocina atua em diversos tipos celulares e estimula respostas diferentes; redundância - duas citocinas diferentes podem induzir resposta semelhante; sinergismo - o efeito combinado de duas citocinas é maior do que o efeito cumulativo das citocinas individualmente; antagonismo - algumas citocinas inibem o efeito de outras. As interações antagônicas são mecanismos importantes na regulação das ações das citocinas (VASCONCELOS, 2001; GRUMACH & SILVA, 2001).

A função das citocinas é coordenar a ação de diferentes tipos de células participantes da resposta imune inflamatória incluindo, o controle da proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas, o recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção, a ativação de leucócitos e de seus mecanismos efetores. A secreção de citocina ocorre após ativação da célula produtora. As citocinas secretadas induzem aumento na expressão de receptores na célula alvo e ativam outras células produtoras sucessivamente, até que grande número de células diferentes tenham sido envolvidas na resposta inflamatória (VASCONCELOS, 2001).

As ações das citocinas são bastante diversificadas e somente com a caracterização estrutural de cada uma delas, foi possível classificá-las em famílias. Entre elas destacam-se:

- > Hematopoiéticas: citocinas envolvidas na proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas;
- > Interferons: proteínas sintetizadas por células infectadas por vírus ou outros patógenos;
- > Interleucinas (IL): secretadas por grande variedade de células como monócitos, células de Langerhans, linfócitos T e B, células *Natural Killer*, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos. Atuam sobre os linfócitos T e B, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, osteoblastos e hepatócitos entre outras células. Sua função é basicamente pró-inflamatória;
- > Fator de necrose tumoral (TNF): codificado por genes ligados ao complexo de histocompatibilidade, secretado por monócitos, macrófagos e linfócitos T. Seus efeitos gerais são semelhantes aos das interleucinas;
- > Fator de crescimento e transformação: representado por dois tipos diferentes de moléculas, alfa e beta, que se relacionam com fator de crescimento epidérmico, inibição da proliferação celular, reparação tecidual, hematopoiese e indução da síntese de IG-A;
- > Quimiocinas: moléculas de baixo peso molecular que atuam na resposta inflamatória como fatores quimiotáticos. Essas moléculas são classificadas em dois grupos principais, definidos pela semelhança na região dos resíduos de cisteína: as C-X-C ou α quimiocinas (onde X corresponde a qualquer resíduo de aminoácido) atraem neutrófilos enquanto as C-C ou β quimiocinas atraem monócitos e, em menor grau, eosinófilos e linfócitos. Dessa forma, elas são importantes no recrutamento de células na imunidade inata e adquirida (HAGEMAN & CAPLAN, 1995; KILPATRICK & HARRIS, 1998; VASCONCELOS, 2001).

Fator de Necrose Tumoral- α , Interleucina 1, Interleucina 6 e Interleucina 8

No passado, as estratégias terapêuticas tinham como objetivo exclusivo a erradicação da bactéria que causava infecção, entretanto, muitos

pacientes evoluíam para óbito mesmo após a esterilização de culturas com os agentes terapêuticos. Com o conhecimento dos mediadores inflamatórios sabe-se que durante o processo séptico o hospedeiro produz citocinas pró-inflamatórias as quais iniciam uma cascata de eventos que resultam na lesão tecidual em locais distantes e falência de múltiplos órgãos e sistemas, mesmo após a erradicação do agente agressor. As citocinas medeiam muitos desses eventos e especial atenção tem sido dada à capacidade dos recém-nascidos em produzi-las, destacando-se:

- > TNF: são descritos o TNF- α , β e a linfotóxina β que exercem ação biológica semelhante na inflamação local, ativação de células endoteliais e lise de células tumorais (VASCONCELOS, 2001). O TNF é mediador precoce na cascata das citocinas. Muitos autores sugerem que em recém-nascidos a produção de TNF pelos monócitos do cordão umbilical esteja diminuída (ENGLISH *et al.*, 1988; PETERS *et al.*, 1993; WILLIAMS *et al.*, 1993). Em prematuros, WEATHERSTONE & RICH (1989) observaram que as células do sangue de cordão secretavam menores quantidades de TNF do que os monócitos de recém-nascidos de termo ou adultos controles.
- > IL-1: as Interleucinas 1 α e 1 β são sintetizadas e produzidas de forma semelhante ao TNF. Estas citocinas induzem a produção de outras interleucinas como IL-2 e IL-4, de Interferon, promovem a secreção de imunoglobulinas, a neutrofilia, a febre e a produção de proteínas de fase aguda (WILMOTT *et al.*, 1987; BURCHETT *et al.*, 1988; BESSLER *et al.*, 1993, VASCONCELOS, 2001). Os resultados de estudos que investigaram a capacidade de produção de IL-1 por recém-nascidos são contraditórios, podendo esta produção estar normal, diminuída ou aumentada (VASCONCELOS, 2001; VILELA, 2001). MILLER *et al.* (1990) encontraram níveis elevados de IL-1 em recém-nascidos de parto vaginal induzido ou cesárea de urgência e níveis muito baixos naqueles provenientes de partos vaginais conduzidos ou cesáreas eletivas. Neste estudo, recém-nascidos com graves complicações perinatais como asfixia e pré-eclâmpsia materna, apresentaram níveis muito elevados de IL-1. Em 1993, PETERS *et al.* dosaram IL-1 e TNF- α em sangue periférico de recém-nascidos de termo e prematuros, e em adultos saudáveis, após a estimulação de monócitos com

lipopolissacárides bacterianos, e observaram menor secreção de IL-1 e TNF- α nos dois grupos de recém-nascidos. Os autores propuseram que esta diferença poderia estar relacionada com variáveis perinatais como tipo de parto, evolução clínica e complicações dos recém-nascidos.

- > IL-6: produção e secreção semelhante às outras citocinas sendo responsável pela proliferação e diferenciação de células T e B e pela produção de reagentes de fase aguda. SAITO *et al.* (1990) avaliaram os níveis de IL-6 após estimulação por IL-1 e observaram menores concentrações em prematuros quando comparados a recém-nascidos de termo e adultos.
- > IL-8: sintetizada por monócitos circulantes, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, epiteliais, hepatócitos, queratinócitos, células sinoviais, condrócitos e algumas células tumorais. Sua produção é estimulada por lipopolissacárides de bactérias ou indiretamente por outras citocinas, como TNF, IL-1, IL-3, fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos, lecitinas, complexos imunes e fagócitos. A IL-6 não estimula a produção de IL-8 (VASCONCELOS, 2001). A IL-8 é uma quimiocina da família C-X-C, com função de quimiotaxia, que acumula e ativa neutrófilos no local da inflamação, amplificando o processo inflamatório. Os neutrófilos ativados têm papel importante na eliminação do microorganismo e também na produção de mais IL-8 (SHIMOYA *et al.*, 1992; TERASHIMA *et al.*, 1998).

Os monócitos *in vitro* mostram dois picos de liberação da IL-8: o primeiro entre duas e quatro horas após o contato com agentes inflamatórios e o segundo aproximadamente 24 horas após, importante na manutenção do processo inflamatório (TRAUTMAN *et al.*, 1992; VASCONCELOS, 2001). A IL-8 é fundamental no *burst* oxidativo, ou seja, no aumento do metabolismo oxidativo dos fagócitos após a captação de partículas opsonizadas e também promove aumento da adesão leucocitária (VASCONCELOS, 2001).

Níveis do TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 na sepse neonatal

Várias pesquisas sugerem que as citocinas especialmente o TNF- α , as IL-1, IL-6 e mais recentemente a IL-8 contribuem para a resposta inflamatória do recém-nascido às infecções. Embora o sistema imunológico do recém-nascido produza citocinas para protegê-lo da invasão microbiana, pode ocorrer superprodução destes imunorreguladores, ocasionando efeitos deletérios ao organismo.

O TNF- α está aumentado nos quadros sépticos, especialmente no choque (GIRARDIN *et al.*, 1990; De BONT *et al.*, 1993; SHI *et al.*, 1993; OZDEMIR *et al.*, 1994). Este fato foi bem documentado já em 1990 no estudo de GIRARDIN *et al.* que analisaram os níveis de TNF- α em 69 recém-nascidos de risco para infecção precoce, com idade gestacional entre 28 e 40 semanas. Os neonatos foram divididos em 3 grupos: G1: 9 recém-nascidos que apresentaram hemocultura ou cultura de líquor positiva, dos quais, 4 evoluíram com choque; G2: 11 recém-nascidos com cultura de aspirado gástrico positiva; G3: 49 controles. Os pacientes de G1 apresentaram níveis de TNF- α significativamente maiores do que os outros grupos, principalmente nos casos de choque séptico. A especificidade encontrada foi de 98% (GIRARDIN *et al.*, 1990).

ROMAN *et al.* em estudo prospectivo de 23 recém-nascidos sépticos, de termo, com menos de 3 dias de vida e peso médio de 2900g, encontraram altos níveis de TNF- α nos pacientes que evoluíram com choque. Nestes casos a sensibilidade e especificidade foram de 100% (ROMAN *et al.*, 1993).

O estudo de WILLIAMS *et al.* (1993) avaliou a produção de TNF por monócitos de cordão de recém-nascidos prematuros após estimulação com lipopolissacárides do *Streptococcus do grupo B*, e mostrou produção maior do que em monócitos de adultos. Os autores propuseram que em recém-nascidos prematuros, alterações na liberação e produção de TNF- α , podem representar um fator importante na susceptibilidade à infecção bacteriana e choque, especialmente em relação ao *Streptococcus do grupo B*.

Estes estudos, embora com número reduzido de recém-nascidos, demonstraram alta sensibilidade e especificidade do TNF- α no choque séptico, sugerindo correlação entre TNF- α e gravidade da doença.

De BONT *et al.* (1993) dosaram IL-1, IL-6 e TNF- α em recém-nascidos no momento da suspeita clínica de sepse precoce ou tardia. Sepse foi definida como quadro clínico sugestivo e hemocultura positiva ou suspeita clínica com evidência laboratorial de infecção. Do total de 18 pacientes estudados, 10 apresentaram sepse, sendo 8 com hemocultura positiva. A idade pós natal no grupo séptico variou de 1 a 15 dias, a média do peso de nascimento foi de 2005g e idade gestacional de 33 semanas, enquanto no grupo controle a idade pós natal foi de 4 ± 1 dia, e as médias de peso de nascimento e idade gestacional foram de 2867g e 36 semanas respectivamente. A IL-1 foi detectada em 9 dos 10 pacientes sépticos, porém em baixas concentrações. Os autores sugeriram que as baixas concentrações de IL-1 em neonatos poderiam justificar a falta de resposta febril frente às infecções. Outros autores documentaram aumento da IL-1 em prematuros com sepse precoce, com sensibilidade e especificidade de 83% e 86% respectivamente (BERNER *et al.*, 1998). Da mesma forma que são contraditórios os níveis de IL-1 em sangue de cordão, os valores encontrados em recém-nascidos sépticos também são conflitantes, talvez pelo número reduzido de pacientes ou pela heterogeneidade das amostras estudadas que envolvem recém-nascidos de termo e prematuros, com sepse precoce e tardia. Os níveis de TNF- α e IL-6 foram significativamente maiores nos recém-nascidos sépticos. Após o início da terapêutica e concomitante com a melhora clínica, houve diminuição dos níveis de TNF- α , IL-1 e IL-6.

A IL-6 é uma citocina bastante estudada no período neonatal. Devido à sua ação de induzir a produção de reagentes de fase aguda, muitos ensaios clínicos avaliaram sua utilização em conjunto com a PCR, como indicadores precoces de infecção neonatal. Um destes ensaios, procurou estabelecer se a associação destes dois marcadores era útil na detecção da sepse precoce. Os pacientes foram classificados em 4 grupos: G1: 18 recém-nascidos com sepse confirmada por hemocultura; G2A: 15 recém-nascidos com sepse clínica; G2B: 41 infectados, não sépticos e sem cultura positiva; G3: 54 controles; G4: 101 com infecção não confirmada. A idade pós natal variou de 1 a

86 dias, a idade gestacional de 26 a 40 semanas. A IL-6 foi detectada em níveis elevados nos grupos de recém-nascidos infectados com sensibilidade de 73% em G1 (sepsis confirmada), 87% em G2A (sepsis clínica), 68% em G2B (infectados, não sépticos). Em 75% dos recém-nascidos infectados, não se detectou a IL-6 após 24 horas da admissão no estudo. Dentre 18 recém-nascidos infectados que não apresentavam níveis mensuráveis de IL-6 na admissão, 10 apresentaram níveis elevados de PCR, sugerindo que a IL-6 não foi detectada devido a sua curta meia vida, mas induziu a síntese de PCR que pôde ser mensurada. Nos pacientes com hemocultura positiva e sepsis clínica com PCR negativa na admissão, a sensibilidade da IL-6 foi de 100% (BUCK *et al.*, 1994). Este estudo mostrou que a positividade da IL-6 depende do momento em que o neonato foi incluído no estudo. Nesta pesquisa não foi referido o peso de nascimento dos neonatos, e houve grande variação na idade gestacional e pós natal.

Estudo multicêntrico sobre infecções tardias de corrente sanguínea, com análise da IL-6 dentro de 48 horas da evolução do quadro, mostrou baixa sensibilidade e especificidade, 47% e 75% respectivamente, reforçando que esta citocina apresenta meia vida curta, portanto são necessárias coletas mais precoces para que sua dosagem seja útil no diagnóstico (BECK-SAGUE *et al.*, 1994).

Mais recentemente DOELLNER *et al.* (1998) estudaram 241 recém-nascidos com suspeita de infecção precoce e dosaram IL-6 e PCR na primeira semana de vida e 3 a 4 dias após. Os pacientes foram divididos em 5 grupos: G1: 24 recém-nascidos, idade gestacional média de 37 semanas, peso de nascimento médio de 3100g, com sepsis confirmada, sepsis clínica ou pneumonia; G2: 18 recém-nascidos, idade média de 36 semanas, peso semelhante a G1, com infecção provável; G3: 31 neonatos com 35 semanas e 2500g nos quais a infecção não pôde ser confirmada ou excluída; G4: 98 recém-nascidos com 34 semanas e 2900g, inicialmente com suspeita de infecção, porém não confirmada; G5: 70 controles com 36 semanas e 2900g. Os autores encontraram altos níveis de IL-6 em G1 e G2 (grupo de infectados) em comparação com G5 (controles). A detecção da IL-6 isoladamente mostrou sensibilidade de 78%, especificidade de 71% e valor preditivo negativo de 93%. Quando combinada com a PCR a

sensibilidade aumentou para 96% e a especificidade para 74%, com valor preditivo negativo de 99%. Em função destes resultados os autores concluíram que a avaliação em conjunto da PCR e da IL-6 pode identificar precocemente os recém-nascidos infectados (DOELLNER *et al.*, 1998).

Estudo clínico realizado por EDGARD *et al.* (1994) avaliou a contribuição diagnóstica da IL-6 e TNF- α em 60 neonatos, com suspeita de infecção. A idade gestacional variou de 23 a 39 semanas (média de 29 semanas), o peso de nascimento de 625g a 3625g (média de 1320g), sendo 15 com suspeita de infecção precoce e 45 com suspeita de infecção tardia. O sangue para as dosagens foi coletado no momento da suspeita clínica, antes do início da terapêutica. Do total de 60 pacientes estudados, 43 foram considerados infectados (25 com hemocultura positiva), 11 não infectados e 6 casos suspeitos. Os níveis de TNF- α não diferiram estatisticamente entre os grupos, e os níveis de IL-6 foram maiores no grupo infectado, porém com sensibilidade de apenas 31%, não se constituindo isoladamente bom teste diagnóstico.

Ainda em 1994, De BONT *et al.* avaliaram a eficácia da IL-6 e do TNF- α como marcadores precoces de infecção neonatal tardia em 55 recém-nascidos divididos em 3 grupos: G1: 15 recém-nascidos com sepse confirmada por hemocultura, idade gestacional média de 33 semanas e peso de nascimento médio de 2110g; G2: 18 recém-nascidos com suspeita clínica de sepse, idade gestacional e peso de nascimento semelhantes a G1; G3: 22 controles, com média de 36 semanas de idade gestacional e 2900g de peso. A idade pós natal média foi de 7 dias (0 - 47). Os recém-nascidos infectados apresentaram altos níveis de TNF- α e IL-6. O TNF- α mostrou sensibilidade de 73% e especificidade de 94% e a IL-6 sensibilidade de 80% e especificidade de 78%. Quando os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6 foram combinados para o diagnóstico de sepse neonatal a sensibilidade foi de 60% e a especificidade aumentou para 100%, sugerindo que a associação dos dois testes parece ser útil na exclusão do diagnóstico.

LEHRNBECHER *et al.* (1996) dosaram IL-6, IL-8 e ICAM-1 em sangue materno e de cordão, com objetivo de identificar precocemente infecção e observaram níveis elevados em cordão nos casos que evoluíram com sepse precoce. Os valores encontrados em sangue de cordão não se correlacionaram

com os níveis maternos, indicando que a resposta inflamatória do concepto frente ao quadro séptico é independente da resposta materna, e que a IL-6, IL-8 e ICAM-1 podem ser úteis no diagnóstico de infecção precoce.

Em estudo objetivando identificar a contribuição da IL-6 e dos receptores solúveis de TNF- α no diagnóstico de infecção precoce, foram analisados 217 recém-nascidos controles e 36 infectados (11 com sepse precoce confirmada por hemocultura e 25 com sepse clínica). A idade gestacional e o peso de nascimento foram semelhantes nos grupos com médias de 38 semanas (24 a 42 semanas) e 3000g (700 a 4700g) respectivamente. As dosagens foram realizadas no sangue de cordão ou nas primeiras 12 horas de vida. Os níveis de IL-6 foram significativamente maiores no grupo de recém-nascidos infectados. Com ponto de corte de 100pg/ml a sensibilidade foi de 83%, a especificidade 90% e o valor preditivo negativo de 97%, permitindo a exclusão do diagnóstico de infecção e conseqüentemente evitando o uso desnecessário de antibióticos. A determinação dos receptores solúveis para TNF- α não se mostrou útil, apresentando sensibilidade e especificidade bem menores do que a IL-6. Não houve correlação dos níveis de IL-6 e receptores de TNF- α com a idade gestacional, sugerindo que mesmo os recém-nascidos prematuros são capazes de sintetizá-los (MESSER *et al.*, 1996).

Outra pesquisa interessante e com resultados conflitantes em relação àqueles até então apresentados, foi realizada por PANERO *et al.* (1997). Os autores avaliaram a utilidade da IL-6 no diagnóstico de infecção precoce e tardia em recém-nascidos de UTI Neonatal, com dosagens no primeiro e segundo dias de evolução da doença. Os neonatos com infecção precoce foram divididos em 5 grupos: G1: 13 recém-nascidos com sepse confirmada por hemocultura; G2: 10 com sepse clínica; G3: 47 com outras doenças não infecciosas; G4: 29 com infecção não confirmada; G5: 43 controles. O peso de nascimento foi semelhante nos primeiros 4 grupos, a idade gestacional foi maior em G3, e no grupo controle os recém-nascidos eram de termo. A IL-6 esteve significativamente elevada no primeiro dia de dosagem em G1, G2, G3 e G4, sem diferença entre eles. No segundo dia as concentrações persistiram elevadas em G1 e G2 em comparação com G3, G4 e controles. A sensibilidade encontrada com ponto de corte de 70pg/ml foi de 69%, especificidade de 36%, valor preditivo positivo de

23% e valor preditivo negativo de 81%. É interessante observar que os autores deste estudo introduziram um grupo novo, formado por recém-nascidos com doenças não infecciosas como asfixia, síndrome do desconforto respiratório, hemorragia peri-intraventricular que podem simular infecções, e diferenciaram controles sadios de infecção não confirmada. Os resultados desta etapa do estudo, com altos valores de IL-6, mesmo em pacientes não infectados, sugerem que em recém-nascidos de alto risco, a presença de doenças não infecciosas poderia desencadear a síndrome da resposta inflamatória sistêmica com consequente liberação de IL-6.

Ainda neste estudo, foi investigado o papel da IL-6 na infecção tardia em 17 recém-nascidos com sepse confirmada e 51 controles. A idade gestacional, pós-natal e o peso de nascimento foram semelhantes. Os níveis de IL-6 no primeiro dia da sepse foram significativamente maiores em relação aos controles, com valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 100%. Os valores tornaram-se menores, sem diferença entre os dois grupos após o término da terapêutica (PANERO *et al.*, 1997). Neste estudo, apesar do número reduzido de pacientes, a IL-6 mesmo analisada isoladamente, mostrou ser excelente teste diagnóstico na sepse tardia (PANERO *et al.*, 1997).

Embora os trabalhos mostrem boa relação entre citocinas, PCR e infecção, há que se considerar a grande variação de peso de nascimento, idade gestacional e pós-natal, o pequeno número de amostras e a avaliação de forma não seriada destes marcadores. Neste sentido, merece destaque o estudo de NG *et al.* (1997) sobre citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α), selectina e PCR em recém-nascidos prematuros de muito baixo peso, com sepse tardia. A amostra foi uniforme quanto ao peso de nascimento, idade gestacional e idade pós-natal. As dosagens foram seriadas, realizadas na suspeita de infecção, no primeiro, segundo, quarto e sétimo dia de evolução da doença. Os pacientes foram classificados em 3 grupos: G1: 35 recém-nascidos com sepse confirmada; G2: 46 com suspeita não confirmada; G3: 20 controles. As concentrações de IL-6, TNF- α , IL-1 e selectina foram maiores em G1 no momento da suspeita de infecção. Todos estes marcadores apresentaram diminuição dos níveis séricos com o tratamento. O comportamento da PCR foi diferente. No momento da suspeita seu

nível era baixo, o pico ocorreu com 24 horas do quadro infeccioso, com redução a partir do quarto dia de evolução. A análise em conjunto da IL-6 com PCR na suspeita de infecção, ou da IL-6 com PCR ou TNF- α , no primeiro dia de evolução da doença foram úteis no diagnóstico de infecção tardia. Neste estudo, o nível sérico da IL-1 foi baixo, semelhante ao descrito em estudos prévios, o que poderia justificar a pouca resposta febril de recém-nascidos infectados (NG *et al.*, 1997). O grande mérito desta pesquisa foi a inclusão somente de recém-nascidos de muito baixo peso e a análise seriada em cinco momentos distintos da evolução da doença.

SILVEIRA & PROCIANOY (1999) estudaram a contribuição da IL-6, TNF- α , e IL-1 β na sepse precoce, em uma coorte de 117 recém-nascidos no período de um ano. Quatro grupos de estudo foram formados: G1: 13 RN com sepse confirmada por culturas; G2: 36 RN com sepse clínica; G3: 17 com sepse clínica e mães que receberam antibiótico intra-parto; G4: 51 RN que não receberam antibióticos. Os grupos foram semelhantes quanto à idade gestacional e peso de nascimento (todos maiores que 35 semanas e que 2500g), escore de Apgar, tipo de parto e concentrações de IL-1 β . As médias da IL-6 e TNF- α foram significativamente maiores nos grupos com sepse incluindo aquele de mães que receberam antibióticos. A combinação de IL-6 e TNF- α mostrou sensibilidade de 98%, valor preditivo negativo de 90% e valor preditivo positivo de 61%. Ambas as citocinas mostraram-se sensíveis no diagnóstico de sepse, no período neonatal imediato. A IL-1 β não foi bom marcador de sepse.

Uma metodologia bastante interessante foi utilizada em estudo multicêntrico coordenado por KÜSTER envolvendo 6 Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, com 101 recém-nascidos, todos de muito baixo peso. Os pesquisadores procuraram conhecer o perfil da IL-6, PCR e do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1r) na sepse tardia, no período de 4 dias antecedendo o quadro séptico até 5 dias após o diagnóstico. As amostras para dosagens eram obtidas no momento da coleta de exames de rotina em cada Unidade. Os recém-nascidos foram classificados em 3 grupos: G1: 21 prematuros com sepse confirmada por hemocultura ou evidências clínicas e laboratoriais de infecção; média de peso de nascimento de 905g e 27 semanas de idade gestacional; G2: 20 prematuros não infectados, média de 1180g e 29 semanas; G3: 60 prematuros

com suspeita de sepse não confirmada, com peso médio de 890g e idade gestacional de 27 semanas. A IL-6 e o IL-1r foram bons preditores da sepse pois aumentaram significativamente 2 dias antes do seu diagnóstico. A sensibilidade do IL-1r, da IL-6 e da PCR no momento da suspeita da infecção foi de 93%, 86% e 43% respectivamente (KÜSTER *et al.*, 1998). O IL-1r e a IL-6 foram melhores que a PCR na predição de sepse nos dois dias anteriores ao diagnóstico clínico. A dosagem destas citocinas pode auxiliar no início precoce da antibioticoterapia com conseqüente melhora no prognóstico da sepse.

ÖNAL *et al.* (1999) também investigaram os níveis de IL-6 em 68 recém-nascidos de termo e prematuros, divididos em 3 grupos: G1: 14 recém-nascidos com sepse confirmada, G2: 20 com sepse provável e G3: 34 sem infecção. Os pesos e as idades gestacionais foram semelhantes nos 3 grupos. As concentrações de IL-6 foram significativamente maiores nos grupos 1 e 2, com sensibilidade de 74%, especificidade de 91%, valor preditivo positivo de 77% e valor preditivo negativo de 89%. Os autores concluíram que a IL-6 pode ser um marcador útil no diagnóstico da sepse neonatal.

A capacidade da IL-6 em distinguir quadros de insuficiência respiratória neonatal, de causa infecciosa e não infecciosa, foi investigada por KÄLLMAN *et al.* (1999) em 87 recém-nascidos divididos em 5 grupos de estudo: G1: 15 com sepse confirmada; G2: 15 com sepse clínica; G3: 10 com síndrome do desconforto respiratório (SDR); G4: 19 com taquipnéia transitória do recém-nascido (TTRN); G5: 28 controles. A IL-6 mostrou-se útil na diferenciação do quadro séptico suspeito ou confirmado, com a TTRN mas não em relação à SDR, fato este atribuído à participação dos mediadores inflamatórios na gênese da SDR, dificultando o diagnóstico diferencial com infecção pela dosagem da IL-6.

A partir de meados da década de 90, intensificaram-se os estudos sobre a IL-8, com o objetivo de avaliá-la como citocina amplificadora da resposta inflamatória nas doenças neonatais. Os estudos até então realizados com amostras pequenas, envolvendo recém-nascidos de termo e prematuros, na sua grande maioria com análise não sequencial, mostravam que a IL-8, assim como a IL-6, poderiam ser úteis como marcadores de infecção (SHIMOYA *et al.*, 1992; EDGARD *et al.*, 1994; LEHRNBECHER *et al.*, 1996; BERNER *et al.*, 1998).

Na sepse neonatal a IL-8 tem sido bastante valorizada pelo seu poder de amplificar e perpetuar a resposta inflamatória, sendo atualmente considerada como importante marcador diagnóstico de infecção (SCHOLLIN, 2001).

Em 1992, SHIMOYA *et al.* estudaram a IL-8 em sangue de cordão de 38 recém-nascidos prematuros, filhos de mães com corioamnionite e 34 controles. Nos prematuros infectados foram obtidos níveis mais elevados e diretamente relacionados com a gravidade da corioamnionite. A IL-8 mostrou-se útil na detecção precoce de corioamnionite, com maior sensibilidade e especificidade do que os testes habitualmente utilizados, como contagem de leucócitos, PCR e IG-M. Um achado interessante foi que os recém-nascidos cujas mães receberam esteróides antenatal para aceleração da maturidade pulmonar fetal, apresentaram baixos níveis de IL-8, sugerindo efeito anti-inflamatório do esteróide no concepto.

Com o objetivo de diagnosticar precocemente a infecção neonatal precoce e tardia, a IL-8 foi avaliada em conjunto com a PCR e a procalcitonina em 162 recém-nascidos, divididos em 3 grupos: G1:9 recém-nascidos com sepse confirmada; G2: 37 com sepse clínica; G3: 116 controles. A idade gestacional variou de 23 a 42 semanas e os neonatos tinham menos que 11 dias de vida. A procalcitonina que experimentalmente aumenta 4 a 6 horas após injeção de lipopolissacárides bacterianos e é considerada como marcador de infecção em crianças e adultos, apresentou baixa sensibilidade e especificidade, não se mostrando bom marcador de infecção em recém-nascidos. A IL-8 combinada ou não com a PCR mostrou-se mais sensível e específica no diagnóstico de infecção (FRANZ *et al.*, 1999a).

Um aspecto importante relacionado à infecção neonatal é o uso indevido de antibióticos, resultando em multirresistência microbiana, risco de morte dos pacientes e aumento dos custos hospitalares. Nesse sentido, a IL-8 começou a ser investigada isoladamente ou em conjunto com outros marcadores, como método diagnóstico que possa restringir o uso inadvertido de antibióticos em Unidades Neonatais (FRANZ *et al.*, 1999b; FRANZ *et al.*, 2001; SCHOLLIN, 2001).

FRANZ *et al.* (1999b) investigaram o papel da IL-8 e da PCR no diagnóstico de infecção neonatal precoce e tardia, com o objetivo de reduzir o uso desnecessário de antibióticos e consequentemente os custos hospitalares. Foram estudados recém-nascidos de termo e prematuros na suspeita de infecção, em dois períodos. No primeiro período, foram estudados 260 neonatos. A IL-8 foi dosada, mas independente do seu valor a terapêutica foi iniciada na suspeita de infecção desde que PCR > 10mg/L e/ou índice neutrofilico > 0,2. Na segunda etapa com 215 recém-nascidos, o uso de antibióticos ocorreu na suspeita clínica de infecção associada a PCR > 10mg/L e/ou IL-8 >53pg/ml. A avaliação da IL-8 diminuiu a terapia antimicrobiana na suspeita de infecção para 58% dos casos comparada com 71% de uso quando o início da terapêutica baseava-se em sinais clínicos, PCR e/ou índice neutrofilico. A combinação da IL-8 e PCR, mostrou-se útil no diagnóstico precoce de infecção bacteriana e na redução da terapêutica desnecessária.

Estes autores posteriormente desenharam o mesmo estudo para infecção precoce. Primeiramente, a IL-8 foi dosada em 378 neonatos de termo e prematuros, com suspeita de sepse precoce, sendo 7 confirmada com cultura, 63 com sepse clínica e 308 não infectados. À semelhança do estudo anterior foram avaliados a PCR, o índice neutrofilico e culturas de sangue. A antibioticoterapia foi instituída baseada na clínica e alterações de PCR e/ou índice neutrofilico. A IL-8 \geq 70pg/ml e/ou PCR > 10mg/L mostraram sensibilidade de 92% e especificidade de 74% na sepse confirmada por culturas. Houve aumento de IL-8 em 62% dos RN infectados com PCR ainda normal. Na segunda etapa do estudo, a IL-8 foi dosada em 331 recém-nascidos que apresentaram sinais clínicos de infecção precoce ou história de infecção intra-amniótica: 7 recém-nascidos com sepse confirmada; 105 com sepse clínica; 219 não infectados. O grupo controle foi constituído de 47 termos saudáveis. A antibioticoterapia foi restrita àqueles com suspeita de infecção que apresentaram aumento de IL-8 e/ou PCR (n=158). Outras 39 crianças receberam antibióticos com base em sinais clínicos independente dos valores de IL-8 e PCR. Dos 150 recém-nascidos não infectados nos quais o índice neutrofilico, a IL-8 e a PCR foram avaliados, o tratamento teria sido indicado em 93 recém-nascidos, sendo 77 em função do índice neutrofilico e/ou PCR e 16 por sinais clínicos. Entretanto, com a dosagem da IL-8 e/ou PCR,

a terapêutica foi iniciada em apenas 55 recém-nascidos. Assim, houve redução do uso desnecessário de antibióticos em 40% dos casos, mostrando que a IL-8 pode ser útil como teste diagnóstico também para infecção precoce, reduzindo o uso indevido de antibióticos (FRANZ *et al.*, 2001).

MEHR *et al.* (2001) investigaram o valor da IL-6 e IL-8 em recém-nascidos com infecção neonatal. Um total de 101 pacientes foram avaliados durante a hospitalização com exame físico, hemocultura, PCR e dosagens de IL-6 e IL-8. Os neonatos foram classificados em 4 grupos: G1: 11 recém-nascidos com infecção confirmada, com cultura positiva; G2: 12 com infecção provável; G3: 52 com suspeita de infecção que não pôde ser confirmada ou excluída; G4: 26 controles. As concentrações médias de IL-6 e IL-8 foram significativamente maiores no grupo com infecção confirmada em relação aos outros grupos. Os pontos de corte de alta acurácia, IL-6 > 175pg/ml e IL-8 > 28pg/ml apresentaram sensibilidade de 80% e 82% respectivamente, e especificidade de 91% e 81%, respectivamente. Nos recém-nascidos com infecção provável a IL-6 e a IL-8 apresentaram baixa acurácia diagnóstica.

A partir do conhecimento do papel da IL-8 na amplificação da resposta inflamatória e do seu grande potencial quimiotático, surgiram pesquisas avaliando-a em outros fluidos corporais internos entre eles o lavado broncoalveolar, como marcador prognóstico da displasia broncopulmonar (GRONECK *et al.*, 1994; JONES *et al.*, 1996; TAKASAKI *et al.*, 1996; KWONG *et al.*, 1998) e a urina, como marcador diagnóstico de infecção urinária e prognóstico de lesões renais persistentes (TULLUS *et al.*, 1994; ROILIDES *et al.*, 1999; JANTAUSCH *et al.*, 2000; RAO *et al.*, 2001).

Na patogênese da displasia broncopulmonar a IL-8 promove quimiotaxia de neutrófilos, acumulando e ativando estas células nos pulmões e perpetuando a resposta inflamatória. (TAKASAKI & OGAWA, 1997; KWONG *et al.*, 1998).

A pesquisa da IL-8 em urina também tem sido investigada na literatura em quadros tumorais, infecções locais e sistêmicas, com objetivo de conhecer melhor a fisiopatologia, estabelecer a acurácia diagnóstica desta citocina e a sua relação com o prognóstico de doenças.

TULLUS *et al.* (1994) dosaram a IL-6 e IL-8 na urina de crianças com pielonefrite em fase aguda e acompanharam os pacientes por um ano, realizando cintilografia com DMSA. As crianças com maiores níveis de IL-6 urinária/creatinina urinária (ur/cr), evoluíram com alterações na cintilografia. Não houve correlação entre IL-8 urinária e alterações na cintilografia com DMSA. Os autores concluem que a IL-6 ur/cr poderia ser empregada como indicador de risco de lesão renal persistente.

Em 1999, ROILIDES *et al.* estudaram 27 recém-nascidos com infecção urinária e 23 controles. A IL-6 e a IL-8 foram dosadas em sangue e urina no início e na segunda semana de tratamento. Ambas não apresentaram aumento nos níveis séricos. Níveis aumentados da IL-6 e da IL-8 ocorreram apenas na urina dos recém-nascidos com infecção urinária, sugerindo produção local destas citocinas. Houve correlação da IL-6 urinária com alterações na cintilografia com DMSA, mostrando ser esta, marcador prognóstico de cicatriz renal após infecção. Na segunda semana de tratamento as citocinas foram indetectáveis na urina. Os autores sugerem que os patógenos isolados na infecção urinária poderiam ser os responsáveis pela produção local de citocinas.

Estudo interessante foi realizado por STIEMER *et al.* (1997) que analisaram a IL-8 em líquido amniótico e urina de mulheres grávidas com rotura prematura de membranas e sua relação com infecção. Estas gestantes estavam entre 25 e 37 semanas de gestação e foram divididas em 3 grupos: G1: 22 gestantes sem infecção; G2: 32 com sinais mínimos de infecção; G3: 17 com sinais graves de infecção. Os níveis de IL-8 no líquido amniótico foram maiores do que a IL-8 ur/cr. As gestantes que apresentavam sinais graves de infecção (G3), tiveram níveis urinários de IL-8 significativamente maiores que os demais grupos. Este estudo sugere que a IL-8 urinária reflete a infecção intra-amniótica, tem meia vida maior do que outras citocinas e aumenta durante a infecção, em decorrência do mecanismo de *feed back* positivo. A forma como a IL-8 chega na urina ainda não está clara. Sugere-se que as hemácias tenham receptores para IL-8, transportando esta citocina até o rim e após a filtração glomerular ela poderia ser detectada na urina (STIEMER *et al.*, 1997).

Não são muitos os estudos sobre a IL-8 como marcador de infecção no período neonatal. Na sepse precoce já foi demonstrado que a IL-8

sérica pode ser útil no diagnóstico de infecção (SHIMOYA *et al.*, 1992; EDGARD *et al.*, 1994; LEHRNBECHER *et al.*, 1996) e na redução do uso inadvertido de antibióticos (FRANZ *et al.*, 2001). Na infecção neonatal (precoce ou tardia), a IL-8 sérica também tem se mostrado bom marcador diagnóstico (FRANZ *et al.*, 1999 a; FRANZ *et al.*, 1999b). Até o momento não encontramos na literatura trabalhos específicos da IL-8 em prematuros com sepse tardia. Também não existe relato de dosagem da IL-8 na urina de recém-nascidos com sepse neonatal.

Por estes motivos, esta pesquisa foi proposta visando responder os seguintes questionamentos:

- > Quais os níveis séricos e urinários da IL-8 em recém-nascidos prematuros com sepse tardia ?
- > Os níveis urinários da IL-8 auxiliam no diagnóstico da sepse tardia em prematuros?

OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral desta pesquisa foi determinar os níveis séricos e urinários da Interleucina 8 (IL-8) em recém-nascidos prematuros com sepse tardia e investigar se os níveis séricos e urinários são úteis no diagnóstico da sepse.

Específicos

Os objetivos específicos foram:

- > comparar os valores da IL-8 sérica e urinária em recém-nascidos prematuros com sepse tardia e em prematuros não infectados;
- > conhecer a evolução dos níveis séricos e urinários da IL-8 nas primeiras 48 horas do quadro séptico;
- > correlacionar os níveis séricos e urinários da IL-8 nos recém-nascidos prematuros sépticos;
- > calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da IL-8 sérica e urinária na sepse tardia;
- > comparar a acurácia da IL-8 sérica e urinária com a do hemograma e da proteína C reativa na sepse tardia.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

1. Casuística

1.1 - Aspectos éticos

O estudo foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HC FMB - UNESP (Anexo 1), mantendo o anonimato dos recém-nascidos incluídos, que foram identificados por números. A aprovação inicial ocorreu em junho de 1999 e no projeto constava a avaliação de outras citocinas juntamente com a IL-8. Em 2001, foi reiterada a aprovação para a dosagem apenas da IL-8.

As variáveis clínicas e laboratoriais estudadas, com exceção à IL-8, já eram avaliadas de rotina em todo recém-nascido infectado na UTI Neonatal da FMB - UNESP, e os benefícios esperados com o estudo justificaram sua realização.

O consentimento da mãe ou familiar responsável, foi obtido por declaração escrita, após esclarecimento sobre os objetivos do estudo (Anexo 2).

1.2 - Descrição da amostra

A casuística deste estudo foi constituída por 36 recém-nascidos prematuros menores que 37 semanas de idade gestacional, sendo 19 com quadro de sepse tardia e 17 não infectados. Todos os pacientes estiveram internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, no período de fevereiro a novembro de 2001.

1.3 - Definição da sepse neonatal tardia

Sepse foi considerada como evidência clínica de infecção associada a alterações de temperatura (hipertermia: $T > 37,5^{\circ}\text{C}$ ou hipotermia: $T < 36,0^{\circ}\text{C}$) e/ou taquicardia: $\text{FC} > 160\text{bpm}$ e/ou taquipnéia: $\text{FR} > 60\text{ ipm}$ e/ou alteração na contagem do número de leucócitos: $< 5.000/\text{mm}^3$ ou $>$

15.000/mm³ (modificado de SAEZ-LLORENZ & Mc CRACKEN, 1993). Também foram valorizados no diagnóstico, sinais de hipotensão (PAM < 30mmHg para prematuros menores que 1500g e < 40 mmHg para prematuros menores que 2500g) e/ou hipoperfusão tecidual representada por acidose (pH < 7,3) ou oligúria (débito urinário < 1ml/kg/hora). Considerou-se como sepse tardia as manifestações ocorridas após 48 horas de vida (GAYNES *et al.*, 1996).

1.4 - Padrão ouro

O padrão ouro corresponde ao diagnóstico de certeza do quadro séptico. Neste estudo foi considerado como padrão ouro o diagnóstico clínico e laboratorial conforme definido anteriormente, associado à confirmação por culturas (sangue, urina ou líquor) ou a presença de meningite.

1.5 - Tipo de estudo

Estudo prospectivo, caso controle, com dois grupos e dois momentos de avaliação:

- > **Grupo séptico (S):** prematuros sépticos;
- > **Grupo não infectado (NI):** prematuros não infectados;
- > **Momento 1 (M1):** início do estudo
- > **Momento 2 (M2):** 24 - 48 horas após o início do estudo

1.6 - Local do estudo e características da Unidade

O estudo foi realizado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (HC - FMB), no período de fevereiro a novembro de 2001.

A UTI Neonatal é considerada Unidade nível 3 pelo Sistema Único de Saúde e atende recém-nascidos provenientes do Centro Obstétrico, do Berçário Anexo à Maternidade, de domicílios e da DIR XI que compreende

hospitais de Botucatu e toda região. Foi inaugurada em 1986 com 3 leitos em uma sala do Berçário Anexo à Maternidade da FMB. Em 1992 foi transferida para nova área física próxima à Maternidade, com capacidade total para 17 leitos, mas com infra-estrutura e recursos humanos adequados para 10 leitos. Pela elevada demanda, o atendimento diário é em média de 12 pacientes com total aproximado de 40 internações mensais (UNESP, 2002).

A taxa de infecção hospitalar oscila em torno de 35%, constituindo-se em um dos principais problemas da Unidade (UNESP, 2002). A incidência de sepse tardia também é alta, chegando a ocorrer em até 20% dos prematuros de muito baixo peso, nos quais é uma das principais causas de mortalidade (BENTLIN, 1997).

Estes dados justificam uma criteriosa vigilância clínica e laboratorial da infecção hospitalar nos recém-nascidos internados na UTI Neonatal. De acordo com o protocolo de vigilância padronizado na Unidade, na suspeita clínica de infecção é coletado material biológico para realização de exames que possam auxiliar no diagnóstico de infecção, entre estes: hemograma completo com contagem de plaquetas, dosagem da proteína C reativa (PCR), hemocultura, cultura de líquido e urina; Rx de tórax e eventualmente outros exames, também são realizados na busca de foco infeccioso. Os exames são repetidos de forma individualizada conforme a evolução de cada paciente. Nos casos onde se tem confirmação diagnóstica, repete-se em 48 horas para avaliar a resposta terapêutica; nos recém-nascidos com piora progressiva, independente da terapêutica instituída, repete-se no momento em que se julgar necessário; e naqueles que apresentam alterações clínicas sugestivas, mas o hemograma e a PCR mostram-se normais, repete-se em 12 a 24 horas para definir diagnóstico e terapêutica ou excluir infecção.

1.7 - Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os recém-nascidos prematuros nascidos ou não no Serviço, que apresentaram suspeita clínica de sepse, desde que a idade pós-natal estivesse entre 3 e 28 dias de vida, a idade gestacional entre 25 semanas e 36 semanas e 6 dias, o peso de nascimento fosse superior a

750 gramas e não tivessem recebido qualquer tipo de imunoterapia. Também foram critérios de inclusão: ausência de malformações múltiplas, ausência de evidência clínica ou sorológica de infecção congênita e os pais ou responsáveis terem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

1.8 - Critérios de exclusão

Os recém-nascidos excluídos foram aqueles que evoluíram com infecção localizada não caracterizada como sepse e que receberam tratamento, aqueles nos quais não foi possível a obtenção de todos os parâmetros de investigação nos dois momentos estudados e os óbitos ocorridos em período inferior a 24 horas de inclusão no estudo. Os recém-nascidos nos quais o diagnóstico de infecção foi afastado, foram mantidos no estudo como grupo de não infectados.

1.9 - Formação de grupos e momentos de coleta

No momento da suspeita clínica de infecção os recém-nascidos foram submetidos à coleta de material biológico para realização de exames conforme o protocolo de vigilância da Unidade. Em um período de até 48 horas de vigilância, de acordo com a evolução clínica e laboratorial dos recém-nascidos, foram constituídos 2 grupos de estudo:

- > **Grupo séptico (S):** recém-nascidos prematuros com sepse tardia caracterizada por alterações clínicas e laboratoriais, desde que afastadas outras causas para tais alterações e confirmada por cultura positiva em fluidos corporais (sangue, urina ou líquido) ou presença de meningite;
- > **Grupo não infectado (NI):** recém-nascidos prematuros nos quais foi excluído o diagnóstico de infecção ou sepse tardia. O diagnóstico de infecção foi afastado em um período de até 48 horas do início do estudo, em função do desaparecimento dos sinais clínicos que sugeriram infecção, associado à não confirmação laboratorial da mesma, ou seja, o

hemograma e a PCR não mostraram alterações e as culturas foram negativas.

As dosagens laboratoriais foram realizadas em dois momentos:

- > **Momento 1 (M1):** primeiras 12 horas do início do quadro, quando da suspeita clínica de sepse tardia;
- > **Momento 2 (M2):** 24 - 48 horas após o início do estudo.

A coleta de material biológico para a segunda dosagem (M2) seguiu a rotina de vigilância de infecção do Serviço. A dosagem de IL-8 nos 2 grupos foi realizada 48 horas após o início do estudo.

2. Variáveis de Estudo

Preenchidos os critérios de inclusão e após a obtenção do consentimento dos pais ou responsáveis, o paciente foi protocolado (Anexo 3), e seus dados tabulados pelo autor da pesquisa. No protocolo constavam: dados demográficos, dados do parto, procedimentos de risco, avaliação clínica, estágios da sepse, avaliação laboratorial com hemograma, escore de Rodwell, glicemia, PCR, líquido, culturas (sangue, urina e líquido) e os valores séricos e urinários da IL-8.

As variáveis estudadas foram classificadas em:

- > **Clínicas;**
- > **Laboratoriais;**
- > **Interleucina 8 sérica e urinária.**

2.1 - Variáveis Clínicas

A avaliação inicial do recém-nascido consistiu de exame físico geral e sistematizado da pele e anexos, segmento cefálico, tórax, abdome, genitais, extremidades e exame neurológico, realizado nas primeiras horas de evolução do quadro. O exame inicial foi realizado pelo autor do trabalho e o seguimento evolutivo do paciente pela equipe médica fixa da UTI Neonatal, com supervisão do autor. Também foram valorizados os sinais vitais e demais controles realizados pela equipe de enfermagem, a cada 4 horas: temperatura axilar, frequência cardíaca, frequência respiratória, débito urinário, drenagem por sonda gástrica, evacuações (número, consistência e aspecto), perímetro abdominal, pressão arterial não invasiva (aferida em aparelhos DIXTAL[®]).

Caracterização dos recém-nascidos

Os neonatos foram caracterizados e comparados entre si quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, idade pós-natal, sexo, adequação do peso para a idade gestacional, tipo de parto, Apgar de primeiro e quinto minutos, reanimação em sala de parto. Também foram identificadas as doenças mais frequentes em cada grupo como síndrome do desconforto respiratório, infecção prévia, persistência do canal arterial, hemorragia peri-intraventricular.

Na avaliação da idade gestacional considerou-se preferencialmente a estimativa calculada pela data da última menstruação desde que não houvesse dúvida, seguido da ultra-sonografia obstétrica realizada precocemente, antes da vigésima semana de gestação e como terceira opção a avaliação somática e neurológica do recém-nascido pelo método padronizado no Serviço, o New Ballard (BALLARD *et al.*, 1991).

A classificação quanto à idade gestacional seguiu os critérios adotados no Serviço conforme padronização da Organização Mundial de Saúde (OMS) que considera prematuro todo recém-nascido com menos de 37 semanas de idade gestacional (TRINDADE, 1999).

Para avaliar a adequação do peso à idade gestacional utilizou-se a curva de Alexander. Foram classificados como adequados para a idade

gestacional (AIG) os recém-nascidos que se encontravam entre os percentis 10 e 90, como pequenos para idade gestacional (PIG) os abaixo do percentil 10 e grandes para a idade gestacional (GIG) aqueles acima do percentil 90 (ALEXANDER *et al.*, 1996).

O Boletim de Apgar (APGAR, 1953) definiu as condições de vitalidade ao nascimento. De acordo com o escore obtido no primeiro minuto foi definido o grau de depressão neonatal. No quinto minuto foram valorizados os escores menores ou iguais a 6 que caracterizam a asfixia neonatal.

A reanimação neonatal, nos nascimentos ocorridos no Serviço foi realizada de acordo com as normas do programa de Reanimação Neonatal da Sociedade de Pediatria de São Paulo e Sociedade Brasileira de Pediatria, em consonância com a Academia Americana de Pediatria (AAP & AHA, 2000).

Os recém-nascidos também foram caracterizados quanto a presença de procedimentos como cateterismo de vasos umbilicais, disseções venosas, cirurgias, drenagens, intubação orotraqueal, utilização de nutrição parenteral e antibioticoterapia prévia. O autor avaliou o número e a presença dos mesmos no paciente, no período de até 48 horas antes da entrada no estudo.

Por meio de rigorosa vigilância clínica e laboratorial dos recém-nascidos prematuros sépticos, caracterizou-se a evolução do quadro para seus estágios mais avançados, a associação com meningite e a ocorrência de óbitos. Os estágios da sepse foram definidos conforme proposto por SAEZ-LLORENS & Mc CRACKEN, 1993:

- > Choque séptico: sepse com hipotensão, não responsiva à ressuscitação hídrica;
- > Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas: comprometimento progressivo da perfusão de órgãos, representado por qualquer combinação de distúrbios como coagulação intravascular disseminada (CIVD), síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), insuficiência renal, hepática e disfunção neurológica.

A meningite foi caracterizada pelo aumento da celularidade líquórica, acompanhada de aumento na proteinorraquia e ou diminuição na glicorraquia, de acordo com os valores propostos para a idade gestacional por RODRIGUEZ *et al.* (1990).

Os óbitos foram analisados quanto ao tempo de ocorrência, na tentativa de estabelecer uma relação causal com o quadro séptico. Foram considerados diretamente relacionados à sepse, os óbitos ocorridos durante as primeiras 72 horas de evolução, e óbitos provavelmente relacionados à sepse aqueles ocorridos na vigência do tratamento, desde que não houvesse intercorrência para justificá-los. Em todos os casos de óbito, foi solicitado o consentimento dos pais para realização do exame anátomo-patológico.

2.2 - Variáveis Laboratoriais

Hemograma e dosagens bioquímicas

Os exames laboratoriais utilizados no diagnóstico do processo infeccioso incluíram: hemograma completo com análise específica dos leucócitos, índice neutrofilico (relação das formas jovens/neutrófilos totais), relação I/M (formas imaturas/maduras), contagem plaquetária; dosagem da proteína C reativa (PCR); glicemia. Foi calculado o escore de Rodwell que avalia o conjunto de alterações em 7 parâmetros obtidos no hemograma, com pontuação ≥ 3 , sugestiva de infecção (RODWELL *et al.*, 1988). Os valores de referência de hemograma, PCR, glicemia e escore de Rodwell encontram-se nos Anexos 4, 5, 6 e 7 respectivamente.

Líquor

Pela frequente associação de sepse com meningite, a coleta de líquido foi realizada em todos os prematuros sépticos (Grupo S), que apresentavam condições hemodinâmicas para a coleta, contagem de plaquetas $\geq 100.000/\text{mm}^3$ e ausência de distúrbios da coagulação (KLEIN & MARCY, 1995;

JOSHI & BAAR, 1998). A punção lombar foi realizada nas primeiras 24 a 48 horas do início do estudo após a definição dos grupos e os recém-nascidos considerados não infectados (Grupo NI) não foram submetidos à coleta. A presença de meningite associada à alterações clínicas e laboratoriais que definiram o quadro séptico, constituiu-se em um dos critérios do padrão ouro. Os valores líquidos de referência encontram-se no Anexo 8.

Culturas

Outro critério utilizado na definição do padrão ouro, foi a positividade em cultura dos seguintes fluidos corporais: sangue, urina ou líquido.

No momento da suspeita de infecção foi coletado sangue e urina de todos os pacientes para cultura. A cultura de líquido foi realizada em todos os pacientes que foram submetidos à coleta do mesmo.

Considerações quanto às coletas e dosagens

A coleta de material biológico para análise laboratorial foi realizada pelo médico responsável pelo paciente e ocorreu em dois momentos:

- > **M1:** início do estudo, no momento da suspeita clínica da sepse;
- > **M2:** 24 - 48 horas após o início do estudo.

Em M1 foram coletadas as seguintes amostras: 2,5ml de sangue por punção periférica, com máximo rigor de assepsia, distribuídos em 4 tubos, para dosagem de IL-8, hemograma completo com contagem de plaquetas, PCR e hemocultura; 2ml de urina coletada por saco coletor após assepsia da região genital, colocada em 2 tubos, um para dosagem da IL-8 e outro para creatinina urinária e urina tipo I; 1ml para cultura de urina, colhido por punção supra púbica (na falha ou impossibilidade da punção, a urina foi obtida por cateterismo vesical); 2ml de líquido por punção lombar, distribuído em 2 frascos, sendo um para análise bioquímica e outro para cultura. O líquido foi coletado entre M1 e M2 pois dependia das condições clínicas, hemodinâmicas e laboratoriais de cada paciente

Para a realização das culturas o material (sangue, urina e líquido) foi coletado com todo rigor de assepsia e imediatamente encaminhado ao laboratório de microbiologia.

No segundo momento de estudo (M2) foi coletado material biológico para a realização dos mesmos exames, exceto as culturas e o líquido. O volume de sangue retirado neste momento foi de 1,5ml.

Para a realização dos exames houve colaboração e participação de vários laboratórios do HC-FMB-UNESP, de acordo com as suas especialidades. Sendo assim:

- > Laboratório de urgência: dosagens da PCR, urina tipo I, creatinina urinária;
- > Laboratório do hemocentro: hemograma completo e contagem plaquetária;
- > Laboratório de líquido: análise citológica e bioquímica;
- > Laboratório de microbiologia: culturas de sangue, urina e líquido;
- > Laboratório da Unidade Neonatal: armazenamento de soro e urina a -20°C, até o encaminhamento ao laboratório experimental do Departamento de Pediatria;
- > Laboratório experimental do Departamento de Pediatria: armazenamento de sangue e urina a -70°C, para posterior dosagem da IL-8;
- > Laboratório experimental da Disciplina de Moléstias Infecciosas - dosagens da IL-8 sérica e urinária.

Na realização dos exames laboratoriais foram utilizadas as técnicas padronizadas em cada Setor, apresentadas a seguir:

- > Hemograma completo com contagem de plaquetas: exame realizado com 0,5ml de sangue, pelo contador T 890 da Coulter® e leitura de lâmina em microscópio por técnicos do laboratório;
- > Proteína C reativa: dosagem semi-quantitativa com 0,5ml de sangue, pelo método de aglutinação do látex;
- > Glicemia: dosagem quantitativa com uma gota de sangue periférico, com leitura realizada em glicosímetro da Johnson & Johnson®;

- > Análise bioquímica e citológica do líquido: realizada com 1ml de líquido e leitura em lâmina por técnicos do laboratório;
- > Hemocultura: foi empregado o BACTEC PEDS PLUS/F[®] para pacientes pediátricos que requer 1 ml de sangue e identifica agentes Gram-positivos, Gram-negativos e fungos. Os frascos de cultura contém caldo de extrato de soja-caseína com resinas que favorecem o crescimento de microorganismos, e apresentam ainda sensores que detectam o CO₂ produzido pelos microorganismos. Uma vez constatada a produção de CO₂, que pode ocorrer horas após a incubação dos frascos, o material é submetido a bacterioscopia e semeado em meios de cultura (GRAY *et al.*, 1998).
- > Urocultura: o material foi semeado em meio de ágar-sangue e Mc Conkey;
- > Cultura de líquido: o material foi semeado em meio de ágar-sangue e ágar-chocolate.

2.3 - Interleucina 8 sérica e urinária

Técnica de coleta

Para a dosagem sérica da IL-8 foi coletado 0,5ml de sangue por punção periférica, em tubo seco do tipo Ependorff[®], imediatamente centrifugado durante 5 minutos em centrífuga CELM[®]. O soro obtido foi congelado e estocado a -70°C no laboratório experimental de Pediatria. A urina coletada para dosagem da IL-8 foi estocada em tubos de Ependorff[®] a -70° C no mesmo laboratório.

Até o envio das amostras para o freezer a -70°C, o material foi armazenado a -20°C por um período de até 48 horas no laboratório da Unidade Neonatal. O material foi descongelado 24 horas antes do início das dosagens e todas as dosagens foram realizadas em um único dia, no laboratório experimental da Disciplina de Moléstias Infecciosas.

Método de dosagem

Utilizou-se ensaios de síntese de citocinas após estímulos por mitógenos, que mostram a capacidade de comunicação intercelular, fenômeno fundamental para o funcionamento do sistema imunitário. Estes foram quantificados por meio de ensaio imuno enzimático (ELISA), que determina os clones produtores de quimiocinas, permitindo a quantificação das células produtoras de cada citocina.

As concentrações da Interleucina 8 no soro e na urina dos pacientes estudados foram determinadas usando o Kit ELISA (R&D Systems®, Minneapolis, MN), que emprega a técnica tipo *sanduíche*, ou seja, padrões, amostras e conjugados são pipetados na placa e se houver IL-8 esta é apresentada como "*sanduíche*" pelo anticorpo imobilizado e pelo anticorpo monoclonal específico para IL-8. Após lavagem para remoção de outras substâncias não ligadas ao anticorpo e ou reagentes, um substrato ácido é adicionado à solução e desenvolve coloração azul, na proporção da quantidade de IL-8 ligada.

Após o descongelamento das amostras, microplacas de 96 orifícios foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IL-8. Nestas placas foram adicionados 50µl de soro e de urina dos pacientes em estudo (diluição 1:2), 50µl dos controles positivos e negativos e 50µl da IL-8 recombinante humana nas concentrações de 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,2pg/ml para obtenção da curva padrão. A seguir, 100µl de conjugado policlonal anti-IL-8 marcado com peroxidase foi adicionado às placas com posterior incubação por 3 horas à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram realizadas 4 lavagens com solução detergente. A seguir foi adicionado aos orifícios das placas, o substrato formado por peróxido de hidrogênio (0,02%) e tetrametilbenzina (2%). A interrupção da reação foi realizada 30 minutos após, utilizando-se ácido sulfúrico 1M. A intensidade da cor foi medida por leitura da densidade óptica em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan®) em comprimento de onda de 450nm. As concentrações de IL-8 presentes no soro e na urina, foram calculadas a partir dos resultados obtidos na curva padrão, realizada com IL-8 recombinante humana dosada no ensaio.

A sensibilidade do método é alta, oscilando em torno de 98%, não havendo relato de reação cruzada ou de contaminantes. A concentração mínima detectada de IL-8 é menor que 10pg/ml (R&D Systems, *Quantikine® human IL-8*, Minneapolis, MN).

Para que não houvesse interferência da concentração urinária no valor da IL-8, foi realizado o ajuste da IL-8 urinária pelo valor da creatinina urinária (IL-8 ur/cr), dosada na mesma amostra.

3. Análise Estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada por tabelas de frequência e de associação. Para variáveis quantitativas com $n \geq 20$ foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2) e para $n < 20$ o teste exato de Fisher, com significância estatística quando $p < 0,05$. Também foi realizado o estudo descritivo das variáveis com cálculo da média e desvio padrão, mediana e percentis.

A comparação dos níveis de IL-8 entre os dois grupos foi realizada por estatística não paramétrica, com o teste de Mann Whitney.

Para o estudo de correlação dos valores de Interleucina 8 no sangue e urina foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Pearson.

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da IL-8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr, foram calculados comparando-se os dois grupos em M1: prematuros sépticos e prematuros não infectados. Para o cálculo do intervalo de confiança a 95% utilizou-se a estatística F (CURI, 1997).

3.1 - Ponto de corte

O ponto de corte da IL-8 sérica e urinária foi determinado após a construção da curva de operação resposta "*Receiver Operator Characteristic - ROC*".

Esta curva foi construída pela representação da taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) no eixo y, contra a taxa de falsos positivos (1 - especificidade) no eixo dos x. Os valores nos eixos poderiam apresentar probabilidade de 0 a 1,0 ou seja, 0 a 100% (FLETCHER *et al.*, 1989).

O cruzamento entre a sensibilidade e a especificidade das dosagens da IL-8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr mostrados na curva, puderam ser usados para auxiliar na decisão de qual o melhor ponto de corte para cada um dos testes.

3.2 - Acurácia do teste diagnóstico

A acurácia ou validade da determinação da IL-8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr foi dada pelo cálculo de sensibilidade e especificidade no início do estudo. A sensibilidade e especificidade foram determinadas a partir do padrão ouro, ou seja, certeza diagnóstica, utilizado no estudo para definição de sepse tardia. Assim sendo:

- > **Sensibilidade** - proporção de positivos verdadeiros entre os prematuros sépticos;
- > **Especificidade** - proporção de negativos verdadeiros entre os prematuros não infectados.

A acurácia global dos testes também foi obtida pelo cálculo da área sob a curva ROC. Quanto maior a área, melhor a acurácia do teste (FLETCHER *et al.*, 1989).

3.3 - Probabilidade de sepse tardia

Para a determinação da probabilidade de sepse tardia, foram calculados os valores preditivos de cada teste utilizando-se as concentrações séricas e urinárias da IL-8 (Anexo 9):

- > **Valor Preditivo Positivo:** probabilidade do prematuro apresentar sepse, com o resultado do teste positivo;

- > **Valor Preditivo Negativo:** probabilidade do prematuro não apresentar sepse, quando o resultado do teste for negativo.

Os valores preditivos foram determinados a partir da sensibilidade e especificidade (FLETCHER *et al.*, 1989) das dosagens da IL-8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr no início do estudo (M1), considerando a incidência de 20% de sepse tardia em prematuros (BENTLIN, 1997).

RESULTADOS

Do total de 45 pacientes protocolados, 36 completaram o estudo e 9 foram excluídos por apresentarem infecção localizada, ou por terem evoluído para óbito antes de completarem todas as dosagens do protocolo. O grupo séptico (S) constituiu-se de 19 recém-nascidos prematuros e o grupo não infectado (NI) de 17 prematuros. Os dados clínicos e laboratoriais dos neonatos encontram-se nos Anexos 10 e 11.

1. Variáveis Clínicas

1.1 - Caracterização dos recém-nascidos estudados

No grupo séptico 16 dos 19 pacientes nasceram no serviço, enquanto que no grupo não infectado isto ocorreu em 12 dos 17 neonatos. As características gerais dos recém-nascidos dos dois grupos estudados encontram-se nas tabelas 1 e 2:

Tabela 1 - Peso de Nascimento, Idade Gestacional e pós-natal dos recém-nascidos prematuros dos grupos séptico (S) e não infectado (NI): média e desvio padrão.

Parâmetros	Grupos	S (n=19)		NI (n=17)		Análise estatística
		Média X	Desvio s	Média X	Desvio s	p
Peso Nascimento (g)		1354	427	1514	385	0,247
Idade Gestacional (sem)		31	2,5	31	2,1	0,666
Idade pós-natal (dias)		9,7	5,3	6,9	4,1	0,061

Os grupos séptico e não infectado não diferiram quanto ao peso de nascimento, idade gestacional e pós-natal. O peso de nascimento em gramas variou de 875 a 2315 no grupo séptico e de 850 a 2135 no grupo não infectado. A ocorrência de muito baixo peso foi de 74% (14 RN) entre os sépticos e de 54% (10 RN) entre os não infectados. Todos os 36 neonatos tinham menos que 34 semanas de idade gestacional, com variação de 26 a 34 semanas entre os sépticos, e 27 a 34 entre os não infectados.

Tabela 2 - Características gerais dos recém-nascidos prematuros dos grupos séptico (S) e não infectado (NI).

Grupos		Análise estatística				
		S (n=19)		NI (n=17)		p
Parâmetros		n	%	n	%	
Sexo	Masculino	10	53	7	41	0,724
	Feminino	9	47	10	59	
Adequação	AIG	16	84	15	88	0,893
PN / IG	PIG	3	16	2	12	
Tipo de parto	Normal	6	32	7	41	0,802
	Cesárea	13	68	10	59	
Apgar 1° minuto	0 a 3	4	21	6	35	0,069
	4a 6	5	26	0	0	
	≥ 7	10	53	11	65	
Reanimação	Sim	11	58	7	41	0,761
Nascimento	Não	8	42	10	49	

A tabela 2 mostra que os grupos não diferiram quanto ao sexo, adequação do peso para a idade gestacional, tipo de parto, Apgar e reanimação ao nascimento. Chama a atenção a elevada frequência de parto cesárea, depressão neonatal e reanimação nos dois grupos. A manobra de reanimação mais frequente em ambos os grupos foi a ventilação com pressão positiva.

De todos os pacientes estudados cinco apresentaram Apgar menor ou igual a 6 no quinto minuto sendo que destes, quatro pertenciam ao grupo séptico.

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao uso de corticóide antenatal que ocorreu em 42% das gestantes do grupo séptico e 47% do grupo não infectado.

A morbidade no grupo séptico durante a hospitalização foi caracterizada por: persistência do canal arterial (10 RN: 2 utilizaram Indometacina e 2 foram submetidos à ligadura cirúrgica), síndrome do desconforto respiratório (7 RN: 5 receberam surfactante exógeno), hemorragia peri-intraventricular (4 RN: 2 com dilatação ventricular, um com hemorragia em parênquima e outro em plexo coróide), hipercogenidade ao ultrassom de crânio (3 RN), infecção precoce (5 RN) e displasia broncopulmonar (1 RN).

No grupo não infectado as principais doenças foram: síndrome do desconforto respiratório (11 RN: 7 utilizaram surfactante exógeno), persistência do canal arterial (8 RN: apenas um recebeu Indometacina), hipercogenidade ao ultrassom de crânio (5 RN), hemorragia peri-intraventricular (3 RN: sendo 2 com dilatação ventricular e o outro com hemorragia em plexo coróide), infecção precoce (4 RN) e displasia broncopulmonar (1 RN).

Dentre os 19 recém-nascidos sépticos, 18 (95%) foram submetidos à procedimentos de risco para infecção, contra 11 (65%) dos 17 recém-nascidos não infectados. A média de procedimento por grupo foi de 2,9 x 1,3 (p=0,005)

Os principais procedimentos de risco para sepse, identificados nesta amostra nas 48 horas que antecederam o início do estudo encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Procedimentos de risco nos recém-nascidos prematuros dos grupos séptico (S) e não infectado (NI).

Procedimento	Grupo S (n=19)		Grupo NI (n=19)		Análise estatística
	n	%	n	%	p
Nutrição parenteral	16	84	7	41	0,019
Antibiótico prévio	11	58	6	35	0,307
Ventilação mecânica	7	37	5	29	0,906
Cateteres vasculares	8	42	4	23	0,409

Observa-se na tabela acima que dentre os procedimentos de risco, apenas a nutrição parenteral foi significativamente mais frequente no grupo séptico.

Outro aspecto estudado foi a associação de sepse com meningite. O exame do líquido foi realizado em 17 dos 19 prematuros sépticos e em 29% dos casos (5/17) foram detectadas alterações bioquímicas compatíveis com meningite. O exame não pôde ser realizado em dois recém-nascidos que apresentavam instabilidade hemodinâmica e distúrbio de coagulação. Assim, meningite foi diagnosticada em 26% (5/19) dos recém-nascidos sépticos.

Quanto à evolução da sepse, dois neonatos apresentaram choque séptico (10,5%), mas nenhum recém-nascido teve disfunção de múltiplos órgãos e sistemas.

O óbito ocorreu em dois prematuros do grupo séptico (10,5%) na quarta semana de vida, não relacionado ao quadro séptico inicial. No grupo não infectado não houve óbito.

2. Variáveis laboratoriais

As tabelas 4 e 5 apresentam os resultados dos parâmetros laboratoriais avaliados nos dois grupos, séptico (S) e não infectado (NI) e nos dois momentos, início (M1) e 24 48 horas de estudo (M2). Pelo teste de Goodman foram feitas as comparações entre os momentos em cada grupo (representados por letras maiúsculas) e também entre os grupos em cada momento (letras minúsculas).

2.1 - Hemograma e dosagens bioquímicas

Tabela 4 - Valores medianos e percentis: p25 e p75 de leucócitos, plaquetas e glicemia, segundo grupos e momentos.

Parâmetros	Grupos	Momentos		
		M1	M2	p
Contagem de Leucócitos (x mm ³)	S	5.570 Aa (4.302 ; 14.587)	9.700 Aa (8.892; 13.600)	0,225
	NI	9.440 Aa (6.500 ; 13.275)	9.200 Aa (6.990 ; 10.850)	0,145
	p	0,154	0,194	
Contagem de Plaquetas (x mm ³)	S	148.000 Aa (108.250 ; 25.750)	155.000 Aa (120.250 ; 251.000)	0,922
	NI	244.000 Aa (150.750 ; 324.500)	265.500 Aa (148.750 ; 375.000)	0,487
	p	0,093	0,090	
Glicemia (mg/dl)	S	117 Aa (79 ; 146)	95 Aa (83 ; 107)	0,145
	NI	80 Ab (75 ; 87)	84 Aa (78 ; 97)	0,934
	p	0,049	0,106	

Análise estatística: Teste de Goodman

Letras maiúsculas: comparam momentos para cada grupo

Letras minúsculas: comparam grupos para cada momento

Letras diferentes: indicam diferenças significativas (p < 0,05)

Os valores medianos da contagem de leucócitos e de plaquetas não diferiram significativamente entre os grupos nos dois momentos (letra minúscula) e também não diferiram entre M1 e M2 nos dois grupos (letra maiúscula). A glicemia no início do estudo (M1) foi significativamente maior no grupo séptico, mas com valor mediano dentro da faixa de normalidade.

Tabela 5 - Valores medianos e percentis: p25 e p75 do índice neutrofílico, da relação I/M, escore de Rodwell e PCR, segundo grupos e momentos.

Parâmetros	Grupos	Momentos		p
		M1	M2	
Índice Neutrofílico	S	0,24 Aa (0,00 ; 0,30)	0,07 Aa (0,01 ; 0,15)	0,083
	NI	0,01 Ab (0,00 ; 0,05)	0,00 Ab (0,00 ; 0,04)	0,688
	p	0,034	0,015	
Relação I/M	S	0,32 Aa (0,00 ; 0,37)	0,08 Aa (0,01 ; 0,17)	0,083
	NI	0,01 Ab (0,00 ; 0,06)	0,00 Ab (0,00 ; 0,07)	0,688
	p	0,034	0,017	
Escore de Rodwell	S	3 Aa (2 ; 5)	1 Ba (0 ; 2)	< 0,001
	NI	0 Ab (0 ; 1)	0 Ab (0 ; 0)	0,125
	p	< 0,001	0,017	
Proteína C reativa (mg/L)	S	25 Aa (0 ; 100)	0 Aa (0 ; 75)	0,063
	NI	0 Ab (0 ; 0)	0 Ab (0 ; 0)	0,500
	p	0,020	0,015	

Análise estatística: Teste de Goodman

A análise dos parâmetros descritos na tabela 5 mostrou que índice neutrofilico, relação I/M , escore de Rodwell e PCR foram maiores no grupo séptico comparado ao não infectado nos dois momentos do estudo. Na comparação entre os momentos para cada grupo apenas o escore de Rodwell no grupo séptico apresentou redução estatisticamente significativa de M1 para M2.

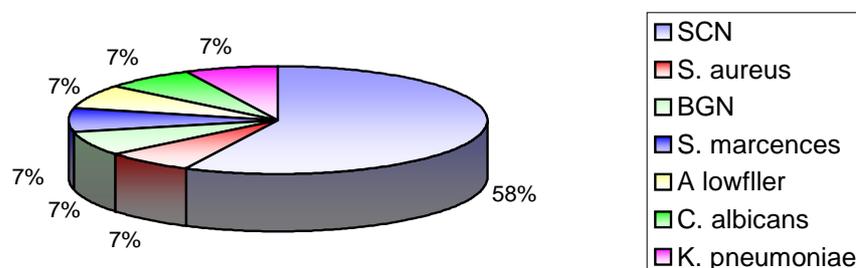
Quanto a PCR os valores de mediana e percentis no grupo não infectado foram todos zero, enquanto que no grupo séptico os percentis 25 e 75 abrangeram valores entre zero e 100 mg/L, o que justifica a diferença significativa entre os grupos no segundo momento de estudo quando ambas as medianas foram zero.

2.2 - Culturas

De todos os pacientes do estudo foram obtidas hemoculturas, e não houve positividade no grupo não infectado. No grupo séptico a positividade foi de 74% (14/19). A cultura de urina foi positiva em 5 RN (26%) e destes, 2 apresentavam hemocultura com os mesmos agentes (*Cândida albicans* e *Klebsiella pneumoniae*) e um recém-nascido teve cultura positiva em urina e líquor para bastonete Gram-negativo não fermentador. Apenas neste líquor foi observado crescimento bacteriano.

Os agentes identificados em culturas de sangue encontram-se na figura 1.

Figura 1 - Agentes isolados em hemocultura .



O *Staphylococcus coagulase negativa* foi isolado em 57% das hemoculturas positivas (8/14), constituindo-se no principal agente etiológico do quadro séptico.

Nas uroculturas houve predomínio de bactérias Gram-negativas entre elas *Klebsiella pneumoniae* (2), *Enterobacter cloacae* (1), bastonete Gram-negativo não fermentador (1) e também a *Cândida albicans* (1).

3. Interleucina 8

3.1 - Determinação dos níveis séricos e urinários

A Interleucina 8 foi dosada no sangue e urina de todos os recém-nascidos estudados, no momento da suspeita de sepse (M1) e 48 horas após a primeira coleta (M2). A IL-8 urinária também foi analisada após ajuste pela creatinina urinária. A variabilidade dos valores obtidos orientou para a utilização da mediana. Os resultados foram analisados pelo teste de Goodman que compara os dados entre os grupos e entre os momentos. Esses resultados estão apresentados nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Valores medianos e percentis: p25 e p75 da Interleucina 8 sérica em pg/ml segundo grupos e momentos.

Grupos	Momentos		p
	M1	M2	
Séptico (S)	929,3 A a (527,6 ; 997,8)	535,7 A a (322,0 ; 929,3)	0,123
Não Infectado (NI)	624,7 A a (137,3 ; 923,6)	1013,1 B a (621,1 ; 1121,6)	0,002
p	0,079	0,062	

Análise estatística: Teste de Goodman

Nesta tabela verifica-se que não houve diferença entre os grupos séptico e não infectado nos dois momentos de estudo.

Na comparação entre os momentos nota-se que no grupo séptico os valores foram menores 48 horas após o início do estudo (M2), embora sem significância estatística. No grupo não infectado os níveis da IL-8 sérica foram significativamente maiores em M2, entretanto estes valores foram próximos aos encontrados no grupo séptico no momento inicial da avaliação (M1).

Tabela 7 - Valores medianos e percentis: p25 e p75 da Interleucina 8 urinária em pg/ml segundo grupos e momentos.

Grupos	Momentos		p
	M1	M2	
Séptico (S)	1157,7 A a (931,2 ; 1755,6)	419,1 B a (169,7 ; 1037,8)	<0,001
Não Infectado (NI)	601,8 A b (192,5 ; 866,4)	815,1 A a (613,0 ; 1317,6)	0,098
p	0,001	0,128	

Análise estatística: Teste de Goodman

A análise da IL-8 urinária entre grupos e momentos na tabela 7, mostrou que o grupo séptico apresentou níveis significativamente aumentados de IL-8 urinária no início do estudo (M1) e redução significativa destes níveis após o início da terapêutica (M2).

A comparação entre os grupos mostrou que no início do estudo (M1) os valores da IL-8 urinária no grupo séptico foram significativamente maiores em relação ao não infectado, enquanto que em M2 não houve diferença estatística entre os grupos.

Na comparação entre os momentos, para cada grupo observou-se que no grupo séptico os valores iniciais (M1) foram significativamente maiores do que em M2, o que não ocorreu no grupo não infectado onde M1=M2.

Tabela 8 - Valores medianos e percentis: p25 e p75 da Interleucina 8 urinária/creatinina urinária (IL-8 ur/cr) segundo grupos e momentos.

Grupos	Momentos		
	M1	M2	p
Séptico (S)	249,1 A a (164,2 ; 287,6)	48,5 B a (33,1 ; 75,6)	<0,001
Não Infectado (NI)	41,7 A b (13,3 ; 70,5)	57,9 A a (36,9 ; 78,4)	0,051
p	<0,001	0,466	

Análise estatística: Teste de Goodman

Na comparação entre os grupos nota-se que no início do estudo (M1) os valores da IL-8 ur/cr no grupo séptico foram significativamente maiores do que no grupo não infectado, enquanto que em M2 não houve diferença significativa entre os grupos.

A comparação entre os momentos em cada grupo mostrou que no grupo séptico os valores iniciais (M1) foram significativamente maiores do que 48 horas após (M2) enquanto que no grupo não infectado os valores mantiveram-se estáveis (M1=M2).

Esta análise mostrou que prematuros sépticos apresentaram aumento significativo da IL-8 ur/cr na avaliação inicial com redução a níveis próximos ao grupo não infectado 48 horas após o início tratamento.

Os dados das tabelas 6, 7 e 8 estão ilustrados nos gráficos "Box Plots", de números 1 a 6. Os gráficos representam as concentrações da IL-8 nos dois grupos, séptico e não infectado e nos dois momentos (M1 e M2). A linha horizontal dentro das caixas representa a mediana, as margens das caixas correspondem às variações dos quartis e as linhas verticais representam a variação dos dados. Valores fora desta variação são valores extremos.

Gráfico 1 - Valores medianos e percentis da IL-8 sérica (pg/ml) nos grupos séptico e não infectado no início do estudo (M1).

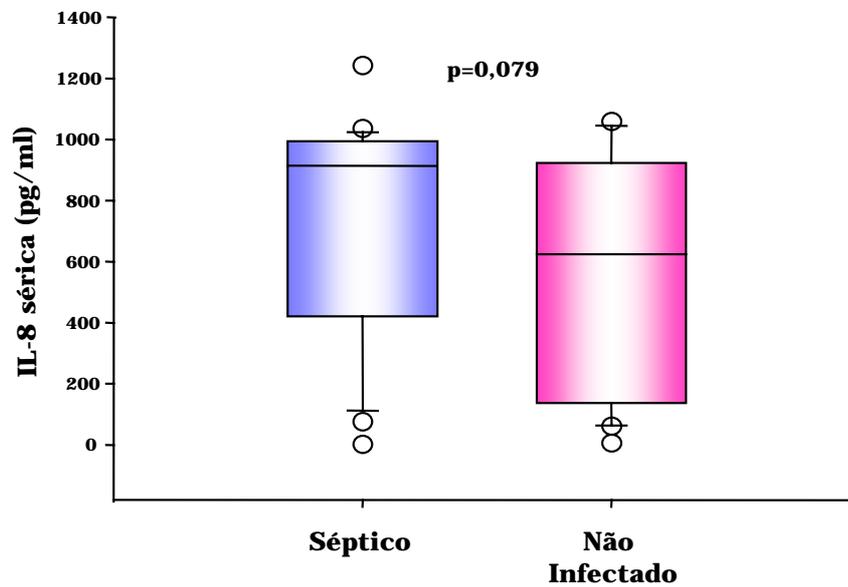


Gráfico 2 - Valores medianos e percentis da IL-8 sérica (pg/ml) nos grupos séptico e não infectado 48 horas após o início do estudo (M2).

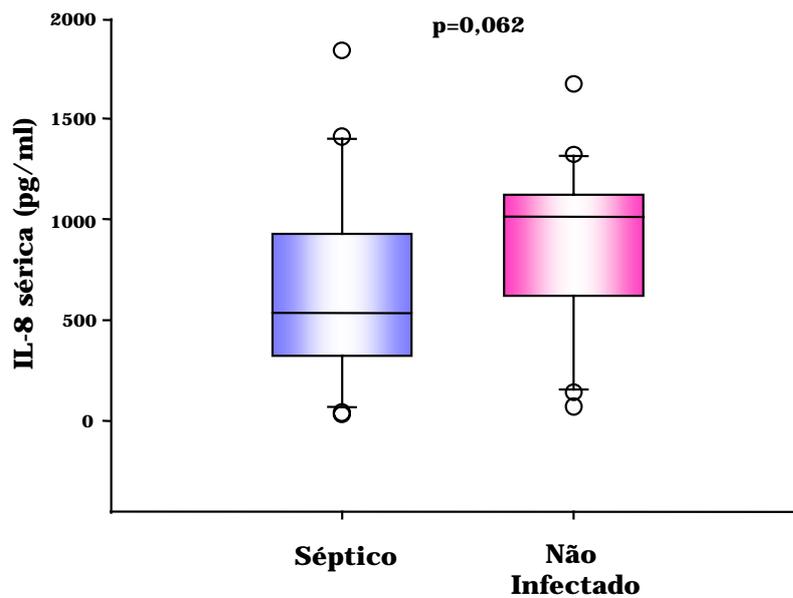


Gráfico 3 - Valores medianos e percentis da IL-8 urinária (pg/ml) nos grupos séptico e não infectado no início do estudo (M1).

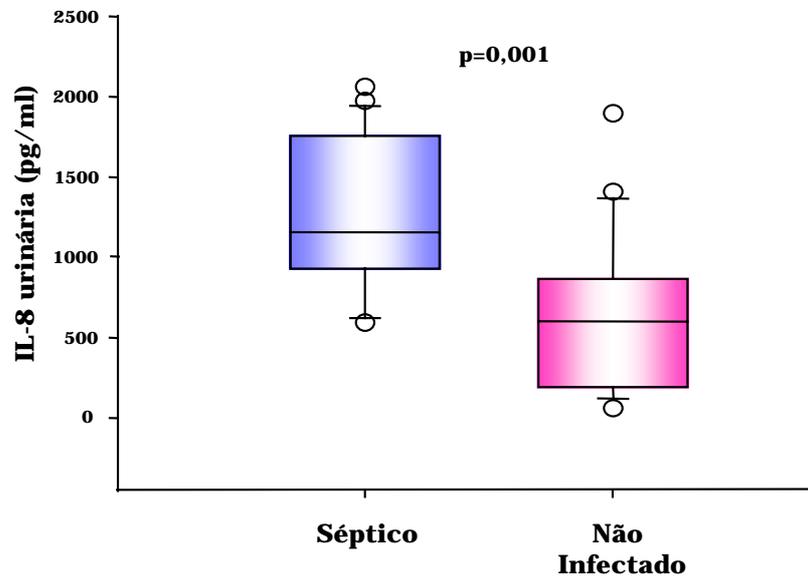


Gráfico 4 - Valores medianos e percentis da IL-8 urinária (pg/ml) nos grupos séptico e não infectado 48 horas após o início do estudo (M2).

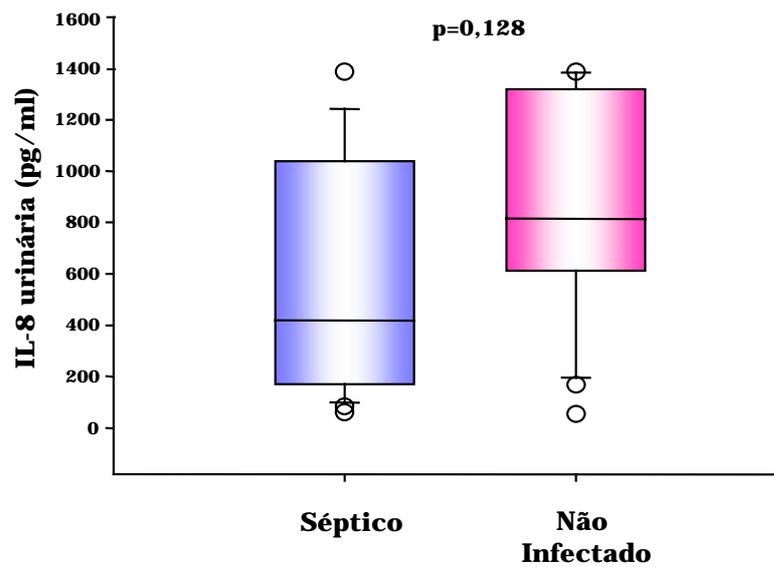


Gráfico 5 - Valores medianos e percentis da IL-8 ur/cr nos grupos séptico e não infectado no início do estudo (M1).

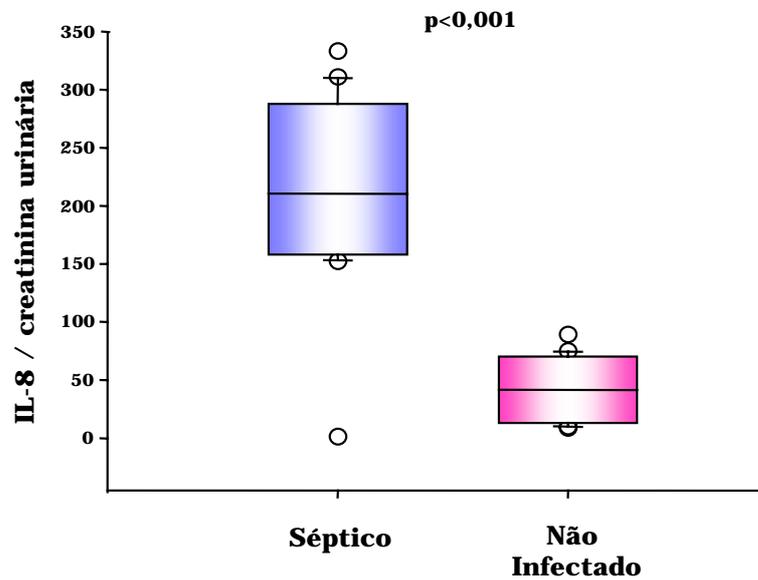
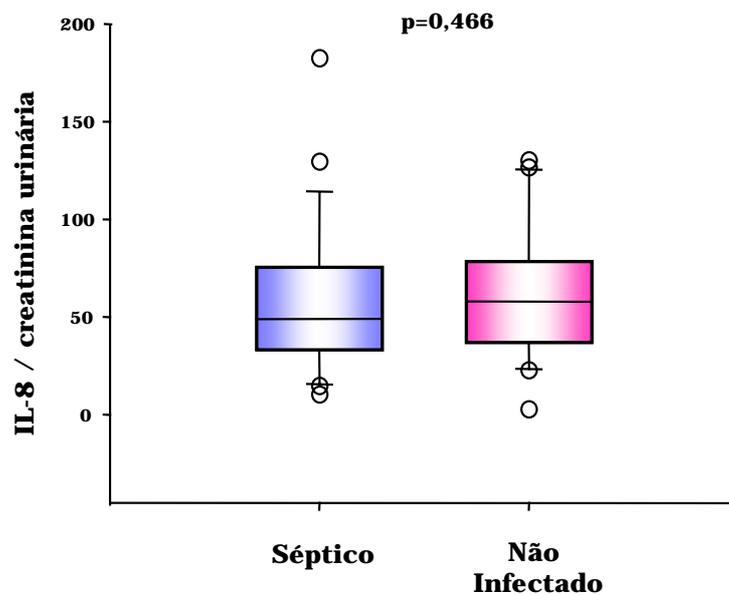


Gráfico 6 - Valores medianos e percentis da IL-8 ur/cr nos grupos séptico e não infectado 48 horas após o início do estudo (M2).



Os gráficos 7, 8 e 9 ilustram a comparação entre os dois grupos (sépticos e não infectados) e momentos (M1 e M2) para os valores da IL-8 sérica, IL-8 urinária e da IL-8 ur/cr, respectivamente.

Gráfico 7 – Valores medianos e percentis da IL-8 sérica (pg/ml) segundo grupos e momentos.

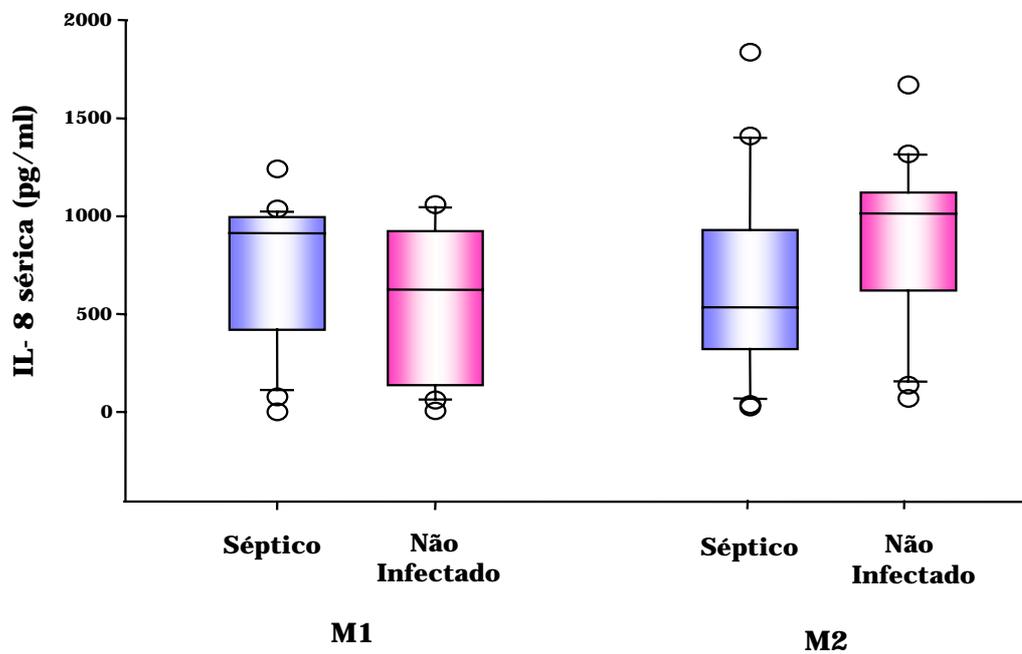


Gráfico 8 - Valores medianos e percentis da IL-8 urinária (pg/ml) segundo grupos e momentos.

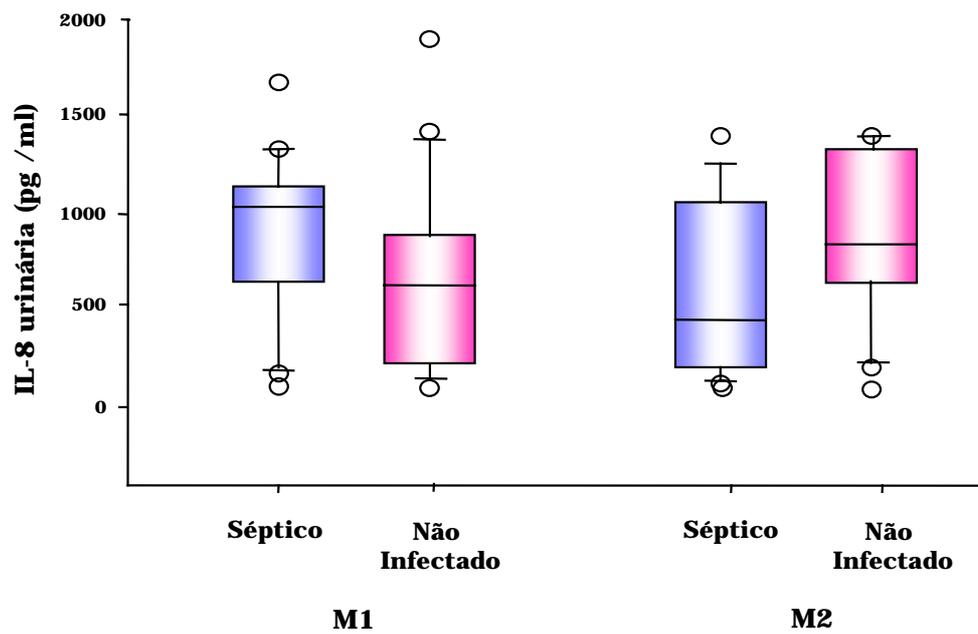
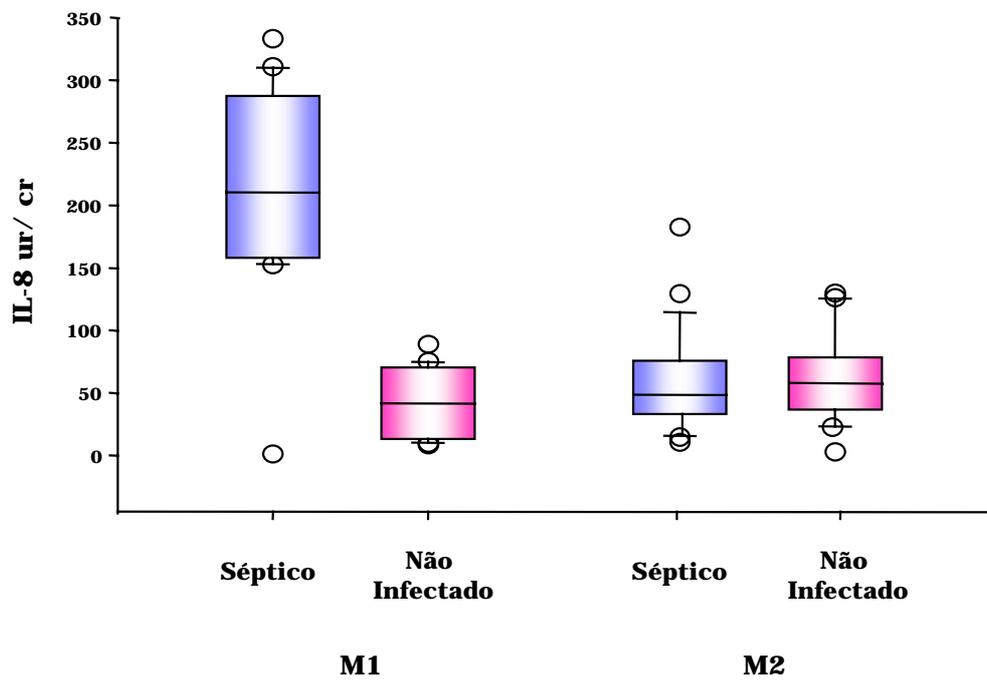


Gráfico 9 – Valores medianos e percentis da IL-8 ur/cr segundo grupos e momentos.



3.2 - Correlação dos níveis séricos e urinários da IL-8

Após análise da IL-8 em sangue e urina nos dois grupos e dois momentos focalizou-se o grupo séptico, no qual foram obtidas correlações dos níveis séricos e urinários da IL-8 entre si e com outros parâmetros clínicos como peso de nascimento, idade gestacional, idade pós-natal, número de procedimentos de risco e parâmetros laboratoriais como índice neutrofilico, escore de Rodwell e PCR.

A tabela 9 mostra o estudo da correlação dos níveis séricos e urinários da IL-8 com estes parâmetros, no momento da suspeita de sepse.

Tabela 9 - Correlação linear de Pearson (r) e valor da probabilidade de significância (p) entre a IL-8 e parâmetros clínicos e laboratoriais, no grupo de recém-nascidos sépticos.

IL- 8	Parâmetros clínico-laboratoriais						
	Peso Nascimento	Idade Gestacional	Idade pós-natal	Procedimento Risco	Índice neutrofilico	Rodwell	PCR
Sérica							
r	0,051	-0,006	0,444	0,091	0,514	0,233	-0,008
P	0,836	0,980	0,057	0,710	0,024	0,337	0,974
Urinária							
r	-0,065	-0,349	0,478	-0,006	0,004	-0,217	-0,110
P	0,792	0,143	0,038	0,981	0,986	0,372	0,654
Ur/cr							
r	-0,068	-0,345	0,115	0,159	0,242	-0,015	-0,217
P	0,781	0,147	0,638	0,516	0,318	0,952	0,373

Os resultados não mostraram boa correlação das dosagens de IL-8 com os parâmetros avaliados. O índice neutrofilico foi o único parâmetro que apresentou correlação com a IL-8 sérica.

A IL-8 urinária correlacionou-se apenas com a idade pós-natal. A IL-8 ur/cr não mostrou correlação com qualquer dos parâmetros analisados.

A tabela 10 apresenta o estudo das correlações da IL-8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr entre si.

Tabela 10 - Correlação linear de Pearson (r) e valor da probabilidade de significância (p) entre as IL-8 sérica, urinária e IL-8 ur/cr no grupo de recém-nascidos sépticos.

IL-8	IL-8 urinária	IL-8 ur/cr
IL-8 sérica		
r	0,178	0,429
P	0,465	0,067
IL-8 urinária		
r		0,566
P		0,0121

Na tabela acima, observa-se que houve correlação significativa entre a IL-8 urinária e IL-8 ur/cr. Os valores da IL-8 sérica não apresentaram correlação com os valores urinários.

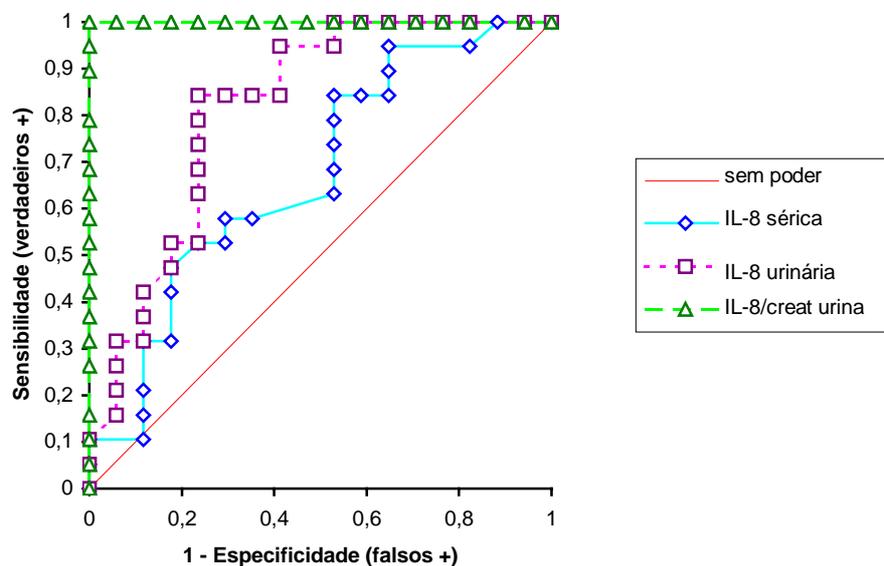
3.3 - Cálculo do ponto de corte dos níveis da Interleucina 8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr.

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram calculados pela comparação dos grupos de prematuros sépticos e prematuros não infectados. A acurácia diagnóstica de cada marcador foi determinada utilizando o seu respectivo ponto de corte, identificado inicialmente no ponto de inflexão da curva de operação resposta (ROC), e no ponto máximo de sensibilidade consistente com uma especificidade em torno de 50%, o qual determinou o ponto de corte ótimo. Os valores de sensibilidade,

especificidade, verdadeiros positivos e negativos, falsos positivos e negativos das IL-8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr utilizados na curva ROC encontram-se nos anexos 12, 13 e 14.

O gráfico 10 apresenta as curvas ROC das IL-8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr.

Gráfico 10 - Curvas ROC da IL-8 sérica , IL-8 urinária e da IL-8 ur/cr.



As curvas representam os valores de sensibilidade e os falsos positivos em cada uma das dosagens das Interleucinas.

O ponto de inflexão observado nas curvas correspondeu ao ponto de corte ótimo, mostrado na tabela 11.

Tabela 11 – Ponto de corte das dosagens das Interleucinas determinado pela curva ROC

IL-8	Ponto de corte	S (%)	E (%)
Sérica (pg/ml)	304	84	47
Urinária (pg/ml)	776	84	77
Ur/cr	89	100	100

O ponto de corte da IL-8 sérica apresentou boa sensibilidade, porém com especificidade muito baixa. A sensibilidade da IL-8 urinária também foi boa e a especificidade baixa. A IL-8 ur/cr mostrou alta sensibilidade e especificidade.

A área sob a curva ROC e as diferenças entre as dosagens encontram-se nas tabelas 12 e 13 respectivamente.

Tabela 12 – Valores da área sob a curva ROC e intervalo de confiança a 95%.

Curva ROC	Área sob a Curva	Erro padrão	IC a 95%
IL-8 Sérica	0,67	0,09	0,49 a 0,85
IL-8 Urinária	0,81	0,07	0,67 a 0,96
IL-8 ur/cr	1,00	0,00	1,00 a 1,00

Observa-se que todas as áreas foram maiores que 0,5 entretanto as áreas da IL-8 urinária e da IL-8 ur/cr apresentaram os maiores valores.

Tabela 13 – Diferenças entre as áreas sob a curva ROC.

Interleucina 8	Diferença	p
Sérica x Urinária	-0,14	0,2035
Sérica x ur/cr	-0,33	0,0003
Urinária x ur/cr	-0,19	0,0128

A comparação entre as áreas não mostrou diferença significativa entre as IL-8 sérica e urinária. A IL-8 ur/cr diferiu significativamente quando comparada com a IL-8 sérica e urinária.

Ao analisar a curva ROC constatamos que a IL-8 sérica não foi bom teste diagnóstico para sepse em prematuros. A IL-8 urinária e a IL-8 ur/cr mostraram-se bons testes diagnósticos, principalmente a

IL-8 ur/cr que apresentou sensibilidade e especificidade de 100% com área sob a curva de 1,0 (gráfico 10 e tabelas 11 e 12).

3.4 - Cálculo da acurácia diagnóstica da Interleucina 8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr

Para avaliar a eficácia da IL-8 sérica e urinária no diagnóstico de sepse, calculou-se sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de cada uma delas no seu ponto de corte. Os resultados estão apresentados na tabela 14. Para este ponto também foi calculado a acurácia do teste.

Tabela 14 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da IL-8 no diagnóstico da sepse tardia: valores percentuais e intervalo de confiança (IC) a 95%.

	IL-8 sérica (304 pg/ml)	IL-8 urinária (776 pg/ml)	IL-8 ur/cr (89)
Sensibilidade % (IC a 95%)	84 (60; 97)	84 (60; 97)	100 (82; 100)
Especificidade % (IC a 95%)	47 (23; 72)	77 (50; 93)	100 (81; 100)
VPP %	29	48	100
VPN %	92	95	100
Acurácia %	67	81	100

As IL-8 sérica e urinária mostraram-se sensíveis, porém não específicas. Ambas apresentaram alto valor preditivo negativo o que auxilia na exclusão do diagnóstico de sepse. A IL-8 urinária ajustada pela creatinina mostrou-se muito sensível e específica, com altos valores preditivos positivo e negativo sendo útil tanto no diagnóstico como na exclusão do quadro séptico. A IL-8 urinária foi o teste de maior acurácia, especialmente a IL-8 ur/cr que mostrou acurácia de 100% na amostra estudada.

3.5 - Comparação da Interleucina 8 sérica e urinária com outros parâmetros laboratoriais de sepse

Foram comparados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da IL-8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr com outros parâmetros utilizados no diagnóstico da sepse neonatal, como a contagem de leucócitos, o escore de Rodwell e a PCR (tabela 15).

Tabela 15 - Sensibilidade (S), especificidade(E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos parâmetros utilizados no diagnóstico da sepse neonatal tardia: valores percentuais.

	IL-8 sérica (≥ 304 pg/ml)	IL-8 urinária (≥776 pg/ml)	IL- 8 ur/cr (≥90)	Leucócitos (<5000 ou >15000/mm³)	Rodwell (≥3)	PCR (≥25mg/L)
S %	84	84	100	68	74	53
E %	47	77	100	88	94	88
VPP %	29	48	100	59	76	53
VPN %	92	95	100	92	93	88

Nesta tabela nota-se que a IL-8 sérica, IL-8 urinária, a contagem de leucócitos, o escore de Rodwell e a PCR apresentaram baixa sensibilidade e baixo valor preditivo positivo, porém o valor preditivo negativo foi alto.

Destaca-se o excelente desempenho da IL-8 ur/cr como teste diagnóstico da sepse neonatal tardia na amostra estudada.

DISCUSSÃO

1. Casuística e Metodologia

Essa pesquisa justifica-se por ser a sepse tardia um problema relevante, bastante frequente em UTI Neonatal e de alta morbimortalidade especialmente em recém-nascidos prematuros (STOLL, 1997).

O interesse no estudo da IL-8 ocorreu por ser esta citocina uma das responsáveis pela manutenção do quadro inflamatório, com meia vida maior do que outras interleucinas, como a IL-6 e o TNF- α , e sendo assim com boas perspectivas de detecção e associação com o quadro séptico.

A possibilidade de dosagem da IL-8 urinária, ainda pouco explorada na literatura, mas com resultados promissores em alguns estudos com adultos portadores de câncer de próstata (BETTEX-GALLAND *et al.*, 1991), crianças com pielonefrite (TULUS *et al.*, 1994), gestantes com corioamnionite (STIEMER *et al.*, 1997) e mais recentemente, recém-nascidos com infecção urinária (ROILIDES *et al.*, 1999), pareceu-nos bastante animadora. Até o momento não foi investigada a presença da IL-8 na urina de recém-nascidos sépticos. Se conseguíssemos mostrar a presença da IL-8 em urina de prematuros sépticos e se estes níveis apresentassem relação com o quadro séptico obteríamos um teste diagnóstico não invasivo, que não causaria espoliação, e que poderia ser realizado várias vezes no seguimento evolutivo da sepse neonatal tardia.

Em revisão da literatura atual não se encontra um teste diagnóstico que seja suficientemente sensível e específico para diagnosticar a sepse em prematuros de forma rápida, eficaz e precoce. Por todos estes motivos, a dosagem da IL-8 urinária pareceu-nos muito promissora.

No desenvolvimento do projeto fica claro a relação entre a pergunta da pesquisa e o objetivo do estudo.

Pergunta:

- > Quais os níveis séricos e urinários da IL-8 em recém-nascidos prematuros com sepse tardia ?
- > Os níveis urinários da IL-8 auxiliam no diagnóstico da sepse tardia em prematuros ?

Objetivo:

- > Determinar os níveis séricos e urinários da IL-8 em recém-nascidos prematuros com sepse tardia e investigar se os níveis urinários são úteis no diagnóstico da sepse.

1.1 - Casuística

A casuística de 36 recém-nascidos prematuros embora não corresponda ao total de prematuros sépticos da UTI Neonatal no período é uma amostra casual da população, e reflete o paciente de maior risco para infecção e sepse hospitalar na Unidade, em condição real e que faz parte do dia a dia de uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. O número de pacientes estudados não é grande, considerando a frequência de 20% de sepse tardia em prematuros (BENTLIN, 1997), entretanto isto não exclui o valor da pesquisa no que diz respeito ao estudo de novo teste diagnóstico e sua contribuição para o conhecimento do papel da IL-8 em prematuros sépticos.

No estudo de revisão sobre as citocinas como marcadores de sepse bacteriana em recém-nascidos, realizado por MEHR & DOYLE (2000), observamos que nos 20 trabalhos revisados, a constituição dos grupos de recém-nascidos infectados variou de 8 até 66 pacientes e o grupo controle de 14 a 202 pacientes. Todos estes trabalhos, embora com pequeno número de pacientes investigados, contribuíram para o entendimento de eventos fisiopatológicos e também para o diagnóstico da sepse, estimulando novas pesquisas clínicas e experimentais.

As pesquisas que envolveram maior número de recém-nascidos foram realizadas por um grupo coordenado pelo pesquisador alemão Axel R.

Franz, que em 1999 avaliou os níveis séricos da IL-8 em 215 neonatos com suspeita de infecção hospitalar em um centro de referência terciário (FRANZ *et al.*, 1999a). Em 2001, este mesmo grupo determinou os valores da IL-8 sérica em 378 recém-nascidos com suspeita de infecção precoce (FRANZ *et al.*, 2001).

O cálculo do tamanho amostral para a incidência de sepse em prematuros de 20% (BENTLIN, 1997) foi de aproximadamente 300 pacientes por grupo (CURI, 1997), o que tornaria inviável a realização deste estudo em um único centro. Entretanto o interesse no papel da IL-8 na sepse neonatal tardia e a possibilidade de diagnosticar precocemente o quadro séptico, sobrepuaram-se à limitação do tamanho amostral e o estudo foi realizado com o propósito de ser o primeiro passo em um amplo campo de investigação.

A casuística deste estudo foi composta de recém-nascidos prematuros por ser esta a população de maior risco para sepse tardia (KLEIN & MARCY, 1995). Não nos propusemos a estratificá-los conforme a idade gestacional, pois conforme demonstrado em estudo anterior neste Serviço, a incidência de sepse é maior nos prematuros com menos que 34 semanas de idade gestacional (BENTLIN, 1997)

Na literatura, a maioria dos estudos sobre as citocinas no período neonatal envolveram recém-nascidos com ampla variação de peso de nascimento e idade gestacional, não sendo observadas diferenças significativas em função destas variáveis (EDGARD *et al.*, 1994; LEHRNBECHER *et al.*, 1995; LEHRBECHER *et al.*, 1996; PANERO *et al.*, 1997; DOELLNER *et al.*, 1998; FRANZ *et al.*, 1999 b; SMULIAN *et al.*, 1999; FRANZ *et al.*, 2001). Apenas NG *et al.* (1997) e KÜSTER *et al.* (1998) limitaram suas pesquisas com prematuros menores que 1500g, obtendo assim amostra mais homogênea.

O interesse em estudar especificamente a sepse tardia justifica-se pelas altas taxas de infecção hospitalar na Unidade, em torno de 35%, o que faz da sepse tardia uma das principais causas de mortalidade em nosso Serviço (BENTLIN, 1997; UNESP, 2002). Assim esse estudo tem aplicabilidade clínica e pode trazer benefícios à Unidade, focalizando uma das patologias mais frequentes e em um dos aspectos mais difíceis, que é o diagnóstico precoce, o qual implica na terapêutica adequada e não abusiva.

Há que se considerar que já existe na Unidade um protocolo de vigilância de Infecção Hospitalar, com participação da equipe médica, de enfermagem e dos membros da Comissão Permanente de Controle de Infecção Hospitalar deste HC, que muito tem colaborado na busca ativa de casos de infecção neonatal.

Outro motivo para o estudo da sepse tardia foi o fato de que as citocinas, nos primeiros dias de vida, podem refletir a resposta inflamatória sistêmica fetal frente a situações como trabalho de parto prematuro, hipóxia, rotura prematura de membranas (GOMEZ *et al.*, 1998), e ainda podem traduzir a resposta imune neonatal ao estresse do nascimento, sendo os seus níveis bastante variáveis neste período (SARANDAKOU *et al.*, 1998).

Como o objetivo do estudo foi a determinação das citocinas na sepse tardia, e sabendo-se que a liberação de toda a cascata de mediadores inflamatórios da sepse é diferente de quadros infecciosos localizados, optamos pela definição de sepse proposta por SAEZ-LLORENS & Mc CRACKEN (1993), mas valorizamos também outros dados como hipotensão, hipoperfusão tecidual e acidose, para evitar que outras condições não infecciosas e que se associam com alterações de temperatura / taquicardia / taquipnéia / alteração na contagem de leucócitos, pudessem atuar como fator de confusão no diagnóstico do quadro séptico, e também, para que bacteremias não viessem a ser interpretadas como sepse.

A positividade em culturas de fluidos corporais como sangue, urina ou líquor, foi valorizada como padrão ouro no diagnóstico laboratorial da sepse tardia, mas não exigida na definição da sepse neste estudo.

Classicamente a positividade em hemocultura é considerada como padrão ouro no diagnóstico de certeza da sepse neonatal (SCHOLLIN, 2001). Entretanto em estudo prévio sobre sepse tardia na UTI Neonatal do HC FMB UNESP, a positividade em hemocultura foi de 63% (BENTLIN, 1997) e por isso consideramos que a hemocultura negativa não exclui o diagnóstico. A cultura também não é livre de erros, pode ser falsamente estéril como observado em culturas pós-morte (PIERCE *et al.*, 1984), ter resultado alterado por problemas na coleta como contaminação ou volume insuficiente (KELLOG *et al.*,

1997), além de sofrer influência do número de amostras coletadas e da técnica empregada (BUTTERY, 2002).

Por estes motivos, consideramos que se adotássemos como padrão ouro no diagnóstico da sepse neonatal tardia apenas a hemocultura positiva, poderíamos interpretar erroneamente os neonatos sépticos, diminuindo os verdadeiros positivos e aumentando os falsos negativos. Assim, embora a positividade em urocultura e líquido não seja alta (WISWELL *et al.*, 1995; SOHN *et al.*, 2001), optamos por considerar como padrão ouro laboratorial a positividade em sangue, urina ou líquido ou a presença de meningite. Com isso, ampliamos o espectro de investigação diagnóstica e poderíamos obter maior precisão no diagnóstico da sepse tardia.

Os critérios de inclusão respeitaram a definição de sepse neonatal tardia adotada na Unidade.

No planejamento da pesquisa, o objetivo foi avaliar os prematuros independente da idade gestacional, entretanto optamos por limitar a idade gestacional mínima em 25 semanas e o peso de nascimento mínimo em 750g para evitar a espoliação de sangue nestes prematuros muito pequenos. Não foram incluídos recém-nascidos com malformações múltiplas para que o desfecho final, sobrevida ou óbito, não sofresse interferência do problema de base destes neonatos, e também os com infecções congênicas porque estas infecções associam-se com liberação de mediadores inflamatórios dificultando a análise dos dados ou atuando como fator de confusão na pesquisa (WEINBERG, 2002).

Os recém-nascidos que evoluíram com infecção localizada não caracterizada como sepse, foram excluídos uma vez que nosso objetivo era estudar o quadro séptico e sabidamente a liberação de mediadores inflamatórios na sepse é muito mais intensa do que nos quadros localizados (SAEZ-LLORENZ & Mc CRACKEN, 1993).

Os grupos de estudo foram constituídos conforme os objetivos da pesquisa, sendo formados dois grupos:

- > **Grupo séptico (S):** prematuros com sepse tardia
- > **Grupo não infectado (NI):** prematuros não infectados.

O conhecimento de que a Interleucina 8 é uma citocina com meia vida relativamente longa, e responsável pela amplificação da resposta inflamatória, persistindo por período superior à 24 horas, incentivou-nos ao estudo do comportamento da IL-8 nas primeiras 48 horas de evolução do quadro séptico (VASCONCELLOS, 2001).

1.2 - Variáveis de estudo

Clínicas

Com o objetivo de caracterizar os grupos estudados, aspectos gerais dos recém-nascidos foram avaliados entre eles, peso de nascimento, idade gestacional, idade pós-natal, sexo, tipo de parto, boletim de Apgar, reanimação em sala de parto, doenças neonatais, exposição ao corticóide antenatal, procedimentos de risco, evolução do quadro séptico.

Sabe-se que o sexo masculino é mais susceptível à infecção (KLEIN & MARCY, 1995), e que os prematuros, especialmente os de muito baixo peso constituem a população de maior risco para a sepse neonatal (COLE, 1991).

A asfíxia altera os mecanismos imunológicos de defesa atuando em algumas circunstâncias como fator predisponente à infecção (GERDES, 1994; KLEIN & MARCY, 1995). Conforme demonstrado por St GEME *et al.* (1994) em casos de rotura prematura de membranas, o Apgar menor ou igual a 6 no quinto minuto de vida implica em risco semelhante ao da corioamnionite para a sepse precoce. No entanto não é referido na literatura a relação entre Apgar e sepse tardia. Modelos experimentais sugerem que em eventos hipóxico-isquêmicos ocorre ativação da cascata de citocinas com conseqüentes alterações cerebrais nas ramificações dendríticas, sinapses e morte celular (LIU *et al.*, 1994 ; HAGBERG *et al.*, 1996). A asfíxia poderia contribuir para infecção pelo comprometimento das funções imunológicas de defesa, e assim, a liberação de citocinas ocorreria secundariamente ao evento hipóxico e não exclusivamente pelo quadro infeccioso (MARTIN-ANCEL *et al.*, 1997).

A avaliação das principais doenças neonatais que caracterizaram a morbidade dos pacientes estudados, é importante na determinação da

gravidade dos recém-nascidos nos dois grupos de estudo. Sabe-se que a IL-8 pode estar aumentada em fluidos corporais de prematuros com doenças não infecciosas como asfixia perinatal, síndrome do desconforto respiratório, hemorragia pulmonar e displasia broncopulmonar, (FRANZ *et al.*, 1999 b; KALLMAN *et al.*, 1999; BAIER *et al.*, 2002). Em 1998, GOMEZ *et al.* estudaram a resposta inflamatória fetal e mostraram que recém-nascidos com maior morbidade neonatal, definida pela presença de síndrome do desconforto respiratório, pneumonia, sepse, displasia broncopulmonar, hemorragia periventricular, leucomalácia e enterocolite, já apresentavam altas concentrações de IL-6 no plasma fetal, sugerindo que a liberação de mediadores inflamatórios pode ter início na vida intra uterina, com participação ativa do feto nesta resposta.

Os procedimentos de risco avaliados no presente estudo, foram aqueles classicamente citados na literatura como predisponentes à infecção:

- > Cateteres vasculares: são fontes de infecção e ou bacteremia transitória por serem facilmente colonizados por bactérias da pele adjacente ao local de entrada, especialmente pelo *Staphylococcus coagulase negativa*. O cateter pode já estar colonizado após 24 horas de inserção, aumentando o risco de infecção (HODGE & PUNTIS, 2002).
- > Intubação traqueal: aumenta o risco de infecção em até sete vezes. Este risco pode ser atribuído à contaminação do ar umidificado com microorganismos hidrofílicos, ao trauma na passagem da cânula, ao próprio movimento da cânula que lesa a mucosa e assim compromete a barreira local anti-infecciosa e às aspirações traqueais de rotina que podem causar bacteremia transitória (GOLDMAN *et al.*, 1981; SOHN *et al.*, 2001).
- > Nutrição parenteral: a administração de solução lipídica favorece o crescimento de fungos e bactérias, especialmente o *Staphylococcus coagulase negativa*, e a necessidade de cateteres intravasculares para sua infusão aumenta em uma vez e meia o risco de infecção (MORO *et al.*, 1996; SOHN *et al.*, 2001; HODGE & PUNTIS, 2002).
- > Antibioticoterapia prévia: especialmente os antibióticos de amplo espectro, propiciam a emergência de novas cepas bacterianas e associam-se a

infecções causadas por patógenos multirresistentes. Também suprimem a flora normal e favorecem a proliferação de fungos (MILLER *et al.*, 1995).

Os estágios evolutivos da sepse neonatal não estão bem documentados na literatura. Este fato deve-se em parte à variação na terminologia empregada para definir estes estágios e também ao pleomorfismo das manifestações clínicas e laboratoriais da sepse neonatal, dificultando a determinação precisa de sua evolução.

A classificação proposta por SAEZ-LLORENZ & Mc CRACKEN em 1993 para pacientes pediátricos, auxilia na normatização das definições e desta forma, na melhor caracterização destes estágios. Esta classificação foi empregada no presente estudo com as adaptações para o período neonatal, referentes aos valores de frequência cardíaca, frequência respiratória e contagem do número de leucócitos.

Laboratoriais

Os exames laboratoriais empregados de rotina na avaliação de infecção são inespecíficos, sendo mais frequentemente utilizados como complemento da avaliação clínica no diagnóstico da sepse. Podem ser obtidos de forma rápida, são de fácil execução, de baixo custo e úteis quando analisados em conjunto e de forma seriada, mas isoladamente apresentam várias limitações (POWELL & MARCY, 1995).

Os parâmetros hematológicos analisados neste estudo foram:

- > Contagem de leucócitos: analisada isoladamente tem valor limitado no diagnóstico da sepse neonatal podendo encontrar-se normal, elevada ou diminuída (RODWELL *et al.*, 1988).
- > Índice neutrofílico e relação formas imaturas /maduras: apresentam baixa especificidade e não se correlacionam com a gravidade da infecção (MANROE *et al.*, 1979; RODWELL *et al.*, 1988).
- > Contagem plaquetária: também tem valor limitado no diagnóstico de infecção bacteriana no período neonatal, apresentando baixa sensibilidade. A plaquetopenia, frequentemente é sinal tardio de infecção

grave, mas também pode ocorrer em situações não infecciosas (RODWELL *et al.*, 1988; POWELL & MARCY, 1995).

- > Dosagem da proteína C reativa: reagente de fase aguda, surge em fases iniciais de processos infecciosos, sendo útil no diagnóstico e acompanhamento da resposta terapêutica, mas não é sensível o suficiente para ser usada isoladamente no diagnóstico da sepse. Níveis elevados podem ser encontrados na asfixia perinatal, síndrome do desconforto respiratório, aspiração de mecônio e choque (GERDES, 1994; PÓWELL & MARCY, 1995). É dosada por métodos que permitam a visualização direta do complexo PCR - anticorpo através da aglutinação do Látex ou por precipitação (imunodifusão radial, imunoturbidimetria, nefelometria) ou ainda pelo método de radioimunoensaio (POWELL & MARCY, 1995). Embora o mais recomendável seja a dosagem quantitativa por métodos de precipitação, nesta pesquisa foi utilizado o método disponível no Serviço, da aglutinação do Látex, que torna-se positivo a partir de 25mg/L, o que limita sua interpretação, principalmente quando o valor for negativo.
- > Glicemia: exame inespecífico pois qualquer condição de estresse que altere a secreção de insulina ou libere catecolaminas acarreta distúrbios na homeostasia glicêmica (OGATA, 1994).
- > Escore de Rodwell: bastante utilizado na literatura, pontua sete parâmetros do hemograma permitindo a avaliação mais objetiva das alterações hematológicas que ocorrem no recém-nascido com sepse. A pontuação ≥ 3 apresenta sensibilidade de 96% e < 3 tem valor preditivo negativo de 99% (RODWELL *et al.*, 1988; MANUCHA *et al.*, 2002).

A punção liquórica foi realizada nos recém-nascidos sépticos, tão logo as condições hemodinâmicas permitiram fazê-la. Alguns autores questionam a punção liquórica na investigação inicial de todo recém-nascido com suspeita de infecção precoce, pela instabilidade hemodinâmica destes pacientes nos primeiros dias de vida, pelos riscos de complicações da coleta e porque a maioria dos pacientes com cultura de líquor positiva, apresentam também hemocultura positiva, sugerindo que a hemocultura identifica os recém-nascidos com meningite (PEALMAN *et al.*, 1992).

Entretanto este tema é polêmico, não existindo consenso na literatura sobre esta conduta, mas pela frequência da associação de sepse com meningite e pela ausência de manifestações específicas, a maioria dos autores propõem a coleta do líquido em todo recém-nascido séptico, com o que concordamos. E ainda há que se considerar que estamos estudando sepse tardia e nesta a coleta de líquido é recomendada sempre.

A coleta do líquido foi decidida em período de até 48 horas de evolução do quadro, após a definição clínica e laboratorial da sepse e estabilização do paciente. Portanto os recém-nascidos considerados não infectados não foram submetidos a coleta.

Nesta pesquisa investigou-se o agente etiológico da sepse em todos os recém-nascidos estudados, por culturas de sangue, urina e líquido.

A hemocultura foi obtida por venopunção na suspeita de sepse, antes da introdução do antibiótico. Dentre todas as culturas, é a que apresenta maior positividade, com alta sensibilidade (82%) e especificidade (96%). O tempo médio de incubação é de 72 horas e a positividade varia de acordo com o método empregado, o uso de antibioticoterapia prévia e o agente isolado (GERDES, 1994; KLEIN & MARCY, 1995). Neste estudo o método utilizado foi o BACTEC PEDS PLUS/F cuja sensibilidade é 30% maior quando comparado com as culturas convencionais (GRAY *et al.*, 1998; SORLIN *et al.*, 2000).

Apesar da baixa positividade em foco urinário, a cultura de urina colhida via supra púbica é sempre recomendada na investigação etiológica da sepse tardia (KLEIN & MARCY, 1995; SOHN *et al.*, 2001). Neste estudo foram valorizadas as culturas positivas obtidas preferencialmente por punção supra-púbica ou na impossibilidade da punção, por sondagem vesical.

Interleucina 8 sérica e urinária

Durante os últimos anos as citocinas pró-inflamatórias, moléculas envolvidas na inflamação e imunidade vem sendo consideradas como potenciais marcadores de infecção em recém-nascidos. Embora muitas citocinas sejam estudadas no período neonatal, o principal foco de atenção tem sido o

TNF- α , a IL-6 e mais recentemente a IL-8 (MEHR & DOYLE, 2000). A IL-8, pertencente a família das quimiocinas, é um marcador precoce de sepse por estar envolvida na liberação de neutrófilos da medula óssea e subsequente ativação neutrofílica e quimiotaxia (TERASHIMA *et al.*, 1998).

O método empregado para a determinação da IL-8 sérica e urinária neste estudo foi Kit ELISA (R & D Systems ®) que tem sido amplamente utilizado nas pesquisas desta citocina (SHIMOYA *et al.*, 1992; BERNER *et al.*, 1998; FRANZ *et al.*, 1999a; FRANZ *et al.*, 1999b; FRANZ *et al.*, 2001).

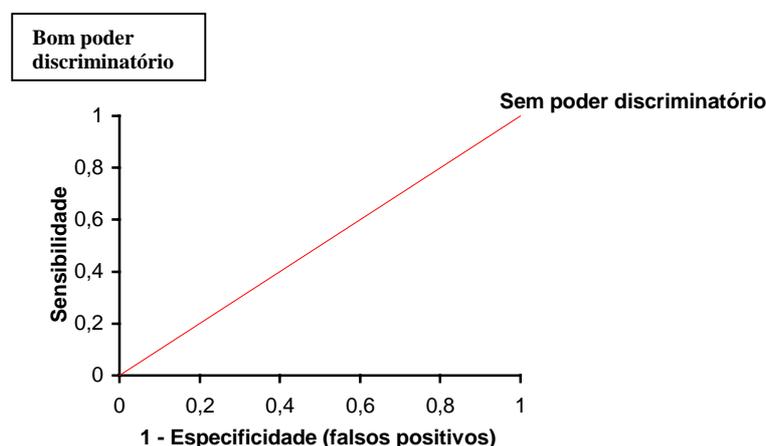
1.3 - Análise Estatística

Ponto de corte

A curva de operação resposta " Receiver Operator Characteristic - ROC ", tem sido usada para determinar o ponto de corte de um determinado teste e para comparar testes entre si.

Testes de bom poder discriminatório concentram-se na porção superior esquerda da curva ROC; para estes à medida em que a sensibilidade diminui (o ponto de corte é diminuído), existe pouca ou nenhuma perda na especificidade. Testes de menor poder discriminatório têm curvas situadas mais próximas à linha diagonal na figura abaixo, deslocando-se da parte inferior esquerda para a porção superior à direita, caracterizando assim um teste que não é muito esclarecedor (FLETCHER *et al.*, 1989).

Figura 2 - Curva ROC - "Receiver Operator Characteristic" hipotética, sinalizando os locais de melhor e pior poder discriminatório do teste.



Quando calculamos o ponto de corte para um teste diagnóstico, o julgamento deve ser feito conforme a relevância clínica da sensibilidade e especificidade do teste para determinada doença. Assim, ao considerarmos as conseqüências devastadoras da sepse neonatal em prematuros, o valor de corte de um marcador precoce da sepse deve ser sensível o suficiente para que todos os verdadeiros infectados sejam corretamente diagnosticados e com valor preditivo negativo (probabilidade de não existir doença, quando o teste for negativo) o mais alto possível (ATALLAH, 1989). Isto permite ao médico ter a certeza de iniciar a antibioticoterapia em pacientes infectados, e evita que o paciente com teste negativo seja tratado desnecessariamente.

No ponto de maior sensibilidade aceita-se menor especificidade, uma vez que prematuros com testes falsos positivos não morrerão de sepse, entretanto a taxa de falso positivo deve ser minimizada. Não existe unanimidade neste assunto, mas aceita-se que o ponto de corte seja o ponto máximo de sensibilidade e com especificidade $\geq 50\%$ (MEHR & DOYLE, 2000).

Acurácia dos testes

A acurácia ou validade das dosagens da IL-8 sérica, urinária e da IL-8 ur/cr, é o grau pelo qual os resultados correspondem verdadeiramente ao que se quer determinar, em nosso estudo, a sepse neonatal tardia. Estabelecer diagnóstico muitas vezes é um processo incerto e resulta em probabilidade e não em certeza de estar correto (ATALLAH, 1989; FLETCHER *et al.*, 1989).

Uma forma de estabelecer relações entre os resultados dos testes e o diagnóstico verdadeiro, ou seja, sepse, é saber se o teste é considerado positivo ou negativo e a sepse está presente ou ausente nos prematuros estudados.

Assim, podemos encontrar quatro interpretações possíveis para o resultado do teste:

- > teste correto: teste positivo na presença de sepse
- > teste correto: teste negativo na ausência de sepse
- > teste incorreto: teste positivo na ausência de sepse
- > teste incorreto: teste negativo na presença de sepse

Estes resultados podem ser apresentados esquematicamente da seguinte forma:

		Sepse	
		Presente	Ausente
Teste	Positivo	Verdadeiro +	Falso +
	Negativo	Falso -	Verdadeiro -

Assim calculamos:

Sensibilidade: proporção de verdadeiros positivos entre os prematuros sépticos.

Especificidade: proporção de verdadeiros negativos entre os prematuros não infectados.

Para avaliar a exatidão destes testes, necessariamente temos que compará-los com o padrão ouro que é a forma de saber se a sepse realmente está presente ou não. Nesta pesquisa o padrão ouro incluiu o diagnóstico clínico e laboratorial de sepse tardia associado à confirmação por culturas (sangue, urina ou líquido) ou presença de meningite, para que o estudo fosse o mais preciso possível no diagnóstico de sepse.

Probabilidade da sepse

A probabilidade de sepse neonatal tardia pode ser calculada pelo valor preditivo dos testes diagnósticos. Os valores preditivos de determinado teste são propriedades somente daquele teste; são calculados a partir da sensibilidade e especificidade do teste, considerando-se também a prevalência ou incidência da doença na população em estudo (ATALLAH, 1989; FLETCHER *et al.*, 1989).

Quanto mais sensível for o teste diagnóstico, melhor será seu valor preditivo negativo e maior será a segurança de que um prematuro com

resultado negativo, não tenha sepse. Quanto mais específico for o teste, melhor será o seu valor preditivo positivo.

2. Resultados

2.1 - Caracterização dos recém-nascidos

As características imunológicas do feto e do recém-nascido fazem com que as infecções sejam muito mais frequentes no período neonatal do que em qualquer outro período da vida. Fatores como idade gestacional, peso de nascimento e o nível da assistência perinatal influenciam na incidência de infecção (KLEIN & MARCY, 1995).

Neste contexto os recém-nascidos prematuros, especialmente os de muito baixo peso ao nascimento, são os mais susceptíveis à infecção. Embora os avanços nos cuidados intensivos neonatais tenham melhorado a sobrevivência destes prematuros, a sepse tardia continua sendo importante causa de morbidade e mortalidade entre eles (STOLL *et al.*, 1996a; STOLL *et al.*, 2002).

O risco de sepse tardia aumenta com a diminuição do peso de nascimento e da idade gestacional, com a utilização de procedimentos invasivos como cateteres vasculares, nutrição parenteral, intubação traqueal para ventilação mecânica, com o uso de antibioticoterapia de amplo espectro e com a internação prolongada (SOHN *et al.*, 2001).

Nesta pesquisa, os dois grupos não diferiram quanto ao peso de nascimento, idade gestacional e idade pós-natal no momento da inclusão no estudo.

Embora sem diferença significativa quanto ao peso de nascimento médio, 74% dos recém-nascidos prematuros do grupo séptico eram menores que 1500g enquanto que no grupo não infectado os muito baixo peso corresponderam a 54% da amostra estudada. Prematuros de muito baixo peso constituem a população de maior risco para infecção em UTI Neonatal. Estudo realizado em 12 centros americanos do NICHD em 1996, mostrou que

aproximadamente um quarto de todos os recém-nascidos de muito baixo peso que sobreviviam por período superior a 3 dias apresentavam pelo menos um episódio de sepse tardia, e 25% dos infectados apresentaram múltiplos episódios. O peso de nascimento e a idade gestacional foram considerados os principais fatores de risco para o desenvolvimento de sepse tardia (STOLL *et al.*, 1996a).

A média da idade gestacional de 31 semanas foi a mesma nos dois grupos e todos os recém-nascidos eram menores que 34 semanas, refletindo a população de maior risco para infecção em UTI Neonatal. Os fatores que favorecem que prematuros, principalmente os menores que 34 semanas de idade gestacional, sejam os mais acometidos por infecção incluem imaturidade imunológica na resposta inata e na adaptativa (VILELA, 2001), peculiaridades do recém-nascido como o comprometimento das barreiras naturais (KLEIN & MARCY, 1995) e as características da própria assistência neonatal como o maior número de intervenções diagnósticas e terapêuticas que se associam à complicações infecciosas e podem aumentar a morbidade e mortalidade neonatal (SHON *et al.*, 2001).

Em nosso estudo, a idade pós-natal da ocorrência de sepse foi de 9,7 dias o que reflete a precocidade dos quadros sépticos e reforça a preocupação com este problema a partir da segunda semana de vida (BENTLIN, 1997; STOLL *et al.*, 2002).

Os dois grupos estudados foram homogêneos quanto ao sexo, adequação do peso para idade gestacional, tipo de parto, condições de nascimento e necessidade de manobras de reanimação em sala de parto.

O sexo masculino é apontado na literatura como fator de risco para infecção. Acredita-se que exista um gene localizado no cromossomo X, que relaciona-se com a função imunológica do timo ou com a síntese de imunoglobulinas e assim, o recém-nascido feminino por possuir dois cromossomos X, teria maior resistência à infecção (KLEIN & MARCY, 1995). Dentre os 19 recém-nascidos sépticos, 53% eram do sexo masculino, enquanto que nos não infectados esta percentagem foi de 41%, sem diferença significativa. STOLL *et al.* (1996a) também não observaram diferenças quanto ao sexo na sepse tardia.

A restrição de crescimento intrauterino é fator de risco para infecção neonatal pois pode comprometer tanto a imunidade celular quanto a humoral (TRINDADE, 1999). Entretanto nesta amostra a restrição de crescimento não foi variável importante, pois mais que 80% dos pacientes nos dois grupos tinham peso adequado para a idade gestacional, mesmo tendo sido adotada a curva de Alexander (1996) que apresenta principalmente no limite inferior de normalidade (p10), maiores valores de peso em comparação com a curva de Lubchenco anteriormente usada no Serviço.

Houve elevada freqüência de partos cesáreas em ambos os grupos (68% nos sépticos e 59% nos não infectados) que se justifica por ser a maternidade do HC FMB-UNESP um centro de referência terciário, para onde são encaminhadas gestantes de alto risco, com maior probabilidade de resolução cirúrgica da gestação, seja por complicações maternas e/ou fetais. O tipo de parto não é fator de risco diretamente relacionado à sepse tardia, mas as altas taxas de cesareana preocupam pois certamente contribuem para aumento na prematuridade.

Dos 19 recém-nascidos sépticos estudados, 9 (47%) apresentaram algum grau de depressão neonatal ao nascimento. No entanto, 35% dos neonatos não infectados também apresentaram depressão neonatal o que corrobora os dados de literatura que a asfixia ao nascimento não parece ser fator de risco para sepse tardia (KLEIN & MARCY, 1995). Dos 36 recém-nascidos, 5 apresentaram Apgar menor ou igual a 6 no quinto minuto, sendo 4 do grupo séptico. A manobra de reanimação mais frequente nos dois grupos foi a ventilação com pressão positiva por balão e máscara, dado este coerente com a literatura (AAP & AHA, 2000). Os neonatos que necessitam de manobras de reanimação como intubação, massagem cardíaca e drogas são duas vezes e meia mais predispostos à sepse precoce, quando comparados aos que não são submetidos a estes procedimentos (STOOL *et al.*, 1996b), entretanto estes dados não são referidos na sepse tardia.

A exposição ao corticóide antenatal foi semelhante nos dois grupos (42% em GS x 47% em GNI), e refletiu a padronização do Serviço de Obstetrícia deste HC. Já está bem documentado em metanálise realizada pela

Cochrane que o corticóide antenatal não aumenta o risco de infecção para o feto e o recém-nascido (CROWLEY, 2001).

A morbidade neonatal não diferiu nos dois grupos e foi representada pelas doenças classicamente associadas à prematuridade e que são mais prevalentes nos prematuros de muito baixo peso em nosso Serviço (CORRALES-MAYORGA, 1998). A doença mais frequente no grupo séptico foi a persistência do canal arterial (10/19) enquanto no grupo não infectado foi a síndrome do desconforto respiratório (11/17). Tem sido bastante destacado na literatura que a presença de infecção com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios é causa importante de manifestação de PCA (HAMMERMAN, 1995; GONZALEZ *et al.*, 1996).

A elevada morbidade evidenciada neste estudo reflete a gravidade dos pacientes internados na UTI Neonatal deste HC.

O maior número de procedimentos de risco observados no início do estudo nos recém-nascidos sépticos comparado com não infectados (2,9 x 1,3, $p=0,005$) pode ter contribuído para o desenvolvimento de infecção. A nutrição parenteral foi a principal intervenção encontrada no grupo séptico (84% x 41%, $p=0,01$). Muitos autores têm destacado a nutrição parenteral como fator de risco para a sepse tardia (BECK-SAGUE *et al.*, 1994; STOLL *et al.*, 1996a; SOHN *et al.*, 2001; HODGE & PUNTIS, 2002; STOLL *et al.*, 2002). O risco decorre não só da necessidade de utilização de cateteres vasculares e da manipulação dos mesmos, mas também da composição da nutrição parenteral, pois as soluções lipídicas favorecem o crescimento de agentes lipofílicos como *Staphylococcus coagulase negativa* e fungos (NG, 1994).

O maior risco entretanto está na associação de cateteres vasculares e nutrição parenteral (HODGE & PUNTIS, 2002). A literatura alerta para a importância dos cateteres vasculares como fatores de risco para infecção, documentando-se em estudo multicêntrico, que sua utilização mesmo por curto período, aumenta significativamente as infecções relacionadas ao cateter (MORO *et al.*, 1996). Os cateteres podem ser colonizados por microorganismos que colonizam a pele já em 24 horas após sua inserção, e mais tardiamente por microorganismos que entram no lumen do cateter no momento da conexão ou

desconexão do mesmo para infusão de medicações e nutrição parenteral (HODGE & PUNTIS, 2002).

Estudo realizado em 29 centros de Terapia Intensiva Neonatal avaliando 827 recém-nascidos de termo e prematuros mostrou incidência de infecção hospitalar de 11,4%. O peso de nascimento médio foi de 1490g e os principais procedimentos de risco encontrados foram os cateteres e a nutrição parenteral, que predominaram no grupo de infectados (SOHN *et al.*, 2001).

Em nosso estudo a frequência de utilização de cateteres não foi elevada e não diferiu entre os grupos. Este fato pode ser devido a rotina da Unidade de restringir o uso de cateteres e insistir em acesso periférico ou no uso dos cateteres percutâneos, mantidos exclusivamente para infusão de nutrição parenteral, o que diminui a manipulação e as taxas de colonização dos mesmos (CAIRNS *et al.*, 1995; SOONG *et al.*, 1995).

A frequência de intubação traqueal foi semelhante nos dois grupos (37% x 29%, $p= 0,906$), não sendo caracterizada isoladamente, como fator de risco para infecção.

A antibioticoterapia prévia é sempre preocupante pois pode suprimir a flora normal do recém-nascido e induzir a resistência de microorganismos, aumentando não apenas o risco de infecção, mas também a gravidade da mesma e dificultando o tratamento (MURRAY, 1994; BOYCE, 1997). O uso prévio de antibióticos foi alto em ambos os grupos (58% em GS x 35% em GNI) sugerindo que esforços devam ser feitos para reduzir o uso desnecessário de antibióticos, uma vez que a infecção prévia ocorreu em apenas 6 dos 11 recém-nascidos que receberam antibioticoterapia do GS, e em 4 dos 6 que utilizaram antibióticos do GNI.

A evolução da sepse neonatal para estágios avançados não está bem documentada na literatura e depende do caráter invasivo do agente causador, das condições imunológicas do hospedeiro, e da rapidez diagnóstica possibilitando a terapêutica adequada. Neste estudo apenas 10,5% dos casos (2 RN) evoluíram para choque séptico. Resultados diferentes foram anteriormente obtidos neste Serviço, no estudo de BENTLIN (1997) sobre sepse tardia que mostrou 32% de evolução para choque em 43 recém-nascidos sépticos. Este fato explica-se pela diferente prevalência microbiológica na Unidade nos dois

períodos. Em 1997 havia predomínio de bactérias Gram-negativas multirresistentes como a *Klebsiella pneumoniae* (29,6%) com padrão muito agressivo e que pode ter contribuído para maior ocorrência do choque séptico. Neste estudo a bactéria mais frequente foi o *Staphylococcus coagulase negativa* (57%).

Dentre os 36 prematuros estudados, apenas dois evoluíram para óbito, ambos no grupo séptico (10,5%), mas não se relacionaram ao processo séptico, uma vez que ocorreram após o término do tratamento da sepse e foram atribuídos a complicações da prematuridade. Considerando que o principal agente isolado foi o *Staphylococcus coagulase negativa*, este dado é coerente com a literatura que refere baixa mortalidade, entre 8 a 10%, na sepse tardia por este agente (STOLL *et al.*, 1996 a; MAKHOUL *et al.*, 2002; STOLL *et al.*, 2002)

2.2 - Variáveis laboratoriais

O diagnóstico precoce e preciso do quadro séptico é fundamental para o adequado tratamento, influenciando positivamente o prognóstico e aumentando a sobrevida dos recém-nascidos. Entretanto isto não é fácil, pois o quadro clínico é inespecífico e os exames laboratoriais específicos que confirmam o diagnóstico apresentam limitações tais como custo e tempo para realização e para identificação do agente etiológico. Os exames inespecíficos têm como vantagens a disponibilidade, o baixo custo e a rapidez na realização, entretanto apresentam sensibilidade e especificidade variáveis (FREIJ & Mc CRACKEN, 1994; KLEIN & MARCY, 1995; POWELL & MARCY, 1995).

Neste estudo vários parâmetros laboratoriais inespecíficos foram analisados: contagem de leucócitos, índice neutrofilico e relação formas imaturas/formas maduras, contagem plaquetária, proteína C reativa, glicemia e o escore de Rodwell.

Os valores medianos de leucócitos e plaquetas foram normais nos dois grupos tanto no início do estudo como 24-48 horas após e portanto não se mostraram úteis no diagnóstico da sepse. Em 1988, RODWELL *et al.* demonstraram que a contagem de leucócitos isoladamente não era sinal

consistente de infecção e que a plaquetopenia era sinal tardio e pouco sensível. Outros autores referem que um terço dos recém-nascidos com bacteremia podem apresentar contagem normal de leucócitos na avaliação laboratorial inicial (POWELL & MARCY, 1995).

A plaquetopenia pode ocorrer entre 10 a 60% dos casos de sepse ou meningite. Acredita-se que ocorra por efeito direto da bactéria ou produtos bacterianos no endotélio vascular propiciando agregação e adesão plaquetária, ou destruição das plaquetas por mecanismos imunológicos. Pode ocorrer em outras condições não infecciosas como asfixia, ventilação mecânica, aspiração meconial e até mesmo em decorrência de patologias maternas como hipertensão induzida pela gestação, não sendo portanto útil no diagnóstico de sepse neonatal (POWELL & MARCY, 1995).

Na avaliação inicial do hemograma nos recém-nascidos sépticos (M1) a alteração mais evidente foi o aumento do índice neutrofilico e da relação formas imaturas/maduras, com normalização dos valores até 48 horas após (M2). Estes achados estão em concordância com RODWELL (1988) e ANDRADE & BARBOSA (1992) que consideram estes índices leucocitários como os mais sensíveis no diagnóstico de infecção neonatal. Entretanto, ensaios clínicos sobre testes diagnósticos que incluíram a determinação destes índices, não mostraram relação com quadros sépticos, o que pode ser explicado pela exaustão da medula óssea em doenças graves, resultando em baixos índices leucocitários (POWELL & MARCY, 1995).

Vários autores propõem que os exames inespecíficos sejam analisados em conjunto e de forma seriada, pontuando-se as alterações encontradas e obtendo-se escores com maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico da sepse neonatal (MANROE *et al.*, 1979; PHILIP & HEWITT, 1980; GERDES & POLLIN, 1987; RODWELL *et al.*, 1988). Um escore bastante utilizado na clínica é o de RODWELL *et al* (1988). Em nosso estudo o grupo séptico apresentou escore estatisticamente maior na avaliação inicial (M1). Entretanto vale ressaltar que este escore não identifica todos os recém-nascidos sépticos, sendo de maior utilidade na exclusão de infecção, quando sua pontuação é menor que 3.

A dosagem da PCR foi útil para diferenciar os prematuros sépticos no início do estudo (M1) e também após 48 horas. Embora a mediana em M2 nos dois grupos tenha sido zero, alguns recém-nascidos sépticos mantiveram PCR positiva, o que pode ser explicado pela menor sensibilidade do método de dosagem que foi a aglutinação do Látex. Merece ser comentado que nesta amostra não houve falso positivo pois todos os pacientes do grupo não infectado tiveram PCR negativa nos dois momentos de avaliação.

A PCR encontra-se elevada em 16% dos recém-nascidos na fase inicial do quadro séptico e em 92% dos casos com 24 horas de evolução. Seu pico máximo ocorre em dois a três dias e permanece elevada até o controle da infecção, retornando ao normal com 5 a 10 dias de tratamento adequado. Dosagens seriadas são úteis na avaliação da eficácia do tratamento e alertam para o aparecimento de complicações, auxiliando na determinação do tempo de antibioticoterapia (GERDES, 1994). Em 1995 KAWAMURA & NISHIDA analisaram os resultados de dosagens da PCR em 348 recém-nascidos com suspeita de infecção e obtiveram valor preditivo negativo de 99% para recém-nascidos de termo e 98% para prematuros, concluindo os autores pela utilidade deste exame na exclusão de infecção, evitando o uso desnecessário de antibióticos.

A glicemia foi significativamente maior no grupo séptico no momento inicial do estudo, embora com valores situados dentro da faixa de normalidade, o que é coerente com o conceito clássico que as infecções bacterianas alteram o metabolismo de carboidratos nos recém-nascidos. As variações na homeostasia da glicose são frequentes e importantes nos cuidados ao recém-nascido, mas são de valor limitado no diagnóstico de infecção (OGATTA, 1994;. POWELL & MARCY, 1995; BENTLIN, 1997).

A positividade em culturas foi bastante elevada neste estudo. A frequência de hemocultura positiva de 74% foi maior do que a encontrada em 1997 por BENTLIN (63%) em estudo com 43 recém-nascidos sépticos na UTI Neonatal do HC FMB - UNESP. Esta positividade pode estar relacionada ao método utilizado no Serviço, o BACTEC PEDS PLUS/F, técnica radiométrica altamente sensível que tem propiciado bons resultados. Entretanto, deve-se considerar que a positividade depende não somente da técnica empregada, mas

também da densidade do microorganismo responsável pela infecção, do uso de antibioticoterapia prévia, do volume coletado, da diluição realizada e do número de culturas (BUTTERY, 2002).

O principal agente isolado em hemocultura foi o *Staphylococcus coagulase negativa*, presente em 57% das hemoculturas positivas e responsável por 42% dos quadros de sepse tardia. Estes resultados são compatíveis com vários estudos da literatura, que apontam esta bactéria como principal agente etiológico de sepse tardia em recém-nascidos de muito baixo peso. No estudo multicêntrico do NICHD Neonatal Research Network publicado em 2002, foram avaliados 6215 prematuros de muito baixo peso e 21% destes apresentaram um ou mais episódios de sepse tardia. Os microorganismos Gram-positivos foram responsáveis por 70% destas infecções, sendo 48% delas causadas pelo *Staphylococcus coagulase negativa* (STOLL *et al.*, 2002). Estudo semelhante realizado pelo NICHD em 1996 com 6911 recém-nascidos de muito baixo peso já alertava para este dado, pois 73% dos episódios de sepse tardia foram causados por microorganismos Gram-positivos, entre eles o *Staphylococcus coagulase negativa* responsável por 55% dos casos (STOLL *et al.*, 1996 a). Estudo colaborativo realizado pela Pediatric Prevention Network (2001) para investigar a prevalência de infecções hospitalares em 29 Unidades de Terapia Intensiva Neonatal americanas, mostrou que dos 827 recém-nascidos estudados, 11,4% apresentaram infecções hospitalares, sendo este o principal o principal agente isolado (SOHN *et al.*, 2001).

Em nosso estudo, a urocultura possibilitou a identificação do agente etiológico em 26% dos casos o que difere da literatura, onde as taxas de positividade são baixas variando entre 5% e 9% (VISSER & HALL, 1979 ; BENTLIN, 1997; SOHN *et al.*, 2001). Entretanto das cinco uroculturas positivas, houve positividade pelo mesmo agente em sangue (2 culturas) e em líquido (1 cultura), que reforça que estes pacientes tinham realmente quadro infeccioso sistêmico. Embora a punção supra-púbica seja a técnica mais recomendada, alguns pacientes deste estudo foram submetidos a sondagem vesical por falha na punção (POWELL & MARCY, 1995).

Dos 17 pacientes submetidos à punção líquórica, cinco (29%) apresentaram alterações bioquímicas compatíveis com meningite, o que está

próximo aos dados de literatura que registra frequência de 15% a 25% da associação sepse e meningite (BRUUN & PAERREGAARD, 1991; FREIJ & Mc CRACKEN, 1994; KLEIN & MARCY, 1995).

2.3 - Determinação dos níveis séricos e urinários da IL-8

Os resultados deste estudo até aqui apresentados, corroboram a preocupação constante na literatura frente ao problema da sepse, frequente em UTI Neonatal, de manifestação inespecífica e que requer diagnóstico rápido para adequada terapêutica pois a mortalidade pode ser alta.

A necessidade de reduzir o uso indiscriminado de antibióticos e a emergência de bactérias multirresistentes são também focos de atenção e preocupação crescentes em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (CALIL *et al.*, 2001; SCHOLLIN, 2001). Neste contexto, a busca de marcadores precoces e de elevada acurácia no diagnóstico da sepse neonatal tem sido grande desafio para os pesquisadores a nível mundial.

Novos marcadores para sepse neonatal vem sendo investigados nos últimos anos entre eles: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, fator estimulante de colônias de granulócitos, moléculas de adesão intercelular e marcadores de ativação de complemento (PEAKMAN *et al.*, 1992; KENON *et al.*, 1996; NG *et al.*, 1997; MEHR & DOYLE, 2000; FRANZ *et al.*, 2001). Vários autores recomendam a utilização associada de diferentes marcadores, visando obter melhor sensibilidade e especificidade no diagnóstico da sepse (BUCK *et al.*, 1994; DE BONT *et al.*, 1994; DOELLNER *et al.*, 1998; SILVEIRA & PROCIANOY, 1999; FRANZ *et al.*, 2001).

A Interleucina 8 promove a liberação de neutrófilos da medula óssea com conseqüente ativação destes e ação quimiotáxica. Apresenta meia vida maior que as outras citocinas permanecendo elevada durante a infecção, sendo possível detectá-la na evolução do processo mesmo após a instituição da terapêutica. Por isto a IL-8 sérica tem sido proposta como marcador da sepse neonatal isoladamente ou em associação com outros marcadores (FRANZ *et al.*, 1999a; FRANZ *et al.*, 1999b, FRANZ *et al.*, 2001; MEHR *et al.*, 2001).

Nesta pesquisa os prematuros sépticos apresentaram níveis elevados da IL-8 sérica no início do estudo, embora sem diferença significativa em comparação ao grupo não infectado o que é coerente com o papel desta quimiocina no desencadeamento e amplificação do processo inflamatório (VASCONCELOS, 2001). Um achado interessante foi a persistência de níveis elevados de IL-8, 48 horas após instituição da terapêutica, comprovando a ação mais prolongada desta citocina, que mantém a resposta inflamatória. Seus níveis foram decrescentes de M1=929,3pg/ml para M2=535,7pg/ml, provavelmente pelo bloqueio do processo infeccioso com a antibioticoterapia.

Ao compararmos os valores da IL-8 no segundo momento do grupo não infectado com os valores iniciais dos recém-nascidos do grupo séptico (1013,1 x 929,3 pg/ml), observamos que estes valores foram muito próximos sugerindo que a IL-8 sérica isoladamente, não foi bom marcador diagnóstico de sepse neonatal tardia nesta pesquisa.

Em 1992, SCHIMOYA *et al.* com objetivo de determinar se o feto produzia ativamente IL-8 em resposta à estímulo de endotoxinas liberadas na corioamnionite, dosaram a IL-8 em sangue de cordão de 72 recém-nascidos prematuros menores que 36 semanas sendo 38 deles provenientes de mães com corioamnionite e 34 de mães sem infecção. Nos casos de corioamnionite os níveis de IL-8 foram significativamente maiores que nos não infectados (358 ± 937 pg/ml x 200 ± 442 pg/ml). Os casos mais graves de corioamnionite histológica, foram os que apresentaram os maiores níveis de IL-8. Foi investigado o efeito do corticóide antenatal nos títulos de IL-8 em sangue de cordão, dividindo-se os prematuros com corioamnionite em dois grupos, quanto ao uso ou não de corticóide materno. No grupo com corticóide (n= 10) o nível de IL-8 foi 642 ± 200 pg/ml, enquanto que no grupo sem corticóide (n= 28) foi de 1605 ± 936 pg/ml, com $p < 0,01$. Este efeito ocorreu quando o corticóide foi usado até 5 dias antes do parto. Não houve relação dos níveis de IL-8 com o uso de antibioticoterapia materna. Na comparação com outros marcadores utilizados no monitoramento de infecção fetal, a IL-8 com ponto de corte de 200pg/ml apresentou sensibilidade de 97% e especificidade de 89%, enquanto que a PCR (ponto de corte de 2,3 mg/dl) apresentou sensibilidade de 31% e especificidade de 97%, a contagem de leucócitos (ponto de corte de 12000/mm³) sensibilidade de 71% e

especificidade de 67% e IgM (ponto de corte de 20mg/dl) sensibilidade de 66% e especificidade de 88%. Os autores sugerem que o nível de IL-8 em sangue de cordão reflete o nível de IL-8 fetal e pode ser marcador útil em cordocentese, para identificação de corioamnionite antes do nascimento. Este estudo também mostrou a supressão in vivo da produção fetal de IL-8 em decorrência do transporte placentário do corticóide administrado à mãe (SHIMOYA *et al.*, 1992).

A análise do genoma da IL-8 identificou a presença de um elemento de resposta ao glicocorticóide (GRE - glucocorticoid responsive element) sugerindo que o GRE desempenha papel chave na regulação da produção da IL-8. A incubação de células produtoras de IL-8 com glicocorticóide e ativação do GRE resulta em supressão da produção da IL-8 in vitro (MUKAIDA *et al.*, 1989).

Em nosso estudo a frequência de exposição ao corticóide antenatal foi semelhante nos dois grupos e provavelmente não teve influência nos resultados obtidos pois os recém-nascidos não foram estudados ao nascimento e a idade pós-natal no início do estudo situou-se entre o final da primeira semana e o início da segunda semana (GS 9,7 dias e GNI 6,9 dias), o que ultrapassa o período de expectativa de efeito do corticóide antenatal, referido no estudo de SHIMOYA *et al.* em 1992.

Um aspecto que sustenta a IL-8 como quimiocina que mantém níveis elevados e que justificaria os altos valores encontrados neste estudo, é que ela é marcador secundário na sepse, surgindo após a expressão de outras citocinas como TNF- α e IL-1 β (SAEZ-LLORENZ & Mc CRACKEN, 1993).

BERNER *et al.* (1998) estudaram os níveis de diversos mediadores inflamatórios em sangue de cordão umbilical e de recém-nascidos entre 24 - 48 horas e após 48 horas de vida. Foram constituídos 3 grupos: G1: 35 RN com sepse, idade gestacional média (IG) de 38 semanas (26-42), peso de nascimento (PN) de 2740g (820-4170); G2: 66 RN com infecção não confirmada, IG de 34 semanas (26-42), PN de 1990g (860-4600) e G3: 35 RN controle, sadio, IG de 40 semanas (38-41), PN de 3360g (2420-4160). Os recém-nascidos sépticos (G1) apresentaram altos níveis de fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e iCAM-1. As concentrações de G-CSF, IL-8, IL-6 e IL-1 β em sangue de cordão foram maiores que as maternas. Os níveis de G-CSF, IL-6 e IL-8 em sangue de cordão, foram maiores do que entre 24-48 horas e os

menores valores foram encontrados após 48 horas. Assim, estas citocinas foram consideradas marcadores precoces da sepse e seus altos níveis poderiam ser consequência do estímulo infeccioso ao sistema imune antes do nascimento.

Outro resultado interessante neste estudo de BERNER foi que a IL-8 esteve bastante elevada em G1 (sepse) no sangue de cordão, e com a instituição da antibioticoterapia seus níveis permaneceram elevados porém inferiores a dosagem inicial. Os menores valores ocorreram após 48 horas. A comparação dos níveis de IL-8 entre os grupos mostrou que entre G1 e G2 (séptico x infecção não confirmada) não houve diferença, enquanto entre G1 e G3 (séptico x saudáveis) e G2 x G3 (infecção não confirmada x saudáveis) houve diferença significativa (BERNER *et al.*, 1998).

Embora estes dados sejam referentes à infecção precoce, eles são semelhantes aos resultados encontrados na sepse tardia em nosso estudo. É interessante notar que os prematuros que constituíram nosso grupo não infectado apresentaram inicialmente sinais e sintomas que levaram à suspeita de sepse. Portanto devem ter sofrido influência de outras condições não infecciosas que justificariam a presença destas manifestações e poderiam aumentar a produção de citocina pró-inflamatória. Tais condições foram representadas pela morbidade do grupo, incluindo a síndrome do desconforto respiratório, a persistência do canal arterial e alterações ultrassonográficas de hiperecogenicidade cerebral. Como o grupo “controle” caracterizou-se por ausência de infecção mas não foi um controle saudável, e sendo a IL-8 marcador inflamatório não específico, justifica-se os níveis encontrados desta quimiocina nos recém-nascidos não infectados.

Na leucomalácia peri-ventricular e em alterações cerebrais isquêmicas pode ocorrer aumento na produção de citocinas (SHALAK *et al.*, 2002) e na síndrome do desconforto respiratório já foi evidenciado aumento da IL-8 em culturas de células (KWONG *et al.*, 1998; KALMAN *et al.*, 1999). Alguns autores sugerem que a síndrome do desconforto respiratório ou qualquer situação que necessite de ventilação mecânica pode causar liberação de citocinas, incluindo a IL-8 (FRANZ *et al.*, 1999a).

Dentre nossos pacientes 37% do grupo séptico e 29% do grupo não infectado estavam em uso ou tinham usado ventilação mecânica nas 48

horas que antecederam o estudo, podendo este ser um fator contributivo aos altos níveis de IL-8 sérica encontrados nesta pesquisa.

Se tivéssemos optado por constituir o grupo controle com recém-nascidos saudáveis, talvez pudéssemos constatar diferenças significativas entre recém-nascidos prematuros sépticos e saudáveis. Entretanto o objetivo do estudo foi focalizar nossa realidade, pois a grande dúvida em iniciar antibioticoterapia ocorre exatamente nestes pacientes, pela falta de especificidade dos dados clínicos e laboratoriais.

Outro aspecto interessante a ser discutido é a ação da IL-8 induzindo a quimiotaxia de neutrófilos, e permanência destes por maior período de tempo na circulação. A neutrofilia induzida, foi demonstrada em estudo experimental com ratos, que receberam injeção intravenosa de IL-8 ou solução salina (grupo controle). O objetivo foi avaliar a liberação de polimorfonucleares (PMN) da medula óssea. O grupo que recebeu IL-8, apresentou inicialmente rápido declínio de PMN circulantes, caracterizado por granulocitopenia, com posterior aumento e conseqüente neutrofilia, como observado na sepse. Os autores sugerem que o aumento mais tardio da IL-8 durante endotoxemia e sepse pode ser decorrência da indução da biossíntese da IL-8 pela IL-1 e TNF- α . A neutropenia foi acompanhada de gradiente transitório artério-venoso de PMN e células jovens nos pulmões, sugerindo sequestro nos microvasos pulmonares, efeito este rápido, aproximadamente 8 minutos, e reversível (TERASHIMA *et al.*, 1998).

A liberação de IL-8 após estímulo de outras citocinas permite que se tenha maior tempo para sua avaliação e posterior controle evolutivo do quadro séptico.

No estudo clínico de EDGARD *et al.* (1994) os autores também avaliaram os níveis de IL-8 em 60 recém-nascidos com suspeita de infecção precoce e tardia, com idade gestacional média de 29 semanas e peso de nascimento de 1320g. Dentre estes pacientes, 43 foram considerados infectados (25 com hemocultura positiva), 11 não infectados e 6 casos suspeitos. Os valores de IL-8 foram significativamente maiores no grupo infectado, embora a sensibilidade e especificidade tenham sido baixas, 70% e 77% respectivamente, não sendo útil no diagnóstico de infecção. A baixa especificidade ocorreu pelo

aumento da IL-8 no grupo não infectado, sugerindo que a ativação neutrofilica foi um fenômeno comum e inespecífico nesta casuística. É interessante notar que neste trabalho o critério de inclusão foi a suspeita de infecção, com definição dos grupos a partir da evolução clínica e laboratorial dos pacientes, assim o grupo não infectado, não foi necessariamente um grupo sem patologias. Observa-se ainda que este estudo abrangeu sepse precoce e tardia em recém-nascidos de termo e prematuros, o que pode ter influenciado nos resultados.

Um grupo de pesquisadores alemães, tem obtido resultados bastante promissores da IL-8 sérica, como marcador da sepse neonatal e como alternativa diagnóstica para evitar o uso desnecessário e abusivo de antibióticos.

Em 1999, este grupo investigou o valor diagnóstico da procalcitonina (PCT), IL-8, PCR e índice neutrofilico em recém-nascidos com suspeita de infecção de corrente sangüínea (FRANZ *et al.*, 1999a). Foram avaliados 162 RN menores que 11 dias, com idade gestacional entre 23 e 42 semanas, sendo 52 RN menores que 30 semanas. A suspeita de infecção ocorreu na presença de pelo menos um sinal clínico de infecção (palidez, pele acinzentada, perfusão lentificada, taquipnéia, dispnéia, apnéia, $FiO_2 > 0,21$, insuficiência respiratória, hipotensão, hipotonia muscular, hipertonia, hiperexcitabilidade, irritabilidade, letargia) ou história materna de infecção amniótica (rotura prematura de membranas, rotura de membranas por mais que 24 horas, temperatura materna $> 38,5^\circ C$, líquido amniótico fétido, taquicardia fetal). A confirmação diagnóstica ocorreu na presença de pelo menos um sinal clínico e hemocultura positiva. Dos 162 RN avaliados, 9 apresentaram infecção confirmada, 37 tiveram infecção clínica e 116 foram considerados não infectados. Neste estudo a PCT isoladamente não foi bom marcador de sepse, com baixos valores de sensibilidade e especificidade. Os resultados da dosagem de IL-8 mostraram que: isoladamente, com ponto de corte de 70 ng/L a sensibilidade e especificidade foram baixas, 83% e 76%, respectivamente. A combinação da IL-8 e ou PCR aumentou a sensibilidade para 91%. Um aspecto interessante na análise da IL-8 foram os valores encontrados nos 9 pacientes com hemocultura positiva, que variaram de acordo com o agente isolado, podendo a resposta estar relacionada com a virulência do agente. Assim, os menores valores ocorreram

com o *Staphylococcus epidermidis* (75-186ng/L) e os maiores com *Acinetobacter sp* e *Streptococcus do grupo B* (2830 - 10000ng/L).

Em nosso estudo, das 14 hemoculturas positivas, o *Staphylococcus coagulase negativa* foi isolado em 8 casos, fato este que poderia justificar a falta de poder discriminatório da IL-8 sérica.

Ainda em 1999, o mesmo grupo de pesquisadores propôs a utilização em conjunto da IL-8 e da PCR em recém-nascidos com infecção hospitalar precoce e tardia, com o objetivo de reduzir a antibioticoterapia desnecessária. Os critérios adotados para definir infecção foram os mesmos utilizados no trabalho anterior. O estudo foi projetado para duas etapas: a primeira com avaliação retrospectiva de 260 RN, sendo 162 menores que 30 semanas, com suspeita de infecção precoce ou tardia, no período de um ano. Nestes recém-nascidos foi dosada a IL-8 e a antibioticoterapia foi indicada se PCR > 10 mg/L e/ou índice neutrofilico > 0,2. Os RN foram divididos em 3 grupos de acordo com sua evolução. G1: 26 RN com infecção confirmada, IL-8 mediana de 112 pg/ml (<20 a > 10000); G2: 32 RN com infecção clínica, IL-8 de 105 pg/ml (<20 a >10000) e G3: 202 RN não infectados, IL-8 de 27 pg/ml (< 20 a 213). Na segunda etapa o estudo foi prospectivo com 215 RN sendo 147 menores que 30 semanas, e que receberam antibióticos na suspeita de infecção se PCR >10 mg/L e/ou IL-8 ≥ 53 pg/ml. Os valores medianos de IL-8 foram: G1: 33 RN, IL-8=309 pg/ml, G2: 33 RN, IL-8=213 pg/ml e G3: 149 RN, IL-8=149 pg/ml. A sensibilidade da IL-8 com ponto de corte de 53 pg/ml foi de 84% na primeira etapa do estudo e 91% na segunda etapa. Quando a IL-8 e/ou PCR > 10 mg/L foram associadas, a sensibilidade aumentou para 93% na primeira etapa e para 100% na segunda. Antes do início do estudo, a antibioticoterapia era utilizada em 71% dos casos com suspeita clínica de infecção e aumento da PCR. Na avaliação retrospectiva foi detectado uso desnecessário de antibióticos em 58% dos casos. Após a introdução da IL-8 na decisão de iniciar ou não antibióticos, houve redução de 40% no seu uso em recém-nascidos com suspeita de infecção, sendo que destes, apenas 23% foram considerados como tratados desnecessariamente. Esta pesquisa mostrou grande variabilidade dos níveis da IL-8, observada também em nosso estudo, e a melhor acurácia da IL-8 quando associada a outro marcador como a PCR. Nossos resultados corroboram estes

achados pois evidenciamos que a IL-8 sérica isoladamente não é bom marcador de infecção. (FRANZ *et al.*, 1999b).

Em 2001, FRANZ *et al.* realizaram outro estudo com o mesmo delineamento da pesquisa anterior, mas agora especificamente na infecção precoce, até 72 horas de vida, com o objetivo de reduzir o uso desnecessário de antibióticos. Na primeira etapa foram avaliados 378 RN, com idade gestacional de 22 a 43 semanas (35 semanas), divididos em três grupos onde G1: 7 RN com infecção confirmada, IL-8=1074 pg/ml (42 a > 10000); G2: 63 RN com infecção clínica, IL-8=255 pg/ml (19 a > 10000); G3: 308 RN controles, IL-8=36pg/ml (<5 a > 10000). Na segunda etapa 331RN com idade gestacional semelhante aos anteriores foram divididos nos mesmos três grupos sendo: G1: 7 RN, IL-8=3148 pg/ml (134 a > 10000); G2: 105 RN, IL-8=152 pg/ml (10 a >10000); G3: 219 RN, IL-8=32 pg/ml (5 a 1576) e foi incluído um quarto grupo, G4 com 47 RN termos, saudáveis, IL-8=16,9 pg/ml (< 5 a 112). As dosagens foram realizadas em 3 momentos: na admissão dos pacientes, entre 12 e 36 horas de vida e entre 36 e 60 horas de vida. Na primeira etapa a IL-8 com ponto de corte de 70 pg/ml esteve aumentada em 62% dos casos de G1 e G2 enquanto a PCR ainda estava normal. A combinação de IL-8 \geq 70 pg/ml e/ou PCR > 10 mg/ L apresentou sensibilidade de 92% e especificidade de 74%. Na segunda etapa do estudo a antibioticoterapia foi restrita àqueles recém-nascidos com suspeita clínica de infecção que apresentavam IL-8 \geq 70 pg/ml e/ou PCR > 10 mg/L. Um total de 219 RN foram considerados retrospectivamente não infectados. Do total de recém-nascidos remanescentes nos quais todos os parâmetros foram avaliados, a utilização da IL-8 e/ou PCR junto com os sinais clínicos de infecção, diminuiu em 40% o uso desnecessário de antibióticos (FRANZ *et al.*, 2001).

Estes autores estudaram também a cinética da IL-8 em recém-nascidos de termo e prematuros, com idade gestacional de 22 a 43 semanas. Dosagens repetidas de IL-8 foram realizadas em 81 RN não infectados e em 55 com infecção confirmada ou infecção clínica. As dosagens foram obtidas em três momentos: na admissão, entre 12 e 36 horas e entre 36 e 60 horas. A sensibilidade da IL-8 foi de 85% na admissão e diminuiu para 35% entre 12 e 36 horas e para 15% entre 36 e 60 horas. A sensibilidade da PCR nestes três momentos foi de 23%, 73% e 69%. A combinação da IL-8 e PCR na admissão

aumentou a sensibilidade para 93%. Estes dados sugerem que a IL-8 está aumentada tanto em RN de termo quanto em prematuros e que seu aumento precede em 12 a 24 horas o aumento da PCR. Ao investigar o efeito da idade gestacional na sensibilidade e especificidade constatou-se que a especificidade foi maior nos termos enquanto a sensibilidade foi maior nos prematuros. Em recém-nascidos menores que 30 semanas a sensibilidade ficou em torno de 90% enquanto a especificidade ficou em 55%. Nos maiores que 34 semanas a sensibilidade variou de 70% a 75% e a especificidade de 83% a 85% (FRANZ *et al.*, 2001).

MEHR *et al.* (2001) avaliaram as concentrações séricas de IL-6 e IL-8 em recém-nascidos com sinais clínicos de infecção (precoce ou tardia) visando determinar a acurácia destas citocinas como marcadores precoces de infecção. Foram constituídos 4 grupos: G1: 11 RN com infecção confirmada por cultura positiva em sangue, líquido ou urina; pneumonia caracterizada pelos sinais clínicos e radiológicos e hemocultura positiva; enterocolite necrozante no mínimo grau II, com ou sem hemocultura positiva; G2: 12 RN com infecção provável, cultura negativa em sangue, líquido ou urina, e com alterações de PCR e dos valores de neutrófilos; G3: 52 RN nos quais a infecção não pode ser confirmada ou excluída; G4: 26 RN com sinais iniciais sugestivos de infecção mas o diagnóstico foi afastado em função de cultura negativa, PCR normal e valores de neutrófilos normais. Os níveis da IL-6 e da IL-8 no grupo com infecção confirmada (G1) foram significativamente maiores que nos demais grupos ($G1 > G2=G3=G4$) e $G1 > G4$, entretanto a IL-6 no ponto de corte de 175pg/ml e a IL-8 em 28 pg/ml tiveram sensibilidade de 80% e 82% respectivamente, e especificidade de 91% e 81%. Neste estudo tanto a IL-6 quanto a IL-8 apresentaram pouca acurácia diagnóstica na infecção provável, sendo mais sensíveis nos quadros de infecção confirmada.

Um aspecto inédito e muito interessante em nosso estudo foi a determinação dos níveis urinários da IL-8 em prematuros sépticos e não infectados.

Na suspeita da sepse (M1) as dosagens urinárias mostraram valores significativamente maiores da IL-8 no grupo de recém-nascidos prematuros sépticos comparado aos não infectados ($p = 0,001$). Após 48 horas de

antibioticoterapia (M2) os níveis de IL-8 urinária diminuíram significativamente em relação ao momento inicial do estudo (M1 > M2) e não se diferenciaram em relação aos não infectados.

A IL-8 ajustada pela creatinina urinária (IL-8 ur/cr) apresentou os mesmos resultados estatísticos, encontrados para a IL-8 urinária, ou seja, no momento da suspeita da sepse o grupo de prematuros sépticos apresentou valores significativamente maiores do que o grupo não infectado. Houve diminuição significativa destes valores 48 horas após o tratamento e assim em M2 não houve diferença entre os grupos. Destaca-se no grupo não infectado que todos os valores (medianas e percentis) da IL-8 ur/cr foram baixos nos dois momentos de avaliação.

A detecção urinária da IL-8 foi relatada em 1991, em adultos com inflamação vesical após ressecção da próstata em decorrência de neoplasia (BETTEX-GALLAND *et al.*, 1991).

Em 1994, TULLUS *et al.* dosaram as IL-6 e IL-8 em urina de 41 crianças com pielonefrite aguda e investigaram a relação entre os níveis dessas citocinas e alterações na cintilografia com DMSA. Tanto a IL-6 quanto a IL-8 foram detectadas em altas concentrações na urina destas crianças na fase aguda da doença, mas apenas o aumento IL-6 ur/cr associou-se às alterações de cintilografia, sugerindo os autores que a IL-6 poderia ser utilizada como indicador de risco de lesão renal persistente em casos de pielonefrite (TULLUS *et al.*, 1994).

Estudo com metodologia semelhante foi realizado por ROILIDES *et al.* (1999) em recém-nascidos com infecção urinária. A IL-6 esteve presente em altas concentrações na urina destes pacientes e também associou-se à presença de cicatriz renal.

Em 2000, JANTAUSCH *et al.* dosaram estas IL-6 e IL-8 na urina de crianças hospitalizadas com infecção urinária. A IL-6 foi dosada em 39 pacientes, a IL-8 em 34 e o grupo controle constituiu-se de 37 crianças. Na admissão os níveis urinários da IL-6 e da IL-8 foram maiores nas crianças com infecção urinária em comparação aos controles, e 48 horas após o início do tratamento houve diminuição significativa das duas citocinas. A IL-8 apresentou relação com um uropatógeno específico que foi a *Escherichia coli* produtora de

hemolisina, sugerindo os autores que este agente poderia estimular a produção local de citocina. Esta mesma hipótese foi aventada por ROILIDES (1999) que identificou a *E. coli* como agente causador de 89% das infecções urinárias diagnosticadas.

Recentemente, RAO *et al.* (2001) investigaram a implicação da detecção da IL-8 na urina. A IL-8 foi dosada em 305 amostras de urina de pacientes com idade de 0 a 18 anos, divididos em três grupos: G1: 14 pacientes com infecção urinária confirmada, cujas média, mediana e variação da IL-8 foram de 1642 pg/ml, 1010 pg/ml e 0 a 5816 pg/ml, respectivamente. O principal agente isolado foi a *Escherichia coli* e mais de 50% dos pacientes eram lactentes. Em G2: 21 pacientes, apenas dois lactentes, com infecção urinária provável, nos quais a IL-8 apresentou média de 1003 pg/ml, mediana 404 pg/ml e variação de 0 a 8334 pg/ml. E finalmente G3: 257 pacientes sem infecção urinária, com média de 117 pg/ml, mediana 0 pg/ml e variação de 0 a 3960 pg/ml. Com ponto de corte de 200pg/ml a sensibilidade da IL-8 foi de 93% e a especificidade 90%. Neste estudo a IL-8 foi marcador sensível, porém esta citocina é apenas um dos vários fatores que podem operar na patogênese da doença. Os autores concluíram que a infecção do trato urinário ativa a resposta local de citocinas.

A presença da IL-8 urinária em casos de infecção em outros sítios e infecção sistêmica foi demonstrada no estudo de STIEMER *et al.* (1997) cujo objetivo foi investigar se a IL-8 poderia ser detectada em urina de mulheres grávidas com rotura prematura de membranas, e se os níveis urinários estariam relacionados aos sinais de infecção intra-amniótica. As gestantes foram divididas em três grupos: G1: 22 gestantes, sem sinais de infecção, G2: 32 com sinais mínimos de infecção, alterações placentárias mínimas ou ausentes, discreto aumento da PCR ou discreta leucocitose e G3: 17 com sinais graves de infecção, intenso aumento da PCR ou intensa leucocitose, importantes lesões placentárias ou sepse no recém-nascido. Gestantes com infecção urinária foram excluídas. A IL-8 foi detectada na urina de 91 entre 104 gestantes com rotura prematura de membranas, e os valores excederam 1000ng/L nos casos de infecção intra-amniótica grave. As maiores diferenças foram observadas entre G1 e G3. As alterações da IL-8 foram mais importantes que as da PCR e da contagem de

leucócitos. Este estudo mostrou pela primeira vez que a IL-8 pode ser dosada na urina de gestantes na ausência de infecção urinária e com níveis que refletem infecção intra-amniótica.

A forma pela qual a IL-8 pode ser detectada na urina após infecção em outro sítio não está totalmente esclarecida. No caso da infecção intra-amniótica a IL-8 poderia alcançar a circulação sistêmica através das membranas fetais, com subsequente clearance pelos rins, e após filtração glomerular ser detectada na urina (STIEMER *et al.*, 1997). Também existe evidência que as hemácias teriam receptores para a IL-8 e poderiam ser responsáveis pelo transporte desta interleucina na circulação, com baixos níveis de IL-8 livre no soro. Talvez por esta razão, os níveis da IL-8 na urina e até em líquido amniótico podem exceder aqueles registrados em sangue periférico, conforme verificado no estudo de STIEMER *et al.* (1997).

Estes dados podem justificar a presença da IL-8 urinária na sepse independente de infecção urinária, como sendo decorrência do clearance da IL-8 sérica, liberada após o início do processo infeccioso e transportada pelas hemácias até o rim, onde após filtração seria excretada na urina, conforme proposto por STIEMER *et al.* (1997) e RAO *et al.* (2001).

O estudo dos receptores de citocinas vem propiciando avanços na fisiopatologia de doenças e podem esclarecer várias questões ainda obscuras a respeito destes mediadores.

Os receptores para interleucinas estão presentes em tecidos hematopoiéticos e também em órgãos somáticos, conforme evidenciado por DAME & JUUL (2000).

Estes autores investigaram a distribuição tecidual e a expressão celular de receptores para IL-6 (IL-6R) e IL-8 (IL-8R) em fases precoces do desenvolvimento do feto humano, por meio de técnicas de imunohistoquímica, e o resultado foi surpreendente. Em fetos com 8 e 16 semanas de idade gestacional, tanto IL-6R quanto IL-8R foram detectados em todos os tecidos pesquisados: cérebro, medula, olhos, coração, pulmões, fígado, baço, adrenal, rins, intestino e placenta. A expressão celular específica para IL-8R ocorreu no sistema nervoso central, em grupos de neurônios e astrócitos, e nos órgãos somáticos sendo detectada na medula óssea, miocárdio, células do epitélio

bronquiolar, hepatócitos, enterócitos, células da zona glomerulosa e fasciculada da adrenal, do sistema coletor dos rins, e células da placenta. A ampla expressão destes receptores sugere papel não apenas hematopoiético para seus ligantes. Suas funções não estão totalmente definidas mas é possível que sejam responsáveis pela detecção das citocinas em outros tecidos e fluidos, incluindo a urina (DAME & JUUL, 2000).

Estudo realizado por CALHOUN *et al.* (2000) com dosagens sérica e urinária de outra citocina, o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) em recém-nascidos neutropênicos antes e após a administração do G-CSF recombinante, obteve resultados interessantes e que podem ajudar a esclarecer a presença de citocinas na urina de neonatos sépticos. Os autores estudaram 10 RN neutropênicos que foram tratados com G-CSF recombinante durante 3 a 5 dias. Amostras de soro e urina foram obtidas para dosagem do G-CSF antes e após a intervenção terapêutica. O grupo 1 constituiu-se de 5 RN com neutropenia secundária a hipertensão induzida pela gestação, restrição de crescimento ou doença hemolítica Rh e o grupo 2 por 5 RN com sepse bacteriana e choque. Antes de receberem a primeira dose de G-CSF recombinante as concentrações séricas e urinárias de G-CSF no grupo 1 foram baixas e antes da dose final as concentrações séricas foram muito maiores enquanto as concentrações urinárias não variaram. No grupo 2 antes da primeira dose as concentrações endógenas séricas e urinárias já eram muito altas e antes da dose final foram menores. Os autores sugerem que o clareamento do G-CSF sérico ocorreria por saturação da ligação de seus receptores. No grupo séptico onde já havia grande liberação da citocina os receptores estavam saturados antes da administração da forma recombinante, justificando a presença em altas concentrações no soro e urina, com pouco benefício após a administração exógena. No grupo 1 a G-CSF recombinante aumentou a concentração sérica, mas provavelmente não saturou os receptores pois os níveis urinários não mostraram alterações. Outro aspecto aventado pelos autores é que flutuações na concentração da citocina urinária podem resultar da terapêutica antimicrobiana ou do aumento na ligação do G-CSF com seus receptores (CALHOUN *et al.*, 2000).

Este mecanismo pode justificar também a presença da IL-8 na urina dos prematuros sépticos em nosso estudo.

A determinação dos níveis séricos e urinários da IL-8 permitiu a análise de correlação entre IL-8 sérica, urinária e IL-8 ur/cr com outros parâmetros clínicos e laboratoriais, entre eles, peso de nascimento, idade gestacional, idade pós-natal, número de procedimentos de risco, índice neutrofílico, escore de Rodwell e PCR.

A IL-8 sérica correlacionou-se apenas com o índice neutrofílico. Este resultado justifica-se por ser a IL-8 uma citocina quimiotática para neutrófilos, conforme já documentado experimentalmente em estudo com ratos nos quais a administração de IL-8 intravenosa promoveu aumento de células jovens e neutrofilia (TERASHIMA *et al.*, 1998).

Não encontramos correlação dos níveis séricos de IL-8 com o peso de nascimento e idade gestacional. A literatura refere que tanto prematuros quanto termos, podem apresentar níveis aumentados de IL-8 em doenças infecciosas e inflamatórias neonatais, mostrando competência do seu sistema imunológico neste aspecto (FRANZ *et al.*, 2001 ; SCHULTZ *et al.*, 2002).

Um importante estudo sobre a resposta inflamatória do recém-nascido foi realizado por SCHULTZ *et al.* (2002) com base em modelo de sepse induzida por endotoxina, no qual os monócitos foram obtidos de sangue venoso de cordão umbilical de 45 recém-nascidos de termo saudáveis e 74 prematuros. As citocinas IL-6 e IL-8 foram analisadas diretamente nas células. Os prematuros foram divididos em 3 grupos: G1: 36 RN com média de 34 semanas de idade gestacional (IG) e 2180g de peso de nascimento (PN); G2: 27 RN, IG de 31 semanas, PN de 1315g, e G3: n=11, IG de 27 semanas, PN de 765g com infecção confirmada por hemocultura, sepse clínica ou evidências histopatológicas de corioamnionite. O controle foi feito com 50 adultos saudáveis. Os monócitos obtidos foram estimulados com endotoxina e os resultados mostraram a existência de resposta inflamatória tanto nos recém-nascidos de termo como nos prematuros. A exposição ao corticóide antenatal ocorreu em 8%, 48% e 100% nos grupos 1, 2 e 3 respectivamente e os níveis de IL-6 foram menores nos recém-nascidos expostos a esta terapêutica. Semelhante aos nossos resultados o estudo de SCHULTZ também não mostrou correlação da IL-8 com a idade gestacional,

sugerindo que a produção de IL-8 pode estar aumentada mesmo em recém-nascidos prematuros (SCHULTZ *et al.*, 2002).

Não existe estudo na literatura de correlação entre IL-8 e o escore de Rodwell. A ausência de correlação evidenciada nesta pesquisa justifica-se porque este escore envolve além dos neutrófilos, outros parâmetros hematológicos que não se relacionam com a atividade quimiotóxica da IL-8.

Quanto a dosagem da PCR várias pesquisas sugerem seu uso associado com a IL-8 visando melhorar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico da sepse neonatal, pois o aparecimento da IL-8 precede em 12 a 24 horas o aumento da PCR (FRANZ *et al.*, 1999a, FRANZ *et al.*, 1999b, FRANZ *et al.*, 2001, MEHR *et al.*, 2001).

No trabalho de FRANZ *et al.* (2001) em recém-nascidos com infecção confirmada, a sensibilidade da IL-8 sérica foi maior na admissão (85%), diminuindo de forma progressiva e acentuada nas próximas 60 horas, enquanto a sensibilidade da PCR foi bem menor no início do estudo (23%), com aumento para 73% entre 12 a 36 horas. Assim não seria esperado que encontrássemos correlação entre estes marcadores em nosso estudo.

A IL-8 urinária mostrou correlação com a idade pós-natal, e este fato talvez possa ser explicado porque prematuros menores que 34 semanas de idade gestacional tem limitada taxa de filtração glomerular ao nascimento, ocorrendo progressiva melhora da filtração glomerular nas primeiras semanas de vida (BUEVA & GUIGNARD, 1994). Assim, ao se ajustar os valores da IL-8 urinária pela creatinina urinária não houve correlação com a idade pós-natal.

Uma vez que a presença da IL-8 na urina depende provavelmente da saturação de receptores e do seu clearance pelos rins, não esperávamos que houvesse qualquer correlação entre IL-8 urinária e parâmetros clínicos ou laboratoriais (STIEMER *et al.*, 1997; CALHOUN *et al.*, 2000; DAME & JUUL, 2000)

Outro dado interessante encontrado nesta pesquisa foi a ausência de correlação entre os valores da IL-8 no sangue e na urina o que possivelmente se deve ao fato da IL-8 ser detectada na urina após o seu clareamento do sangue pelos rins (STIEMER *et al.*, 1997; RAO *et al.*, 2001). Outra possibilidade seria a síntese desta citocina por células estimuladas por

endotoxinas em órgãos não hematopoiéticos incluindo os rins, independente da produção pelos tecidos hematopoiéticos e monócitos circulantes. Este questionamento fundamenta-se no estudo de DAME & JUUL (2000), que documentou a presença de IL-8R em muitos tecidos em fases precoces do desenvolvimento fetal.

A correlação entre a IL-8 urinária e a IL-8 ur/cr era esperada pois esta última reflete apenas o ajuste nas concentrações das amostras urinárias, o que é importante em estudos com recém-nascidos, especialmente prematuros nas primeiras semanas de vida.

Após a determinação dos níveis de IL-8 no sangue e urina de prematuros sépticos e não infectados, procuramos estabelecer o elo entre a ciência e a prática clínica, ou seja não nos contentamos apenas em saber se a IL-8 estava aumentada no sangue e ou urina dos prematuros infectados, mas dado o aumento desta interleucina, saber qual seria a possibilidade do recém-nascido prematuro ter sepse tardia (valor preditivo positivo). Quando a concentração da IL-8 estiver normal, qual a probabilidade do prematuro não ter sepse tardia (valor preditivo negativo); qual a proporção de exames positivos quando o prematuro tem sepse (sensibilidade); qual a proporção de testes negativos nos prematuros que não tem sepse (especificidade). Todos estes princípios devem ser utilizados para avaliar a utilidade da IL-8 no sangue e urina (ATALLAH & CASTRO, 1997).

Os cálculos de sensibilidade e especificidade e a demonstração de quantos pacientes nestes valores foram considerados verdadeiros positivos e negativos bem como falsos positivos e negativos, possibilitou a construção da curva de operação resposta, curva ROC, para cada uma das interleucinas estudadas. O objetivo foi determinar o ponto de corte ótimo, aquele que tem o maior valor de sensibilidade com o menor número de falsos positivos.

Os resultados encontrados foram muito interessantes. O ponto de corte para a IL-8 sérica foi de 304 pg/ml mostrando sensibilidade de 84% e especificidade de 47%. Em nossa avaliação inicial, ao compararmos prematuros sépticos e não infectados, a IL-8 sérica já não se mostrou útil como marcador precoce de sepse neonatal tardia, não diferindo entre os grupos. Os resultados

apresentados na curva ROC mostram que ela não diferiu porque apresenta baixa sensibilidade e especificidade.

Não existe um ponto de corte ótimo já estabelecido. O pesquisador tem que determinar no seu estudo, qual o melhor valor, ou seja, aquele que confere maior sensibilidade com menor taxa de falsos positivos. É por este motivo que encontramos na literatura, diferentes valores de ponto de corte e sensibilidade, com resultados conflitantes.

As concentrações de IL-8 em sangue de cordão analisadas por LEHRNBECHER *et al.* (1996) em 13 RN sépticos e por BERNER *et al.* (1998) em 16 RN sépticos, mostraram-se significativamente elevadas quando comparadas com os RN não sépticos. O ponto de corte de 150 pg/ml no estudo de LEHRNBECHER apresentou sensibilidade de 69% e especificidade de 91%, enquanto que no trabalho de BERNER sensibilidade de 91% e especificidade de 93% foram obtidas no ponto de corte de 300 pg/ml. A sensibilidade dos kits de análise (ELISA) foi questionada para explicar essa diferença, sendo sugerido que os kits utilizados por BERNER poderiam ser mais sensíveis (MEHR & DOYLE, 2000). Entretanto, independente de kits, os resultados de dosagens de IL-8 são variáveis e o pequeno número de pacientes nos estudos pode ser um fator contributivo.

EDGARD *et al.* (1994) dosaram a IL-8 sérica em recém-nascidos com sepse precoce e tardia. As concentrações foram maiores nos grupos com sepse e infecção não confirmada, quando comparados aos controles, entretanto não houve diferença significativa entre sépticos e infecção não confirmada. Neste estudo, a IL-8 teve pouca acurácia diagnóstica, com sensibilidade de 70% e especificidade de 77%.

No estudo de FRANZ *et al.* (1999a) em 162 RN com suspeita de infecção hospitalar, obteve-se pela curva ROC, o ponto de corte ótimo de IL-8 ≥ 70 ng/ml com sensibilidade de 83% e especificidade de 76%. Houve melhora da sensibilidade para 91%, com a associação da PCR > 10 mg/L, embora a especificidade tenha diminuído discretamente, de 76 para 73%.

Outro estudo do mesmo grupo de pesquisadores, investigou a IL-8 em recém-nascidos com infecção precoce e tardia, em dois períodos distintos. No primeiro período foram avaliados 260 RN e no segundo 215 RN. A curva ROC

com ponto de corte de 53 pg/ml mostrou sensibilidade e especificidade baixas. A análise em conjunto da IL-8 e da PCR aumentou a sensibilidade para 93% e 100% no primeiro e segundo períodos de estudo, com especificidade em torno de 80% e 83%, respectivamente (FRANZ *et al.*, 1999b).

Em 2001 o mesmo grupo estudou a IL-8 na sepse precoce, também em dois períodos, o primeiro com 378 RN e o segundo com 331 RN. Foi determinado o ponto de corte ótimo pela curva ROC em 70 pg/ml, com sensibilidade e especificidade respectivamente de 80% e 76% no primeiro período e 82% e 79% no segundo. Para melhorar a sensibilidade e especificidade da IL-8, a PCR também foi incluída no estudo. A associação da IL-8 e PCR, aumentou a sensibilidade para 92% na primeira e segunda etapas e reduziu a especificidade para 74% e 77%, respectivamente (FRANZ *et al.*, 2001).

MEHR *et al.* (2001) estudaram a IL-8 sérica em 10 recém-nascidos com infecção entre o primeiro e o 28º dias de vida e encontraram o ponto de corte de 18 pg/ml, com sensibilidade de 100%, porém especificidade de 65%. Esses resultados podem ter sido prejudicados pelo menor número de pacientes da pesquisa.

Por estes estudos observamos que nas pesquisas com menor número de pacientes, a sensibilidade e especificidade são baixas. Ao aumentar a amostra, os resultados melhoram, mas o aumento da sensibilidade pode levar a redução de especificidade.

Resultado interessante encontramos na avaliação da IL-8 urinária. Conforme obtido na curva ROC, o ponto de corte da IL-8 urinária foi de 776 pg/ml que mostrou a mesma sensibilidade da IL-8 sérica, ou seja, 84%, porém mais específica, 77%. Estes dados reforçam nossa análise inicial que já mostrava valores de IL-8 urinária significativamente maiores no grupo de recém-nascidos prematuros sépticos. Na literatura não temos relatos de determinação da IL-8 urinária em quadros sépticos, apenas o estudo de STIEMER *et al.* (1997) em gestantes com rotura prematura de membranas, que utilizou como ponto de corte o percentil 75 do grupo de 22 gestantes sem infecção, e não a curva ROC, obtendo o valor de 120ng/L com sensibilidade de 53%, especificidade de 91%.

RAO *et al.* (2001) realizaram 305 dosagens de IL-8 em amostras de urina de pacientes de 0 a 18 anos com infecção urinária comprovada e sem

infecção urinária. Neste estudo não houve ajuste pela creatinina urinária. O ponto de corte determinado pela curva ROC foi de 200 pg/ml com sensibilidade de 93% e especificidade de 90%, mostrando ser a IL-8 urinária sensível porém pouco específica.

O resultado mais surpreendente de nossa pesquisa foi a IL-8 ur/cr que alcançou sensibilidade e especificidade de 100%, no ponto de corte de 89. As análises iniciais já mostravam que a IL-8 ur/cr era significativamente elevada no grupo de recém-nascidos prematuros sépticos, mas na construção da curva ROC, todos os pontos seguiram os eixos de abscissas e ordenadas. Este alto grau de sensibilidade e especificidade fazem da IL-8 ur/cr um exame muito promissor no diagnóstico precoce da sepse tardia em prematuros.

Não existe na literatura estudos sobre a dosagem da IL-8 ur/cr em quadros sépticos. A única comparação que podemos fazer é com o trabalho de STIEMER *et al.* (1997) em gestantes com rotura prematura de membranas, embora este autor não tenha utilizado a curva ROC para determinar o ponto de corte o que dificulta a comparação dos estudos. Na pesquisa de STIEMER o ponto de corte da IL-8 ur/cr foi de 120, o mesmo utilizado na IL-8 urinária, com sensibilidade e especificidade de 77%. Estes valores diferem muito dos encontrados em nosso estudo o que pode ser decorrente das diferenças na casuística e métodos dos dois estudos. Outro aspecto a ser ressaltado, foi a utilização pelos autores do mesmo valor de corte da IL-8 urinária para a IL-8 ur/cr ou seja 120, não considerando a correção das concentrações urinárias, o que é no mínimo questionável.

Outra forma de avaliação da acurácia do teste é a análise da área sob a curva ROC, que mostra com muita clareza, os nossos resultados. Sabe-se que quanto maior a área sob a curva, maior a acurácia do teste e menor a probabilidade do erro padrão. Neste estudo a IL-8 ur/cr apresentou a maior área (1,0) sem erro padrão, já que na curva ela acompanhou exatamente as abscissas e ordenadas, refletindo sensibilidade de 100%, sem falsos positivos, ou seja um excelente teste diagnóstico na amostra estudada. A IL-8 urinária com a mesma sensibilidade da IL-8 sérica porém com melhor especificidade, apresentou área de 0,81, e finalmente IL-8 sérica com a menor área (0,67) não se mostrou

isoladamente, sensível nem específica como marcador de sepse tardia em prematuros.

A diferença entre as áreas também permitiu a comparação dos três testes, confirmando que na amostra estudada a IL-8 ur/cr foi o melhor marcador diagnóstico da sepse tardia em prematuros, quando comparada com a IL-8 sérica e urinária. Não houve diferença significativa entre a IL-8 sérica e urinária, e este é um dado interessante pois na análise inicial observamos que os níveis da IL-8 urinária em prematuros sépticos foram significativamente maiores, mas quando calculamos sua sensibilidade e especificidade, ambas foram baixas, da mesma forma que a IL-8 sérica.

O estudo da IL-8 como marcador de infecção completou-se com o cálculo da acurácia de cada uma das suas dosagens.

A IL-8 sérica apresentou sensibilidade de 84% com intervalo de confiança (IC) a 95% entre 60 e 97%, especificidade de 47% com IC a 95% entre 23 e 72%, valor preditivo positivo (VPP) de 29% e valor preditivo negativo (VPN) de 92%. Estes resultados confirmam que a IL-8 sérica não foi bom marcador de sepse neonatal tardia em prematuros, apresentando baixa sensibilidade e especificidade. A probabilidade de ocorrência de sepse no caso de IL-8 sérica > 304 pg/ml também foi baixa, de apenas 29%, mas este valor preditivo positivo foi superior à incidência esperada pelo acaso, considerada de 20%, que é a incidência de sepse neonatal tardia em prematuros na Unidade (BENTLIN, 1997). O resultado do VPP foi baixo, mas isto não invalida o estudo, só reafirma que a IL-8 sérica isoladamente neste estudo não foi bom teste diagnóstico para sepse, dado este comprovado também pelo teste de acurácia, com valor de 67%.

Como já referido anteriormente os valores da IL-8 sérica encontrados na literatura são bastante variáveis, assim como são discrepantes os resultados de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN que auxiliam na avaliação da acurácia do teste. Dentre os fatores que podem contribuir para esta variação encontram-se as diferenças na casuística e métodos dos diversos estudos, o que fica bem evidenciado no quadro abaixo onde de forma resumida confrontamos nossos dados com a literatura:

Autor	NºRN Infectado/ controle	Idade Pós-natal	Ponto corte pg/L	S %	E %	VPP %	VPN %
BENTLIN, 2002	19/17	> 48h	304	84	47	29	92
SHIMOYA <i>et al.</i> , 1992	38/34	Cordão	200	97	89	-	-
LEHRNBECHER <i>et al.</i> , 1996	13/33	Cordão	150	69	91	75	88
BERNER <i>et al.</i> , 1998	16/35	Cordão	300	91	93	91	97
FRANZ <i>et al.</i> , 1999 a	9/116	< 11d	70	83	76	58	92
FRANZ <i>et al.</i> , 1999 b	58/202	Indef.	53	84	85	61	95
	66/149			91	83	70	95
FRANZ <i>et al.</i> , 2001	71/308	< 72h	70	80	76	43	94
	112/266			82	79	67	90
MEHR <i>et al.</i> , 2001	11/26	Não referida	18	100	65	55	100

Observa-se que nos vários trabalhos existentes, a sensibilidade variou de 69 a 100%, especificidade de 65 a 93%, VPP de 43 a 91% e VPN de 88 a 100%, mostrando que os resultados não são uniformes na literatura. Nossos resultados somam-se a estes, reforçando o que autores como FRANZ tem sugerido: que a IL-8 isoladamente é pouco sensível e específica, devendo ser utilizada em associação com outros marcadores de infecção como a PCR, para melhorar a sua acurácia (FRANZ *et al.*, 1999a; FRANZ *et al.*, 1999b, FRANZ *et al.*, 2001).

Quanto a IL-8 urinária não temos como compará-la na literatura e acreditamos ser este o primeiro estudo da sua dosagem em urina, na sepse neonatal. Entretanto a sensibilidade de 84% com IC de 60 a 97%, a especificidade de 77% com IC de 50 a 93%, o VPP de 48% e o VPN de 95% mostram baixo poder discriminatório deste teste no diagnóstico da sepse neonatal, com acurácia calculada de 81% apenas.

O estudo da acurácia da IL-8 ur/cr mostrou ser ela o melhor teste diagnóstico da sepse neonatal tardia em prematuros. Como a sensibilidade e a especificidade foram de 100%, não houveram falsos positivos e falsos

negativos com conseqüente VPP e VPN também de 100% e acurácia calculada de 100%. Não há dados na literatura para compararmos nossos resultados. Ressalta-se apenas que no trabalho de STIEMER em gestantes com rotura prematura de membranas amnióticas, a sensibilidade da IL-8 ur/cr foi de 77% com IC a 95% entre 50 e 93%, especificidade de 77% com IC entre 55 e 92%, VPP de 71% e VPN de 82%. Entretanto estas gestantes não apresentaram, necessariamente, quadros sistêmicos de infecção (STIEMER *et al.*, 1997).

Finalmente a comparação da IL-8 sérica e urinária com outros exames laboratoriais utilizados de rotina no diagnóstico de sepse neonatal tardia, como a contagem de leucócitos, o escore de Rodwell e a PCR, mostrou que a IL-8 ur/cr foi o mais sensível e específico, sem falsos positivos ou negativos. Todos os demais exames mostraram-se pouco sensíveis e inespecíficos no diagnóstico da sepse.

Os dados deste estudo despertam interesse em novas pesquisas sobre associação de testes diagnósticos, como por exemplo a IL-8 sérica com a PCR na sepse tardia, visando o diagnóstico precoce e restringindo o uso inadvertido de antibióticos, trabalho este, até o momento não apresentado na literatura.

Consideramos que o grande mérito desta pesquisa foi documentar a presença da IL-8 na urina de prematuros com sepse neonatal tardia, o que é inédito na literatura. Nossos resultados reforçam a idéia da participação dos receptores para IL-8 na cinética desta citocina, atuando provavelmente na IL-8 circulante e no rim, de forma que após a saturação dos mesmos a IL-8 sérica pode ser depurada e filtrada pelos rins, sendo então detectada na urina. Também alertam para a presença de receptores da IL-8 em vários órgãos não hematopoiéticos que poderiam estar envolvidos na gênese da IL-8 na urina (STIEMER *et al.*, 1997; CALHOUN *et al.*, 2000; DAME & JUUL, 2000; RAO *et al.*, 2001).

3. Considerações Finais

Nosso objetivo a partir dessa pesquisa é ampliar o número de pacientes estudados para validar os resultados encontrados. Os altos valores de sensibilidade e especificidade da IL-8 ur/cr podem ter sido influenciados pela pequena amostra de pacientes, mas na revisão de literatura evidenciamos que na maioria dos trabalhos o tamanho amostral foi equivalente ao nosso. O número amostral é uma limitação enfrentada frequentemente em pesquisa clínica, o que não exclui o mérito da pesquisa, pelo contrário, abre novos horizontes para que futuras pesquisas possam ser desenvolvidas.

Este estudo foi considerado por nós extremamente válido e gratificante, pois a amostra estudada é o reflexo verdadeiro dos pacientes que cuidamos diariamente na UTI Neonatal e para os quais queremos sempre tomar decisões corretas quanto ao diagnóstico de sepse e uso ou não de antibióticos. Portanto os resultados obtidos podem ser aplicados à prática diária de UTI Neonatal. Estes testes podem mudar a conduta clínica, e assim os recém-nascidos prematuros serão beneficiados com diagnóstico precoce e preciso, o que proporcionará melhor prognóstico.

CONCLUSÕES

Os resultados do estudo dos níveis séricos e urinários da IL-8 em 36 recém-nascidos prematuros com suspeita de sepse neonatal tardia na UTI Neonatal do HC da FMB - UNESP, permitiram concluir que:

- > Os níveis séricos da IL-8 não diferiram no grupo de recém-nascidos prematuros sépticos e de não infectados na suspeita da sepse e 48 horas após o início do estudo.
- > A IL-8 sérica no grupo séptico não se alterou significativamente 48 horas após o início do estudo.
- > A IL-8 foi detectada na urina de recém-nascidos prematuros com suspeita de sepse neonatal tardia.
- > Os valores da IL-8 urinária e da IL-8 ur/cr foram significativamente maiores nos prematuros sépticos em relação aos não infectados na suspeita da sepse e diminuíram 48 horas após a instituição da terapêutica.
- > A IL-8 sérica correlacionou-se com o índice neutrofilico nos prematuros sépticos, enquanto a IL-8 urinária apresentou correlação com a idade pós-natal.
- > Não houve correlação entre os níveis séricos e urinários da IL-8. Os níveis urinários correlacionaram-se entre si.
- > A IL-8 sérica no ponto de corte de 304pg/ml apresentou sensibilidade de 84% e especificidade de 47% enquanto a IL-8 urinária no ponto de corte de 776 pg/ml mostrou sensibilidade de 84% e especificidade de 77%. Ambas isoladamente foram pouco sensíveis e inespecíficas no diagnóstico de sepse neonatal tardia em prematuros.
- > Os valores preditivos positivos da IL-8 sérica e urinária foram baixos, 29% e 48% respectivamente, mas os valores preditivos negativos foram superiores a 90%, assim estes teste podem ser úteis na exclusão do quadro séptico.
- > A IL-8 ur/cr foi o teste mais sensível e específico no diagnóstico de sepse neonatal tardia em prematuros, atingindo 100% de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo no ponto de corte de 89, sendo útil no diagnóstico do quadro séptico.
- > A IL-8 ur/cr apresentou melhor sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do que todos os outros parâmetros avaliados,

constituindo-se em teste diagnóstico promissor, com excelente desempenho e de fácil realização.

- > A IL-8 ur/cr foi o principal marcador diagnóstico da sepse neonatal tardia na amostra estudada.

RESUMO

A sepse neonatal tardia é importante causa de morbidade e mortalidade em recém-nascidos prematuros. Os sinais e sintomas são inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico. As citocinas são potentes mediadores inflamatórios que desempenham importante papel na patogênese da infecção. Níveis séricos aumentados de citocinas são observados durante infecções. A Interleucina 8 (IL-8) tem função de atrair e ativar neutrófilos, mantendo o processo inflamatório. O objetivo deste estudo foi determinar os níveis séricos e urinários da IL-8 em recém-nascidos prematuros com sepse tardia confirmada por culturas (sangue, urina ou liquor) ou associada com meningite, e avaliar se os níveis urinários de IL-8 podem ser utilizados como teste diagnóstico da sepse neonatal tardia. Amostras de sangue e urina foram coletadas de 36 RN prematuros com suspeita clínica de sepse tardia e os exames foram repetidos após 48 horas do início do estudo. Os valores séricos e urinários da IL-8 foram determinados pelo método de ELISA e a IL-8 urinária foi ajustada pelo valor da creatinina urinária. Dois grupos foram constituídos: Grupo séptico: 19 RN com sepse confirmada por culturas ou associada a meningite, idade gestacional (IG) de $31 \pm 2,5$ semanas, peso de nascimento (PN) de 1350 ± 420 g, idade pós-natal (IPN) de $9,7 \pm 5,3$ dias e Grupo não infectado: 17 RN nos quais o diagnóstico de sepse foi excluído, IG $31 \pm 2,1$ sem, PN 1510 ± 380 g, IPN $6,9 \pm 4,1$ dias. A mediana dos níveis séricos da IL-8 não diferiu estatisticamente entre os grupos séptico e não infectado (929×624 pg/ml; $p=0,079$) mas os níveis urinários (IL-8 ur/cr) foram significativamente maiores no grupo séptico ($249 \times 41,7$; $p<0,001$). O ponto de corte ótimo da IL-8 sérica foi de 304 pg/ml com sensibilidade de 84% (IC 95%: 60 a 95%) e especificidade de 47% (IC 95%: 23 a 72%). O ponto de corte para a IL-8 ur/cr foi de 89 com sensibilidade de 100% (IC 95%: 82 a 100%) e especificidade de 100% (IC 95%: 81 a 100%). Após 48 horas do início do estudo os níveis urinários diminuíram no grupo séptico ($p<0,001$). A diminuição dos níveis de IL-8 sérica no grupo séptico não foi significativa ($p=0,123$). Os níveis séricos de IL-8 não parecem ser bons preditores de sepse neonatal tardia em prematuros. A IL-8 na urina foi altamente sensível e específica como marcador de sepse tardia e é teste de fácil realização para a avaliação da sepse neonatal tardia em prematuros.

SUMMARY

Late onset sepsis (LOS) is an important cause of morbidity and mortality in preterm infants. However, the diagnosis of LOS is difficult. Elevated serum levels of cytokines have been found during infections and this plays a critical role in the pathogenesis of infections. Interleukin 8 (IL-8) attracts and activates neutrophils which is crucial for the maintenance of the inflammatory process. The aim of this study was to determine serum and urine IL-8 levels in preterm infants with clinical LOS and positive culture (blood, urine or cerebrospinal fluid) or meningitis and to evaluate if IL-8 levels can be a useful test for the diagnosis of LOS. Blood and urine were obtained from 36 premature babies with clinical signs of LOS and the collection of the samples were repeated after two days. Serum and urine IL-8 levels were determined by ELISA and the urine IL-8 concentration was corrected with the urine creatinine level. Nineteen preterm infants with sepsis (positive cultures or meningitis) - LOS Group: gestational age (GA) 31 ± 2.5 wk, Birth Weight (BW) 1.35 ± 0.42 Kg, postnatal age(PNA) 9.7 ± 5.3 days and 17 noninfected - Control Group: GA 31 ± 2.1 wk, BW 1.51 ± 0.38 , PNA 6.9 ± 4.1 days, were studied. The medium serum IL-8 levels were not statistically different between groups (LOS vs Control, 929×624 pg/ml; $p=0,079$) but urine IL-8 levels were significantly higher in the LOS group when compared with the noninfected ($249 \times 41,7$ $p<0,001$). The optimal cut-off point was 304pg/ml for serum IL8 with 84% sensitivity (95% CI: 60-95%) and 47% specificity (95% CI: 23-72%). The cut-off point for urine IL-8 was 89 with 100% sensitivity (95% CI: 82-100%) and 100% specificity (95%CI:81-100%). Two days after of clinical signs of LOS, urine IL-8 levels decreased in LOS group ($p<0,001$). The decrease in serum IL-8 levels in the LOS group was not statistically different ($p=0,123$). Serum IL-8 levels do not appear to be a good predictor of LOS. In contrast, urine IL-8 is a highly sensitive marker of LOS and is a feasible method for the assessment of LOS in premature babies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com orientação da Divisão de Biblioteca e Documentação do Campus de Botucatu - UNESP, utilizou-se normas de Vancouver, porém em ordem alfabética e com citação no texto por autor e ano de publicação. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

AAP/AHA - American Academy of Pediatrics, American Heart Association. International guidelines for neonatal resuscitation: an excerpt from the guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care: International consensus on science. *Pediatrics* 2000; 160:1-16.

ACCP/SCCM - American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20:864-74.

Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol* 1996; 87:163-8.

Andrade MPF, Barbosa AP. Sepsis bacteriana no período neonatal: aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev Bras Ter Intensiva* 1992; 4: 14-20.

Anwer SK, Mustafa S, Parivani S, Ashraf S, Taufiq KM. Neonatal sepsis: an etiological study. *J Pak Med Assoc* 2000; 50:91-4.

Apgar VA. Proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anes Ann* 1953; 32:260-7.

Atallah AN, Castro AA. Medicina baseada em evidências: o elo entre a boa ciência e a boa prática clínica. In: Atallah AN, Castro AA, editores. *Evidências para melhores decisões clínicas*. São Paulo: Lemos Editorial; 1998: 11-8.

Atallah AN. Avaliação crítica dos testes diagnósticos e suas aplicações. *Rev Bras Pat Clin* 1989; 25: 60-3.

Baier RJ, Loggins J, Kruger TE. Increased interleukin -8 and monocyte chemoattractant protein concentrations in mechanically ventilated infants with pulmonary hemorrhage. *Pediatr Pulmonol* 2002; 34: 131-7.

Ballard JL, Khoury JC, Weidig K, Wang L, Ellers-Walsman Bl, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991; 119:417-23.

Beck-Sague MC, Azimi P, Fonseca S, Baltimore RS, Powell DA, Bland LA, *et al.* Bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: results of a multicenter study. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:1110-6.

Bentlin MR. Estudo da sepse tardia em UTI neonatal: proposta de um protocolo de vigilância. [dissertação] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1997.

Berner R, Nieneyer CM, Leititis JU, Funke A, Schwab C, Rau U, *et al.* Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatr Res* 1998; 44:469-78.

Bessler H, Sirota L, Notti I, Dulitzky F, Djaldetti M. IL-1 β and IL-3-like activity in preterm infants. *Clin Exp Immunol* 1993; 91:320-4.

Bettex-Galland M, Studer UE, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 detection in human urine during acute bladder inflammation caused by transurethral resection of superficial cancer and bacillus Calmette-Guerin administration. *Eur Urol* 1991; 19:171-5.

Boyce JM. Vancomycin-resistant enterococcus. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 367-284.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria no. 2616 de 12 de maio de 1998. Diário Oficial da União. Brasília seção I. p.133-5, (13 de maio de 1998).

Bruun B, Paerregaard A. Septicemia in a Danish neonatal intensive care unit, 1984 to 1988. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 2-8.

Buck C, Bundschu J, Gallati H, Bartmann P, Pohlandt F. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics* 1994; 93:54-8.

Bueva A, Guignard JP. Renal function in preterm neonates. *Pediatr Res* 1994; 36: 572-7.

Burchett SK, Weaver WM, Westall JÁ, Larsen A, Kronhein S, Wilson CB. Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1988; 140:3473-81.

Buttery JP. Blood cultures in newborns and children: optimizing an everyday test. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002; 87:F25-8.

Cairns PA, Wilson DC, Mc Clure BG, Halliday H, Mc Reid M. Percutaneous central venous catheter use in the very low birth weight neonate. *Eu J Pediatr* 1995; 154: 147-57.

Calhoun DA, Lunoe M, Du Y, Hutson A, Veerman MP, Christensen R. Granulocyte colony-stimulating factor serum and urine concentrations in neutropenic neonates before and after intravenous administration of recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Pediatrics* 2000; 105: 392-7.

Calil R, Marba STM, Von Nowakowski A, Tresoldi AT. 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 Controle* 2001; 29: 133-8.

Cole FS. Bacterial infections of the newborn. In: Taeusch HW, Ballard RA, Avery ME. *Diseases of the Newborn*. Philadelphia: Saunders, 1991: 350-9.

Corrales-Mayorga CB. Morbimortalidade de recém-nascidos de muito baixo peso (peso inferior a 1500g) do berçário do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina d Botucatu – UNESP no período de 1990 a 1997. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1998.

Crowley P. Prophylatic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane Library* [online]; 2001. Oxford: Update Software. [cited 2002 july 10];3:1-21. Available from: <http://www.bireme.br/cgi-bin/.../fulltext>.

Curi PR. *Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas*. 1ª ed. Botucatu: Gráfica e Editora Tipomic, 1997.

Dame JB, Juul SE. The distribution of receptors for the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-6 and IL-8 in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 2000; 58: 25-39.

De Bont ESJM, Martens A, Raan J, Samson G, Fetter WPF, Okken A, *et al*. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in newborn with sepsis. *Acta Pædiatr* 1994; 83:696-9.

De Bont ESJM, Martens A, Raan V, Sanson G, Fetter WPF, Okken, A. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 1993; 33:380-3.

Doellner H, Arntzen KJ, Haereid PE, Aags A. Interleukin-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis. *J Pediatr* 1998; 132:295-9.

Drumond Júnior M, Lira MMTA. Mortalidade precoce no Brasil – Coeficiente de mortalidade por sexo e faixa etária em 1980 e 1997. In: Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Brasília, 2002, disponível em: http://www.saude.gov.br/bvs/editora_mshtm Acesso em 2002 agosto 15.

Edgard JDM, Wilson DC, MC Millan AS, Crockard AD, Halliday M, Gardiner KR, *et al.* Predictive value of soluble immunological mediators in neonatal infection. *Clin Science* 1994; 87:165-71.

English BK, Burchett SK, English JD, Ammann AJ, Wara DW, Wi CB. Production of lymphotoxin and tumor necrosis factor by human neonatal mononuclear cells. *Pediatr Res* 1988; 24:717-22.

Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia clínica* 1ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1989.

Franz AR, Kron M, Pohlandt F, Steinbach G. Comparison of procalcitonin with interleukin 8, c-reactive protein and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants. *Pediatr Infect Dis J* 1999a; 18:666-71.

Franz AR, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F. Interleukin-8: a valuable tool to restrict antibiotic therapy in newborn infants. *Acta Pædiatr* 2001; 90:1025-32.

Franz AR, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F. Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and c-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics* 1999b; 104: 447-53 .

Freij BJ, Mc Cracken GH. Acute infections. In: Avery GB, Fletcher MA, Mac Donald MG. *Neonatology: pathophysiology and management of the newborn.* Philadelphia: Lippincott, 1994:1082-116.

Garofalo RP, Goldman AS. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. *Clin Perinatol* 1999; 26:361-78.

Gaunt G, Ramin K. Immunological tolerance of the human fetus. *Am J Perinatol* 2001; 18:299-312.

Gaynes RP, Edwards JR, Jarvis WR, Culver DH, Tolson JS, Martone WJ. Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States. *Pediatrics* 1996; 98:357-61.

Gerdes JS, Polin RA. Sepsis screen in neonates with evaluation of plasma fibronectin. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6:443-7.

Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Isr J Med Sci* 1994; 30:430-41.

Girardin EP, Berner ME, Grau GE, Suter S, Lacourt G, Paunier L. Serum tumor necrosis factor in newborns at risk for infections. *Eur J Pediatr* 1990; 149: 645-7.

Goldman DA, Durbin WA, Freeman J. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit. *J Infect Dis* 1981; 144: 449-59.

Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 194-202.

Gonzalez A, Sosenko IR, Chandar J, Hummler H, Claire N, Bancalari E. Influence of infection on patent ductus arteriosus and chronic disease in premature infants weighing 1000grams or less. *J Pediatr* 1996; 128:470-8.

Gray J, Brockwell M, Das I. Experience of changing between signal and Bactec 9240 blood culture systems in a children's hospital. *J Clin Pathol* 1998; 51:302-5.

Groneck P, Gotze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk premature neonates. *Pediatrics* 1994; 93:712-8.

Grumach AS, Silva KR. Mecanismos de defesa contra agentes infecciosos. In: Grumach AS. *Alergia e Imunologia na infância e na adolescência*. São Paulo: Editora Atheneu, 2001: 315-26.

Hagberg H, Gilland E, Bona E, Hanson LA, Hahin-Zoric M, Blennow M et al. Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996; 40: 603-9.

Hageman JR, Caplan MS. An introduction to the structure and function of inflammatory mediators for clinicians. *Clin Perinatol* 1995; 22: 251-62.

Hammerman C. Patent ductus arteriosus: clinical relevance of prostaglandins and prostaglandin inhibitors in PDA. *Pathophysiology and treatment. Clin Perinatol* 1995; 22: 457-80.

Hodge D, Puntis JW. Diagnosis, prevention, and management of catheter related bloodstream infection during long term parenteral nutrition. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 2002; 87: F21-4.

Holaday JW. Cardiovascular effects of endogenous opiate systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23:541-5.

Jantusch BA, O'Donnell R, Wiedermann BL. Urinary interleukin-6 and interleukin-8 in children with urinary tract infection. *Pediatr Nephrol* 2000; 15: 236-40.

Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KYC, Stotts C, Wong B, Hamdan H, *et al.* Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res* 1996; 39: 966-75.

Joshi P, Barr P. The use of lumbar puncture and laboratory tests for sepsis by Australian neonatologist. *J Paediatr Child Health* 1998; 34:74-8.

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* 1999; 88:880-4.

Kaushik SL, Parmar VR, Grover N, Grover PS, Kaushik R. Neonatal sepsis in hospital born babies. *J Commun Dis* 1998; 30:147-52.

Kawamura M, Nishida H. The usefulness of serial C-reactive protein measurement in managing neonatal infection. *Acta Paediatr* 1995; 84: 10-3.

Kellogg JA, Ferrentino FL, Goodstein MH, Liss J, Shapiro SL, Bankert DA. Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of age. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 381-5.

Kenon C, Overturf G, Bessman S, Sierra E, Smith KJ, Brann B. Granulocyte colony-stimulating factor as a marker for bacterial infection in neonates. *J Pediatr* 1996; 128: 765-9.

Kilpatrick L, Harris MC. Cytokines and the inflammatory response. In: Polin RA, Fox WW, editors. *Fetal and neonatal physiology*. Philadelphia: Saunders, 1998: 1967-79.

Klein JO, Marcy SM. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia: Saunders, 1995: 835-90.

Küster H, Weiss M, Willeittner AE, Detlefsen S, Jeremias I, Zbojan J, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet* 1998; 352:1271-7.

Kwong KY, Jones CA, Cayabyab R, Lecart C, Stotts CL, Randhawa I, *et al.* Differential regulation of IL-8 by IL-1[beta] and TNF[alpha] in hyaline membrane disease. *J Clin Immunol* 1998; 18:71-80.

Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, Babior BM, Curnutte JT. Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med* 1988; 109:127-42.

Lehrnbecher T, Schrod L, Kraus D, Roos T, Martius J, Von Stockhausen HB. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in cord blood in the diagnosis of early onset sepsis in neonates. *Acta Paediatr* 1995; 84: 806-8.

Lehrnbecher T, Schrod L, Rutsch P, Ross T, Martius J, Stockhausen H-B. Immunologic parameters in cord blood indicating early-onset sepsis. *Biol Neonate* 1996; 70:206-12.

Liu T, Clark RK, Mc Donnell PC, Young PR, White RF, Barone FC *et al.* Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25: 1481-8.

Lorenz JM. Survival of the extremely preterm infant in North America in the 1990s. *Clin Perinatol* 2000; 27:255-62.

Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A, Reichman B. Epidemiological, clinical, and microbiological characteristics of late-onset sepsis among very low birth weight infants in Israel: a national survey. *Pediatrics* 2002; 109:34-9.

Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979; 95:89-98.

Manucha V, Rusia U, Sikka M, Faridi M, Madan N. Utility of haematological parameters and C-reactive protein in the detection of neonatal sepsis. *J Paediatr Child Health* 2002; 38: 459-64.

Martin-Ancel A, Garcia-Alix A, Pascual-Salcedo D, Cabañas F, Valcarce M, Quero J. Interleukin-6 in the cerebrospinal fluid after perinatal asphyxia is related to early and late neurological manifestations. *Pediatrics* 1997; 100: 789-94.

Mc Cabe KM, Khan G, Zhang YH, Mason EO, Mc Cabe ER. Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences: automated analysis and potential for molecular triage of sepsis. *Pediatrics* 1995; 95:165-9.

Meadow W, Rudinsky B. Inflammatory mediators and neonatal sepsis: rarely has so little been known by so many about so much. *Clin Perinatol* 1995; 22:519-36.

Mehr S, Doyle LW. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 879-87.

Mehr SS, Doyle LW, Rice GE, Vervaart P, Henschke P. Interleukin-6 and interleukin-8 in newborn bacterial infection. *Am J Perinatol* 2001; 18:313-23.

Messer J, Eyer D, Donato L, Gallati, Matis J, Simoni U. Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr* 1996; 129:574-80.

Miller LC, Isa S, Lopreste G, Schaller JG, Dinarello CA. Neonatal interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor: cord blood levels and cellular production. *J Pediatr* 1990; 117:961-5.

Miller MJ. Fungal infections. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia: Saunders, 1995: 703-44.

Moro ML, De Toni A, Stolfi I, Carrieri MP, Braga M, Zunin C. Risk factors for nosocomial sepsis in newborn intensive and intermediate care units. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 315-22.

Mouzinho A, Rosenfeld CR, Sanchez P, Risser R. Revised reference ranges for circulating neutrophils in very-low-birth-weight neonates. *Pediatrics* 1994; 94:76-82.

Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* 1989; 143: 1366-71.

Murray BE. Can antibiotic resistance be controlled? *N Engl J Med* 1994; 330: 1229-30.

Mussi-Pinhata MM & Nascimento SD. Infecções neonatais hospitalares. *J Pediatr* 2001; 77:S81-96.

Nascimento SD. Análise epidemiológica das infecções hospitalares bacterianas em unidade de terapia intensiva neonatal. [dissertação] São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 1997.

NNISS - National Nosocomial Infection Surveillance System - Semiannual report - US Department of Health & Human Services - Public Health Services. Centers of Disease Control and Prevention, 1994.

Neu J, Bernstein H. Update on host defense and immunonutrients. *Clin Perinatol* 2002; 29:41-64.

Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, 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* 1997; 77:F221-7.

Ng PC. Systemic fungal infections in neonates. *Arch Dis Child* 1994; 71:30-5.

Ogata ES. Carbohydrate homeostasis. In: Avery GB, Fletcher MA, Mac Donald MG. *Neonatology: pathophysiology and management of the newborn.* Philadelphia: Lippincott, 1994: 568-84.

Ogra PL, Rassin DK. Human breast milk. In: Remington JS & Klein JO. Infectious diseases of fetus and newborn infant. Philadelphia: Saunders, 1995: 108-39.

Önal EE, Kitapçı F, Dilmen U, Adam B. Interleukin-6 concentrations in neonatal sepsis. *Lancet* 1999; 353:239-40.

Ozdemir A, Oyugur N, Gultekin M, Coskun M, Yegin O. Neonatal tumor necrosis factor, interleukin-1 α , interleukin-1 β , and interleukin-6 response to infection. *Am J Perinatol* 1994; 11:282-5.

Panero A, Pacifico L, Rossi N, Mancuso G, Stegagno M, Chiesa C. Interleukin 6 in neonates with early and late onset infection. *Ped Infect Dis J* 1997; 16:370-5.

Peakman M, Senaldi G, Liossis G, Gamsu HR, Vergani. Complement activation in neonatal infection. *Arch Dis Child* 1992; 67: 802-7.

Pealman JM, Rollins N, Sanchez PJ. Late-onset meningitis in sick, very-low-birth-weight infants. *Am J Dis Child* 1992; 146: 1297-1301.

Peters AM, Bertram P, Gahr M, Speer CP. Reduced secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α by neonatal monocytes. *Biol Neonate* 1993; 63:157-62.

Philip AGS, Hewitt JR. Early diagnosis of neonatal sepsis. *Pediatrics* 1980; 65: 1036-40.

Philip AGS. Postnatal infection: Epidemiology, diagnosis and management. *Biol Neonate* 1996; 69:175-7.

Pierce JR, Merenstein GB, Stocker JT. Immediate postmortem cultures in an intensive care nursery. *Pediatr Infect Dis J* 1984; 3:510-3.

Polzin WJ, Brady K. The etiology of premature rupture of the membranes. *Clin Obstetr Gynecol* 1998; 41:810-6.

Powell KR, Marcy SM. Laboratory aids for diagnosis of neonatal sepsis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Philadelphia: Saunders, 1995: 1223-40.

Rao WH, Evans GS, Finn A. The significance of interleukin 8 in urine. *Arch Dis Child* 2001; 85: 256-62.

Rodriguez AF, Kaplan SL, Mason EO. Cerebrospinal fluid values in the very-low-birth-weight infant. *J Pediatr* 1990; 116:971-4.

Rodwell RI, Leslie AI, Tudehope D. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. *J Pediatr* 1988; 112:761-7.

Roilides E, Papachristou F, Gioulekas E, Tsaparidou S, Karatzas N, Sotiriou J, *et al.* Increased urine interleukin-6 concentrations correlate with pyelonephritic changes on ^{99m}Tc-dimercaptosuccinic acid scans in neonates with urinary tract infections. *J Inf Dis* 1999; 180:904-7.

Roman J, Fernandez F, Velasco F, Rojas R, Roldan MR, Torres A. Serum TNF levels in neonatal sepsis and septic shock. *Acta Pædiatr* 1993; 82:352-4.

Saez-Llorenz X, Mc Cracken GH. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: Current concepts of terminology, pathophysiology and management. *J Pediatr* 1993; 123:497-508.

Saito S, Saito M, Kato Y, Maruyama M, Moriyama I, Ichijo M. Production of IL-6 (BSF-2/IFN β 2) by mononuclear cells in premature and term infants. *J Reprod Immunol* 1990; 17:17-26.

Sarandakou A, Giannaki G, Malamitsi-Puchner A, Rizos D, Hourdaki E, Protonotariou E, *et al.* Inflammatory cytokines in newborn infants. *Mediators Inflamm* 1998; 7: 309-12.

Schollin J. Interleukin-8 in neonatal sepsis. *Acta Pædiatr* 2001; 90:961-4.

Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Moller JC, Bucsky P. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res* 2002; 51: 317-22.

Shalak LF, Laptook AR, Jafri HS, Ramilo O, Perlman JM. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. *Pediatrics* 2002; 110: 673-80.

Shi Y, Li H, Shen C, Wang J, Qin S, Liu R, *et al.* Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis. *J Pediatr* 1993; 123:435-8.

Shimoya K, Matsuzaki N, Taniguchi T, Jo T, Saji F, Kitajima H *et al.* Interleukin-8 in cord sera: a sensitive and specific marker for the detection of preterm chorioamnionitis. *J Infect Dis* 1992; 165:957-60.

Siegel JD, Mc Cracken GH. Sepsis Neonatorum. *N Engl J Med* 1981; 12:642-7.

Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Pædiatr* 1999; 88:647-50.

Smulian JC, Shen-Schwarz S, Vintzileos AM, Lake MF, Ananth CV. Clinical Chorioamnionitis and histologic placental inflammation. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 1000-5.

Sohn AH, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL, Grohskopf LA, Levine GL, Stover BH, *et al.* Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients. Results from the first national point-prevalence survey. *J Pediatr* 2001; 139:821-7.

Soong WJ, Jeng MJ, Hwang B. The evaluation of percutaneous central venous catheters – a convenient technique in pediatric patients. *Intensive Care Med* 1995; 21: 759-65.

Sorlin P, Mansoor I, Dagyarani C, Struelens MJ. Comparison of resin-containing BACTEC™ plus aerobic/F* medium with conventional methods for culture of normally sterile body fluids. *J Med Microbiol* 2000; 49: 787-91.

Speer CP, Johnston Jr RB. Neutrophil function in newborn infants. In: Polin RA, Fox WW. *Fetal and neonatal physiology*. Philadelphia: Saunders, 1998: 1954-60.

St Geme JW, Murray DL, Carter J, Hobel CJ, Leake RD, Anthony BF *et al.* Perinatal bacterial infection after prolonged rupture of amniotic membranes: an analysis of risk and management. *J Pediatr* 1984; 104: 608-13.

Stiemer B, Buschmann A, Bisson S, Hensel K, Gramm HJ, Hopp H, *et al.* Interleukin-8 in urine: a new diagnostic parameter for intra-amniotic infection after premature rupture of the membranes. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104:499-502.

Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatrics* 1996a; 129:63-71.

Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, *et al.* Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatrics* 1996b; 129:72-80.

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD neonatal research network. *Pediatrics* 2002; 110:285-91.

Stoll BJ. The global impact of neonatal infection. In: Stoll BJ, Weisman LE, editors. *Clin Perinatol* 1997; 24:1-22.

Takasaki J, Ogawa Y. Interleukin-8 and granulocyte elastase in the tracheobronchial aspirate of infants without respiratory distress syndrome or intrauterine infection and development of chronic lung disease. *Acta Pædiatr Jpn* 1997; 39:437-41.

Terashima T, English D, Hogg JC, Van-Eeden SF. Release of polymorphonuclear leukocytes from the bone marrow by interleukin-8. *Blood* 1998; 92:1062-9.

Trautman MS, Dudley DJ, Edwin SS, Collmer D, Mitchell MD. Amnion cell biosynthesis of interleukin-8: regulation by inflammatory cytokines. *J Cell Physiol* 1992; 153:38-43.

Trindade CEP. Recém-nascidos de baixo peso: conceitos e morbimortalidade perinatal. In: *Conduitas em Pediatria*, 2^a ed, Rio de Janeiro: EPUB, 1999: 67-93.

Tullus K, Fituri O, Linné T, Escobar-Billing R, Wikstad I, Karlsson A, *et al.* Urine interleukin-6 and interleukin-8 in children with acute pyelonephritis in relation to DMSA scintigraphy in the acute phase and at 1-year follow-up. *Pediatr Radiol* 1994; 24:513-5.

UNESP – Universidade Estadual Paulista, 2002. Movimento estatístico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina Campus Botucatu. [acesso 2002 Agosto 10]. Disponível em: <http://www2/estat/arquivo/rptCoeficienteUTI2001>.

Vasconcelos DM. A resposta imune. In: Grumach AS. Alergia e Imunologia na infância e na adolescência. São Paulo: Editora Atheneu, 2001: 291-314.

Vilela MMS. Desenvolvimento do sistema imune na criança. In: Grumach AS. Alergia e Imunologia na infância e na adolescência. São Paulo: Editora Atheneu, 2001: 327-42.

Visser VE, Hall RT. Urine culture in the evaluation of suspected neonatal sepsis. J Pediatr 1979; 94: 635-8.

Weatherstone KB, Rich EA. Tumor necrosis factor/cachetin and interleukin-1 secretion by cord blood monocytes from premature and term neonates. Pediatr Res 1989; 25:342- 6.

Weinberg A. The role of immune reconstitution in cytomegalovirus infection. Biodrugs 2002; 16: 89-95.

WHO - World Health Organization . Maternal and Child Health [cited 2002 July 20]. Available from: <http://www.who.int/das/cat98/mat8.htm#>.

Williams PA, Bohnsack JF, Augustine NH, Drummond WK, Rubens CE, Hill HR. Production of tumor necrosis factor by human cells *in vitro* and *in vivo*, induced by group B streptococci. J Pediatr 1993; 123:292-300.

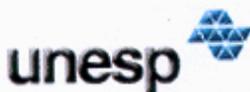
Wilmott RW, Harris MC, Haines KM, Douglas SD. Interleukin-1 activity from human cord blood monocytes. Diagn Clin Immunol 1987; 5:201- 4.

Winkelstein JA. The complement system of the fetus and newborn. In: Polin RA, Fox WW. Fetal and neonatal physiology. Philadelphia: Saunders, 1998: 1961-6

Wiswell TE, Baumgart S, Gannon CM, Apitzer AP. No lumbar puncture in the evaluation for early neonatal sepsis: will meningitis be missed? Pediatrics 1995; 95: 803-6.

Zamora-Castorena MT. Five year experience with neonatal sepsis in a pediatric center. Rev Invest Clin 1998; 50:463-70.

ANEXOS



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

e-mail Presidência: mjbvianna@uol.com.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de outubro de 2.002

OF.330/2002-CEP
MJBV/asc

Ilustríssima Senhora
Dr^a Maria Regina Bentlin
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina

Prezada Maria Regina,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa "**Comportamento da Interleucina 8 sérica e urinária em Recem Nascidos com infecção admitidos na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal**" de autoria de Vossa Senhoria, com orientação da Prof^a Dr^a Ligia Maria Suppo de Souza Rugollo, recebeu do relator parecer **favorável**, aprovado em reunião de 06/08/2001.

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

FACULDADE DE MEDICINA

Departamento de Pediatria

BOTUCATU, SP - Rubião Júnior - Cep 18.618-970 - ☎821-2121-R 2274 - TELEX 0142107 - FAX (014) 822-0421

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

COMPORTAMENTO DA INTERLEUCINA-8 SÉRICA E URINÁRIA EM RECÉM-NASCIDOS COM INFECÇÃO

Nome do paciente: _____ Idade _____ dias Sexo _____

O responsável pelo recém-nascido de _____, acima identificado, ou nos casos necessários, sob a responsabilidade do médico que assina este documento, declara estar ciente que o recém-nascido vai participar de um estudo e ter lido ou ouvido o presente termo de consentimento, que lhe informa:

- 1) Que este estudo investiga a presença de uma substância chamada Interleucina-8 em sangue e urina de recém-nascidos com suspeita de infecção e a relação desta substância com infecção. Se a Interleucina-8 estiver presente no sangue e/ou na urina do paciente com infecção, ela poderá ser utilizada como diagnóstico rápido de infecção, permitindo que o tratamento seja prontamente iniciado.
- 2) Que durante o período de estudo o paciente será submetido a coleta de exames de sangue e urina, para determinar a presença da Interleucina-8 e confirmar ou não a infecção no recém-nascido.
- 3) Que a autorização da participação do paciente é voluntária, podendo livremente retirar o RN do estudo, o que não ocasionará qualquer penalidade ou perda dos benefícios que está recebendo.

Nome da mãe ou responsável

Assinatura

MARIA REGINA BENTLIN

Nome do médico responsável

CRM 70107

Assinatura

Telefone (0 xx 14) 6802-6274 / 6802-6028

Anexo 3

PROCOLO DE INFEÇÃO HOSPITALAR EM UTI NEONATAL Nº 000

Nome _____ Reg. _____ Sexo M F Gemelar N S
 DN: ___/___/___ DI: ___/___/___ Proc: HC D H Parto N C PN: ___gIG___sem AIG PIG GIG Método _____
 APGAR: ___/___ Reanimação sim não O₂ Inalatório VPP bm MC IOT Drogas
 Antecedentes Obstétricos: Idade ___ G ___ P ___ A ___ Patologias _____ CAE: Não Sim ___ doses
 Data Susp. Infec: ___/___/___ DV ___

Fatores de Risco: Nº Total: _____ Manifest. associadas: _____ nº sist. acometidos

<input type="checkbox"/> Cateterismo Vasos Umbilicais	<input type="checkbox"/> Traqueostomia	<input type="checkbox"/> Gerais	<input type="checkbox"/> Cardiovasculares
<input type="checkbox"/> Dissecções Venosas	<input type="checkbox"/> Diálise Peritoneal	<input type="checkbox"/> Dermatológicas	<input type="checkbox"/> Hematológicas
<input type="checkbox"/> Intubação Orotraqueal	<input type="checkbox"/> ATB Prévia	<input type="checkbox"/> Digestivas	PA _____ mmHg
<input type="checkbox"/> NPP	<input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Gêrito urinárias	Outras
<input type="checkbox"/> Drenagem Tórax		<input type="checkbox"/> Respiratórias	
<input type="checkbox"/> Cirurgias		<input type="checkbox"/> SNC	

Avaliação Laboratorial:

	Ht / Hb	L c	I/M	ii	Plaq.	Rodwell	PCR	Glicemia	IL8s	IL8u	IL-8 ur/cr
M ₁											
M ₂											

Urina I	Ph	DU	Proteína	Hb	Leucócitos	Bactérias	Cristais	creatinina
M ₁								
M ₂								

Líquor	L c	Hc	Proteína	Glicemia	Neutrófilos	Linfo/Mon o
M ₁						
M ₂						

Culturas	Data	Agente	Data	Agente	Data	Agente
Sangue						
Urina						
LCR						
Outras						

Evolução:

Infecção confirmada Não Sim Foco _____
 Sepsis
 Choque Séptico
 DMOS Hemodinâm. Resp. Neurol. Hematol. Renal Hepat Gastrointt
 Óbito relacionado a infecção Não Sim Data ___/___/___ DV ___ Necro
 Alt Data ___/___/___ Tempo de Internação na UTI _____

Terapêutica:

Assist. Ventil. CPAP VM
 NPP
 Aminas Vasoativas Dopa dose _____ Dobuta dose _____ Nor adrenal dose _____
 Expansor de Volume _____ Hemoderivados Glob Plaq Crio PFC
 Cirurgias Dialise Peritoneal
 Imunoterapia imunoglobulina Granuloquine

Específica		
Data		
ATB		

HD Finais _____

Anexo 4

Valores de referência do hemograma em recém-nascidos a partir do terceiro dia de vida

RN de Termo e Prematuros

Parâmetros Hematológicos	Valor de Referência
Leucócitos (n ^o /mm ³)	5000 a 15000
Neutrófilos totais (n ^o /mm ³)	1800 a 5400
Neutrófilos imaturos (n ^o /mm ³)	500
Índice neutrofilico	0,12
Plaquetas (n ^o /mm ³)	>150000

Manroe et al, 1979.

RN de Muito Baixo Peso

Idade pós natal	Neutropenia	Neutrofilia	↑ Neutrófilos imaturos	↑ Imaturos/ totais
72 horas	< 1100	> 6000	> 550	> 0,13
120 horas	< 1100	> 6000	> 500	> 0,12
4 ^o ao 28 ^o dia	< 1100	> 6000	> 500	> 0,12

Manroe et al, 1979; Mouzinho et al, 1994.

Anexo 5

Valores de referência da dosagem semi-quantitativa da proteína C reativa (PCR)

Aglutinação	mg/L
+	25
++	50
+++	75
++++	100

Método: Aglutinação do Látex (Human®)

Anexo 6

Valores de referência da glicemia sérica (mg/dl).

Idade pós-natal	Limite inferior	Limite superior
< 24 horas	40	125
> 24 horas	45	125

Adaptado de Trindade et al., 1999.

Anexo 7

Escore de Rodwell a partir do terceiro dia de vida.

Parâmetro	Alteração	Pontuação
Leucócitos (n°/mm ³)	< 5000 ou > 15000	1
Plaquetas (n°/mm ³)	< 100000 até 10° dia < 150000 após 10° dia	1
Índice neutrofilico	> 0,2	1
Relação Imaturos/Maduros	> 0,3	1
Neutrófilos imaturos (n°/mm ³)	> 500	1
Neutrófilos totais (n°/mm ³)	< 1800 ou > 5400	1
Alterações degenerativas	Vacuolizações, granulações tóxicas, Corpúsculo de Dohle	1

Rodwell et al., 1988.

Escore: $\geq 3 \rightarrow S = 96\%$ e $E = 78\%$

$< 3 \rightarrow VPN = 99\%$

Anexo 8

Valores de referência do líquor em recém-nascidos.

Prematuros

Parâmetros	Variação normalidade
Leucócitos (n°/mm ³)	0 a 29
Proteínas (mg/dl)	65 a 150
Glicose (mg/dl)	24 a 63

Klein & Marcy, 1995.

Valores de LCR em recém-nascidos de muito baixo peso

Muito Baixo Peso

	< 1.000g		1.001 - 1.500	
	Média ± dp	Min-Máx	Média ± dp	Min-Máx
PN (g)	763 ± 115	550 - 980	1278 ± 152	1020 - 1500
IG (sem)	26 ± 1,3	24 - 28	29 ± 1,4	27 - 33
Leucócitos/mm³	4 ± 3	0 - 14	6 ± 9	0 - 44
Hemáceas/mm³	1270 ± 3270	0 - 19050	786 ± 1879	0 - 9750
Polimorfonucleares (%)	6 ± 15	0 - 66	9 ± 17	0 - 60
Mononucleares (%)	86 ± 30	34 - 100	85 ± 28	13 - 100
Glicose (mg/dl)	61 ± 34	29 - 217	59 ± 21	31 - 109
Proteína (mg/dl)	150 ± 56	95 - 370	132 ± 43	45 - 227

Rodriguez et al., 1990

Cálculo dos valores preditivos.

Valor Preditivo Positivo (VPP)

$$\text{VPP} = \frac{P \times S}{P \times S + (1 - P) \times (1 - E)}$$

Valor Preditivo Negativo (VPN)

$$\text{VPN} = \frac{(1 - P) \times E}{(1 - P) \times E + P (1 - S)}$$

onde:

P = prevalência da sepse neonatal tardia = 20% (HC FMB)

S = sensibilidade do teste (teste positivo / sépticos)

E = especificidade do teste (teste negativo / não infectados)

Anexo 10a

Características gerais dos recém-nascidos prematuros do grupo séptico

N° RN	PN (g)	IG (sem)	IPN (dias)	Sexo	Tipo parto	Apgar 1° / 5°	Reanimação	N°Proced Risco	Outras doenças	Evolução		Agente etiológico		
										Sepse	Final	Sangue	Urina	LCR
1	2090	33	15	M	N	8/9	Não	4	-	Sepse	Alta	BGN	-	-
2	980	27	5	M	C	4/7	Sim	4	IP/PCA/HPIV/HE	Choque Meningite	Óbito	SCN	-	-
3	875	26	5	M	C	4/8	Sim	4	SDR/PCA	Sepse	Alta	-	<i>K. pneumoniae</i>	-
4	1890	32	20	F	N	8/9	Não	2	-	Sepse	Alta	SCN	-	-
5	1140	30	7	F	N	3/9	Sim	4	IP/SDR/PCA/HPIV/HE	Sepse Meningite	Alta	<i>S. marcescens</i>	-	-
6	1225	30	15	F	N	3/6	Sim	5	IP/PCA/DBP/HE	Choque Sepse	Alta	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-
7	1320	32	9	F	N	8/9	Não	2	-	Sepse	Alta	SCN	-	-
8	1020	33	4	M	C	7/8	Sim	2	PCA	Sepse	Alta	<i>A. lowflei</i>	-	-
9	1110	31	15	F	C	7/10	Não	0	PCA	Sepse	Alta	-	<i>E. cloacae</i>	-
10	1045	30	4	M	C	6/6	Sim	2	SDR/PCA	Sepse	Alta	SCN	-	-
11	1115	29	10	F	C	0/2	Sim	4	SDR/PCA/HPIV	Sepse Meningite	Alta	-	-	-
12	2315	34	12	M	C	8/10	Não	4	IP	Sepse	Alta	SCN	-	-
13	1285	32	5	F	C	5/6	Sim	1	-	Sepse	Alta	SCN	-	-
14	1750	34	10	F	C	6/6	Sim	7	-	Sepse	Óbito	SCN	-	-
15	1050	29	10	M	C	7/8	Não	1	-	Sepse	Alta	SCN	-	-
16	1305	28	10	M	C	8/10	Não	5	IP/PCA/ HPIV	Sepse Meningite	Alta	-	-	-
17	1215	31	5	F	N	2/7	Sim	2	SDR	Sepse Meningite	Alta	-	BGN	BGN
18	1020	30	20	M	C	6/8	Sim	1	SDR/PCA	Sepse	Alta	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	-
19	1975	34	3	M	C	7/9	Não	2	SDR/IP	Sepse	Alta	<i>S. aureus</i>	-	-

Variáveis laboratoriais e níveis da IL-8 nos recém-nascidos prematuros do grupo séptico

Nº RN	Leucócitos X 10 ³ /mm ³		Plaquetas X 10 ³ /mm ³		Glicemia mg/dl		Índice Neutrofílico		Relação I/M		Escore Rodwell		PCR mg/L		IL-8 sérica Pg/ml		IL-8 urinária Pg/ml		IL-8 ur/cr	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
1	4,7	8,9	475	360	267	80	0,27	0,09	0,37	0,1	3	0	100	100	1370	530	1744	304	249	52
2	23,1	14,3	297	146	128	95	0,24	0,15	0,32	0,1	5	2	0	0	997	26	1865	822	333	69
3	5,3	12,2	134	155	119	146	0	0	0	0	0	0	0	0	624	396	1759	723	288	86
4	4,2	9,5	219	360	86	100	0,27	0,04	0,37	0,04	4	1	100	50	518	373	2063	1081	258	45
5	20,9	14,1	125	150	169	101	0,4	0,22	0,28	0,28	5	2	0	0	610	472	1211	1211	288	75
6	4,3	3,8	115	93	78	100	0,36	0,01	0,55	0,01	5	3	100	75	982	38	1896	198	310	33
7	13,1	14,0	204	173	117	107	0,27	0,04	0,36	0,05	4	0	100	75	997	535	1013	419	180	35
8	2,9	8,9	74	50	148	107	0	0,14	0	0,17	3	1	0	0	388	304	1066	601	177	75
9	5,6	7,2	265	174	79	87	0	0	0	0	0	0	0	0	959	563	1975	1241	308	182
10	4,5	8,2	106	146	121	61	0,1	0,14	0,1	0,16	2	1	0	0	1005	1043	624	282	260	56
11	15,1	15,9	333	312	86	123	0,32	0,11	0,47	0,13	4	2	25	0	982	540	982	122	280	10
12	10,1	9,0	120	160	163	94	0,24	0,07	0,32	0,08	4	0	100	100	1035	1013	914	61	285	17
13	1,9	8,9	88	85	225	122	0	0,2	0	0,25	3	3	0	0	914	678	1157	84	210	38
14	15,6	12,4	213	182	142	108	0,3	0,01	0,37	0,01	6	1	100	100	929	556	624	221	156	33
15	21,6	11,0	90	127	86	87	0,3	0,07	0,44	0,08	5	0	100	100	556	137	594	160	156	17
16	3,4	17,4	42	98	80	86	0	0,21	0	0,3	3	5	75	75	228	1409	1386	906	154	129
17	6,23	7,2	148	118	76	82	0	0	0	0	1	0	0	0	167	1835	1066	1241	152	48
18	8,9	9,7	363	340	75	68	0,3	0	0,42	0	3	0	0	0	1241	114	1393	129	162	14
19	4,8	9,7	228	274	54	68	0	0,33	0	0,5	2	3	100	25	76	1386	853	1386	170	92

Anexo 11a

Características gerais dos recém-nascidos prematuros do grupo não infectado

Nº RN	PN (g)	IG (sem)	IPN (dias)	Sexo	Tipo parto	Apgar 1º / 5º	Reanimação	NºProced Risco	Outras doenças	Evolução
1	1595	32	4	F	C	1/6	Sim	1	SDR/	Alta
2	1340	31	10	F	N	8/9	Não	1	IP/SDR/	Alta
3	1470	30	9	M	C	8/9	Não	3	SDR/HPIV/HE	Alta
4	1130	30	9	F	C	7/8	Não	4	IP/SDR/PCA/HE	Alta
5	2060	34	4	M	N	9/10	Não	0	SDR	Alta
6	1470	32	11	M	C	3/8	Sim	0	SDR/PCA/HE	Alta
7	1235	30	10	F	C	3/7	Sim	0	-	Alta
8	1340	30	4	M	N	7/8	Não	2	SDR/PCA/HPIV/HE	Alta
9	850	28	4	F	C	3/9	Sim	3	SDR/PCA/DBP	Alta
10	1645	33	4	M	C	8/10	Não	0	-	Alta
11	1890	32	18	F	N	8/9	Não	1	IP/SDR	Alta
12	1375	32	3	F	C	3/8	Sim	0	PCA	Alta
13	2135	34	3	F	C	8/9	Não	0	IP/	Alta
14	1060	27	4	M	N	8/9	Não	1	-	Alta
15	1945	33	6	M	N	2/8	Sim	1	PCA/HPIV/HE	Alta
16	1175	29	4	F	C	7/8	Sim	2	SDR/PCA	Alta
17	2030	33	10	F	N	9/9	Não	3	SDR/PCA	Alta

Variáveis laboratoriais e níveis da IL-8 nos recém-nascidos prematuros não infectados

Nº RN	Leucócitos X 10 ³ /mm ³		Plaquetas X 10 ³ /mm ³		Glicemia mg/dl		Índice Neutrófilico		Relação I/M		Escore Rodwell		PCR mg/L		IL-8 sérica Pg/ml		IL-8 urinária Pg/ml		IL-8 ur/cr	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
1	6,5	11,7	66	133	85	85	0,2	0,18	0,26	0,22	2	0	0	0	137	1667	670	1363	64	62
2	14,1	11,3	497	546	85	85	0	0	0	0	0	0	0	0	137	1302	289	845	39	57
3	17,2	14,0	279	230	86	102	0	0,06	0	0,07	1	0	0	0	243	1218	373	167	11	22
4	17,8	16,7	379	471	78	68	0	0	0	0	1	1	0	0	304	815	175	815	14	26
5	13,0	9,2	270	330	79	84	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0	0	0	624	883	601	708	73	54
6	11,5	10,0	151	343	90	80	0	0	0	0	0	0	0	0	632	610	1409	304	89	46
7	14,3	6,7	335	294	35	80	0,12	0,03	0,13	0,07	0	0	0	0	61	1317	198	578	15	33
8	8,3	6,4	170	133	173	104	0,05	0	0,07	0	0	0	50	0	990	1066	122	1386	10	121
9	6,1	7,2	130	89	38	114	0,05	0,07	0,05	0,08	0	1	0	0	624	632	632	883	54	76
10	5,1	6,1	94	154	57	58	0,03	0,03	0,03	0,03	2	0	0	0	76	137	122	624	10	61
11	12,5	8,2	700	589	81	87	0,03	0,03	0,03	0,03	0	0	0	0	1058	624	601	883	49	129
12	8,6	5,8	304	265	74	96	0	0	0	0	0	0	0	0	929	1013	236	53	18	2
13	6,5	10,7	224	155	112	68	0	0	0	0	0	0	0	0	1058	1073	61	632	8	37
14	6,2	7,1	153	218	166	103	0,01	0,1	0,01	0,1	0	0	0	0	5	68	776	1386	41	83
15	9,4	7,7	244	472	80	71	0	0	0	0	0	0	75	0	137	228	1211	815	72	56
16	10,2	10,7	150	65	75	84	0,2	0	0,25	0	3	1	0	0	624	1089	1134	1302	70	126
17	8,4	9,2	321	320	80	81	0	0	0	0	0	0	0	0	921	1043	1896	1370	75	75

Anexo 12

Sensibilidade (S), Especificidade (E), número de pacientes com testes positivos e negativos e falsos positivos e negativos da IL-8 sérica.

IL-8 sérica (pg/ml)	S (%)	E (%)	Verdadeiro +	Verdadeiro -	Falso +	Falso -
-	100	0	19	0	17	0
5	100	6	19	1	16	0
61	100	12	19	2	15	0
76	95	18	18	3	14	1
137	95	35	18	6	11	1
167	90	35	17	6	11	2
228	84	35	16	6	11	3
243	84	41	16	7	10	3
304	84	47	16	8	9	3
388	79	47	15	8	9	4
518	74	47	14	8	9	5
556	68	47	13	8	9	6
610	63	47	12	8	9	7
624	58	65	11	11	6	8
632	58	71	11	12	5	8
914	53	71	10	12	5	9
921	53	77	10	13	4	9
929	47	82	9	14	3	10
959	42	82	8	14	3	11
982	32	82	6	14	3	13
990	32	88	6	15	2	13
997	21	88	4	15	2	15
1005	16	88	3	15	2	16
1035	11	88	2	15	2	17
1058	11	100	2	17	0	17
1241	5	100	1	17	0	18
1370	0	100	0	17	0	19

Anexo 13

Sensibilidade (S), Especificidade (E), número de pacientes com testes positivos e negativos e falsos positivos e negativos da IL-8 urinária.

IL-8	S (%)	E (%)	Verdadeiro +	Verdadeiro -	FALSO +	FALSO -
urinária						
(pg/ml)						
-	100,0	0,0	19	0	17	0
61	100,0	5,9	19	1	16	0
122	100,0	17,6	19	3	14	0
175	100,0	23,5	19	4	13	0
198	100,0	29,4	19	5	12	0
236	100,0	35,3	19	6	11	0
289	100,0	41,2	19	7	10	0
373	100,0	47,1	19	8	9	0
594	94,7	47,1	18	8	9	1
601	94,7	58,8	18	10	7	1
624	84,2	58,8	16	10	7	3
632	84,2	64,7	16	11	6	3
670	84,2	70,6	16	12	5	3
776	84,2	76,5	16	13	4	3
853	78,9	76,5	15	13	4	4
914	73,7	76,5	14	13	4	5
982	68,4	76,5	13	13	4	6
1013	63,2	76,5	12	13	4	7
1066	52,6	76,5	10	13	4	9
1134	52,6	82,4	10	14	3	9
1157	47,4	82,4	9	14	3	10
1211	42,1	88,2	8	15	2	11
1386	36,8	88,2	7	15	2	12
1393	31,6	88,2	6	15	2	13
1409	31,6	94,1	6	16	1	13
1744	26,3	94,1	5	16	1	14
1759	21,1	94,1	4	16	1	15
1865	15,8	94,1	3	16	1	16
1896	10,5	100,0	2	17	0	17
1975	5,3	100,0	1	17	0	18
2063	0,0	100,0	0	17	0	19

Anexo 14

Sensibilidade (S), Especificidade (E), número de pacientes com testes positivos e negativos e falsos positivos e negativos da relação IL-8 ur/ cr

IL-8 ur/cr	S (%)	E (%)	Verdadeiro +	Verdadeiro -	FALSO +	FALSO-
-	100,0	0,0	19	0	17	0
8	100,0	5,9	19	1	16	0
10	100,0	17,6	19	3	14	0
11	100,0	23,5	19	4	13	0
14	100,0	29,4	19	5	12	0
15	100,0	35,3	19	6	11	0
18	100,0	41,2	19	7	10	0
39	100,0	47,1	19	8	9	0
41	100,0	52,9	19	9	8	0
49	100,0	58,8	19	10	7	0
54	100,0	64,7	19	11	6	0
64	100,0	70,6	19	12	5	0
70	100,0	76,5	19	13	4	0
72	100,0	82,4	19	14	3	0
73	100,0	88,2	19	15	2	0
75	100,0	94,1	19	16	1	0
89	100,0	100,0	19	17	0	0
152	94,7	100,0	18	17	0	1
154	89,5	100,0	17	17	0	2
156	78,9	100,0	15	17	0	4
162	73,7	100,0	14	17	0	5
170	68,4	100,0	13	17	0	6
177	63,2	100,0	12	17	0	7
180	57,9	100,0	11	17	0	8
210	52,6	100,0	10	17	0	9
249	47,4	100,0	9	17	0	10
258	42,1	100,0	8	17	0	11
260	36,8	100,0	7	17	0	12
280	31,6	100,0	6	17	0	13
285	26,3	100,0	5	17	0	14
288	15,8	100,0	3	17	0	16
308	10,5	100,0	2	17	0	17
310	5,3	100,0	1	17	0	18
333	0,0	100,0	0	17	0	19