

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA

**INTERLEUCINA-6, FATOR DE NECROSE
TUMORAL- α E INTERLEUCINA-1 β NO
DIAGNÓSTICO DE SEPSE NEONATAL PRECOCE**

RITA DE CÁSSIA SILVEIRA

Porto Alegre, Brasil

1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA

**INTERLEUCINA-6, FATOR DE NECROSE
TUMORAL- α E INTERLEUCINA-1 β NO
DIAGNÓSTICO DE SEPSE NEONATAL PRECOCE**

RITA DE CÁSSIA SILVEIRA

A apresentação desta dissertação é exigência do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Renato Soibelman Procianoy

Porto Alegre, Brasil

1997

S587i Silveira, Rita de Cássia

Interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e interleucina-1 β no diagnóstico de sepse neonatal precoce / Rita de Cássia Silveira ; orient. Renato Soibermann Procianoy. - Porto Alegre : UFRGS, 1997.

110 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria.

1. Interleucina-6. 2. Fator de necrose de tumor. 3. Interleucina-1 β . 3. Recém-nascido. I. Procianoy, Renato Soibermann. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Vítor e aos meus pais, Antônio Carlos e Joana D'arc que, com amor e apoio irrestritos, proporcionaram-me coragem para enfrentar serenamente as dificuldades.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao Dr. Renato S. Procianoy, professor orientador
exemplar, demonstrando dedicação e competência em todas
as etapas da realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram decisivamente na realização desta pesquisa. De modo especial, agradeço:

às colegas e amigas Lisiane Dalle Mulle e Cristina H. A. Prado, colaboradoras incansáveis na coleta dos dados e demais etapas do estudo;

à equipe do Laboratório de Pesquisa do HCPA, em especial ao Dr. Jarbas de Oliveira e à Mônica Bortolini, pelo auxílio na realização dos testes ELISA. O apoio e a participação ativa do Dr. Jarbas Oliveira foram fundamentais na realização deste trabalho;

à bioquímica Elaine Barreiro, pela preciosa contribuição na leitura de todas as lâminas de hemograma;

ao Dr. Elton Ferlin, pela inestimável colaboração na realização de um programa especial para leitura dos testes ELISA;

ao Núcleo de Assessoria Estatística do Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa do HCPA, principalmente Dr. Mário Wagner e Prof. José Roberto Goldin;

aos coletadores Glaci Ramos Pereira e Jaime Silva Machado, sempre presentes quando solicitados;

à Dra. Nadine Clausell pelas suas idéias e sugestões referentes à obtenção dos *Kits* das citocinas;

AGRADECIMENTOS

ao Prof. Ênio Rotta, modelo de mestre e de neonatologista, a quem muito admiro;

aos Profs. Dr. Ernani Miura e Silvana Molossi, pelas sugestões valiosas;

ao Marcelo V. Vieira, pelo incentivo e colaboração;

aos colegas contratados da UTI Pediátrica da Santa Casa, pelo estímulo e colaboração, especialmente à Cláudia P. Ricachinevsky e ao Paulo Calegari Azevedo que preencheram com competência as lacunas de minha ausência;

aos colegas contratados do Berçário do HCPA, enfermeiras e residentes, que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização desta pesquisa;

aos amigos e colegas Ilson Enk e Mário Francisco Rita, pelo permanente apoio e incentivo;

à Profª. Dra. Maria do Horto Motta, pela brilhante contribuição na revisão de linguagem e padronização técnica do texto;

à Zuleica Santos, pelo empenho na formatação e arte final.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	4
1.2. CITOCINAS	10
1.2.1. <i>INTERLEUCINA-6</i>	11
1.2.2. <i>FATOR DE NECROSE TUMORAL α</i>	14
1.2.3. <i>INTERLEUCINA-1β</i>	17
1.3. DIAGNÓSTICO DE SEPSE	19
1.3.1. <i>FATORES DE RISCO</i>	22
1.3.2. <i>DIAGNÓSTICO LABORATORIAL</i>	26
1.4. TRATAMENTO	29
2. JUSTIFICATIVA	30

3. HIPÓTESE	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. OBJETIVO GERAL	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5. PACIENTES E MÉTODOS	35
5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	35
5.2. POPULAÇÃO	35
5.2.1. <i>POPULAÇÃO EM ESTUDO</i>	35
5.2.2. <i>POPULAÇÃO DA PESQUISA</i>	36
5.3. AMOSTRA E AMOSTRAGEM	36
5.3.1. <i>CRITÉRIOS DE INCLUSÃO</i>	36
5.3.2. <i>CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO</i>	36
5.4. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	37
5.5. VARIÁVEIS EM ESTUDO	39
5.6. VARIÁVEIS CONTROLADAS	43
5.7. LOGÍSTICA	44
5.7.1. <i>TÉCNICA DE COLETA DE SANGUE</i>	46
5.7.2. <i>MÉTODO BIOQUÍMICO EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS</i>	47
5.7.2.1. <i>Interleucina-6</i>	47
5.7.2.2. <i>Fator de necrose tumoral α</i>	48
5.7.2.3. <i>Interleucina-1β</i>	50

5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	53
6. RESULTADOS	54
6.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO.....	54
6.2. MEDIADORES DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA	61
6.2.1. INTERLEUCINA-6	62
6.2.2. FATOR DE NECROSE TUMORAL α	62
6.2.3. INTERLEUCINA- 1β	63
6.2.4. CITOCINAS E A RESPOSTA FEBRIL DO RECÉM-NASCIDO	64
6.3. CURVA ROC - RECEIVER OPERATING CHARACTERISTICS	65
6.4. ANÁLISE DO VALOR DIAGNÓSTICO DE IL-6 E TNF- α	68
7. DISCUSSÃO	70
7.1. HIPÓTESE OPERACIONAL	70
7.2. METODOLOGIA DO ESTUDO	72
7.3. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO	77
7.4. MEDIADORES DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA	79
7.5. CURVA ROC - RECEIVER OPERATING CHARACTERISTICS	82
7.6. ANÁLISE DO VALOR DIAGNÓSTICO DE IL-6 E TNF- α	84
7.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
8. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RN	- recém-nascido
VHS	- velocidade de eritrossedimentação
PCR	- proteína C reativa
I/T	- relação entre neutrófilos imaturos e número total de neutrófilos
IL-6	- interleucina-6
TNF- α	- fator de necrose tumoral
IL-1 β	- interleucina-1 β
FAP	- fator ativador plaquetário
IL-8	- interleucina - 8
IL-4	- interleucina-4
IL-10	- interleucina -10
IL-2	- interleucina -2
rIL-1	- receptor da interleucina-1
IL-5	- interleucina-5
DNA	- ácido desoxinuclêico
PGE ₂	- prostaglandina E ₂
tax	- temperatura axilar

STORCH - sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes

SIDA - síndrome da imunodeficiência adquirida

ES - *effect size*

ROC - *receiver operating characteristics*

VPP - valor preditivo positivo

VPN - valor preditivo negativo

$sTNF_r$ p 55 - receptor solúvel do fator de necrose tumoral fração 55

$sTNF_r$ p 75 - receptor solúvel do fator de necrose tumoral fração 75

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Nota: Algumas siglas foram mantidas na forma original, em inglês, por serem assim conhecidas internacionalmente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bolsa rota e índices considerados para tratamento	24
Figura 2 - Curva padrão para Interleucina-6	47
Figura 3 - Curva padrão para Fator de necrose tumoral- α	49
Figura 4 - Curva padrão para Interleucina-1 β	51
Figura 5 - Momento da coleta de sangue dos RNs para análise das citocinas	61
Figura 6 - Interleucina-6 e infecção neonatal	62
Figura 7 - Fator de necrose tumoral- α e infecção neonatal	63
Figura 8 - Interleucina-1 β e infecção neonatal	64
Figura 9 - Curva ROC (<i>receiver operating characteristics</i>) para os níveis plasmáticos de IL-6	66
Figura 10 - Curva ROC (<i>receiver operating characteristics</i>) para os níveis plasmáticos de TNF- α	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características clínicas da população estudada	55
TABELA 2 - Germes encontrados nas culturas dos recém-nascidos (Grupo I)	56
TABELA 3 - Dados laboratoriais da população estudada	58
TABELA 4 - Comparação entre recém-nascidos infectados (Grupos I, II e III) e controles (Grupo IV)	60
TABELA 5 - Valor diagnóstico de IL-6 e TNF- α na admissão de recém-nascidos com sepse neonatal precoce	68

RESUMO

Objetivo: Citocinas são sintetizadas e secretadas em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios, razão pela qual podem ser indicadores muito precoces de sepse neonatal precoce. A proposta deste estudo foi avaliar a contribuição da interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e interleucina-1 β para o estabelecimento de critérios diagnósticos de sepse neonatal precoce. Foram estudadas correlações dos níveis plasmáticos dessas citocinas com testes laboratoriais comumente utilizados (leucograma) e com a presença de febre.

Método: Foi realizado um estudo de coorte controlado com 117 recém-nascidos (RN) admitidos na Unidade Neonatal do HCPA no período compreendido entre julho de 1995 e agosto de 1996, com idade de zero a 5 dias de vida e suspeita clínica de infecção suficiente para o médico assistente indicar a necessidade de avaliação laboratorial. Nesse momento foi coletado material para hemograma, hemocultura ou qualquer outro teste cultural, dosagens plasmáticas de IL-6, TNF- α e IL-1 β , pela técnica de enzimoensaio, utilizando-se *kits* R & D Systems. Os pacientes foram divididos em quatro grupos: Grupo I, sepse neonatal comprovada (n= 13); Grupo II, sepse presumível, sem uso de antibiótico pela mãe no periparto (n=36); Grupo III, sepse presumível, no entanto a mãe recebeu

antibioticoterapia no periparto (n=17) e Grupo IV (n=51), RNs saudáveis, ou seja, aqueles com alguma suspeita clínica inicial de sepse, sem, no entanto, necessidade de antibioticoterapia para melhorarem e com ausência de germe na hemocultura e demais exames de cultura.

Resultados: Os quatro grupos tiveram composição semelhante quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, tipo de parto e escore de Apgar no 5º minuto. Não foi observada diferença entre os quatro grupos quanto a leucopenia, leucocitose, relação I/T $\geq 0,2$, neutropenia e trombocitopenia. Um número reduzido de pacientes apresentou alguma dessas alterações laboratoriais. Como o comportamento dos parâmetros clínicos e laboratoriais dos Grupos I, II e III não mostrou diferença estatisticamente significativa, foi possível agrupá-los em RN infectados (n=66) e compará-los com os não-infectados (n=51). A maioria dos RNs (82,9%) teve seu sangue coletado para avaliação dos níveis plasmáticos das citocinas nas primeiras 24 horas de vida. Interleucina-6 e TNF- α foram significativamente mais elevados nos Grupos I, II e III, quando comparados com o Grupo IV. As medianas dos valores de IL-1 β nos quatro grupos não foram estatisticamente diferentes. IL-6 e IL-1 β tiveram seus níveis plasmáticos mais elevados na presença de febre. A IL-1 β foi o melhor mediador da resposta febril no RN. Foram obtidas curvas ROC (*receiver operating characteristics*) para IL-6 e TNF- α , a fim de estabelecer o ponto de corte ideal para esses mediadores. Com um ponto de corte de 32 pg/ml para IL-6, a sensibilidade foi de 90%, e a especificidade, de 43%; o valor preditivo positivo foi de 67,4%, e o valor preditivo negativo, de 78,6%. Com relação ao TNF- α , o ponto de corte de 12 pg/ml forneceu uma sensibilidade de 87,9% e uma especificidade de 43%. Os valores

preditivos positivos e negativos foram, respectivamente, de 66,7% e 73,3%. Combinando os valores de pontos de corte de IL-6 e de TNF- α , a sensibilidade aumentou para 98,5%, demonstrando que essas citocinas contribuem decisivamente para o diagnóstico precoce de sepse neonatal precoce.

Conclusão: É possível caracterizar a resposta inflamatória e o comportamento dos mediadores quando precocemente estudados na evolução da sepse neonatal precoce, pois as citocinas, de um modo geral, alteram-se no início da instalação do processo inflamatório e apresentam meia-vida muito curta. A avaliação do leucograma (leucopenia, relação I/T) não foi efetiva para o diagnóstico de sepse neonatal precoce, provavelmente porque esses parâmetros laboratoriais necessitam de maior tempo para se mostrarem alterados que as citocinas estudadas. Os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α foram significativamente mais elevados em RNs com sepse neonatal precoce comprovada ou presumível quando comparados com os de RNs saudáveis. A associação desses mediadores mostrou-se o melhor marcador para sepse no período pós-natal imediato.

SUMMARY

Objectives: Cytokines are synthesised and secreted in response to a variety of inflammatory stimuli, therefore they can be very initial indicators of early onset neonatal sepsis. The purpose of this study was to evaluate the contribution of interleukin-6, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β for the diagnosis of early onset neonatal sepsis. We studied the correlation between cytokine plasma levels with commonly used laboratory tests (leukogram) and the presence of fever .

Methods: A cohort of 117 newborn infants (postnatal age within zero and 5 days old) admitted to the Neonatal Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, between July 1995 and August 1996, with a clinical suspicion of infection were included in the study. At that moment, samples were collected for complete blood count, blood culture or any other culture, plasma levels of IL-6, TNF- α and IL-1 β by enzyme-immunoassay (R&D Systems kits). Patients were divided in four groups: Group I: proved neonatal sepsis (n=13); Group II: probably infected with no maternal peripartum use of antibiotic (n=36); Group III: probably infected but mother received peripartum antibiotic (n=17), and Group IV: newborn infants that did not receive any antibiotic therapy (n=51).

Results: The four groups were similar in relation to birth weight, gestational age, type of delivery and Apgar scores in the fifth minute of life. There were no differences among the four groups in relation to the presence of leukopenia, leukocytosis, I/T ratio ≥ 0.2 ,

neutropenia, and thrombocytopenia. Very few patients had such alterations. There were no statistical differences among groups I, II and III in relation to clinical and laboratory findings, therefore, they were put together (n=66) and compared with group IV. Most of the newborn infants (82.9%) had their blood collected in the first 24 hours of life. IL-6 and TNF- α were significantly higher in groups I, II and III than in group IV. The median levels of IL-1 β were similar in all four groups. Newborn infants with fever had the highest levels of IL-6 and IL-1 β . The latest was the best mediator for fever in the neonatal period. The optimal cutoff point obtained with the receiver operating characteristics (ROC) curve was 32 pg/ml for IL-6 (sensitivity = 90%, specificity = 43%, positive predictive value = 67.4%, negative predictive value = 78.6%) , and 12 pg/ml for TNF- α (sensitivity = 87.9%, specificity = 43%, positive predictive value = 66.7%, negative predictive value = 73.3%). Combining IL-6 and TNF- α cutoff points provides a sensitivity of 98%.

Conclusion: It is possible to evaluate the inflammatory response during the evolution of early onset neonatal sepsis. Cytokines become abnormal very early. The blood count was not useful for diagnosis of early onset neonatal sepsis. IL-6 and TNF- α levels were significantly higher in newborn infants with neonatal sepsis than in normal newborn infants. The combination of IL-6 and TNF- α appears to be a highly sensitive marker of sepsis in the immediate post-natal period.

1. INTRODUÇÃO

Sepse é classicamente descrita como a presença de microorganismos patogênicos ou de suas toxinas na corrente sanguínea e demais tecidos do organismo, causando uma resposta sistêmica do paciente (1,38). A sepse neonatal precoce ocorre nos primeiros seis dias de vida, relacionada diretamente a fatores maternos gestacionais e periparto, incluindo ruptura prematura de membranas ovulares, trabalho de parto prematuro, corioamnionite, febre materna no periparto. O comprometimento é multissistêmico, e o germe, quando identificável, é do trato genital materno (93).

Freqüentemente os recém-nascidos (RN) apresentam sinais clínicos de infecção sistêmica, apesar de todas as culturas resultarem negativas. Quando tratados com antibióticos melhoram, fazendo crer que estavam realmente sépticos; essa situação tem recebido a denominação de suspeita clínica de sepse neonatal, sepse presumível ou síndrome séptica (43).

O conceito de sepse como síndrome da resposta inflamatória sistêmica foi sugerido a partir de conferência da *Society of Critical Care Medicine and American College of Chest Physicians Consensus Committee* de 1992. Este novo termo é definido pelos quatro critérios

clínicos maiores: instabilidade térmica, taquicardia, taquipnéia e alterações significativas na contagem de leucócitos (98).

Bone e colaboradores (13,14) foram os responsáveis pelas primeiras descrições e validação de critérios clínicos bem definidos para síndrome séptica em crianças. Tais critérios, no entanto, são de difícil definição no período neonatal. Por essa razão, para fins de clareza, toda vez que se fizer referência à sepse neonatal no presente estudo, considerar-se-ão as duas situações: sepse com germe identificável e a suspeita clínica de sepse ou, como atualmente tem sido denominada, síndrome séptica.

A sepse neonatal é uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Apesar dos avanços na terapia antimicrobiana, das medidas de suporte vital e da melhoria dos meios para diagnóstico de fatores de risco perinatal, a taxa de mortalidade é, em média, de 25% (117), e a incidência global é relativamente baixa, variando entre 1 e 8 casos para cada 1.000 nascidos vivos (38). O diagnóstico precoce e de certeza é difícil porque não há teste diagnóstico definitivo; além disso, a hemocultura e demais exames de culturas de líquidos biológicos e de secreções do organismo apresentam uma inaceitável baixa incidência de resultados positivos (baixa sensibilidade). Hammerberg e colaboradores (53) realizaram um estudo prospectivo com 488 RNs com suspeita clínica de sepse tratados com antibioticoterapia e encontraram apenas 12% de positividade nas hemoculturas. Estes fatos propiciam que a terapêutica antimicrobiana baseada nos achados clínicos e fatores de risco resulte em supertratamentos (104).

A fim de tratar todos os RNs com sepse e minimizar o tratamento para aqueles sem infecção, dados da história perinatal, do exame clínico e de testes laboratoriais podem ser

usados para otimizar resultados. Os exames laboratoriais incluem índices leucocitários, velocidade de hemossedimentação (VHS), concentrações de haptoglobina e proteína C reativa (PCR) (19,43,105). Entretanto, a análise desses testes tem valor limitado no diagnóstico de infecção precoce (69,67).

A eficácia de um teste diagnóstico consiste na habilidade de indicar a presença ou ausência de uma doença (40). Em estudo realizado na Filadélfia, foram analisadas a sensibilidade e a especificidade de PCR, VHS, haptoglobina e fibronectina plasmática isoladamente, encontrando-se em todas uma sensibilidade muito baixa. Quando testadas em associação com leucograma e relação I/T (relação originada da razão entre o número de neutrófilos imaturos, como bastonados, mielócitos, metamielócitos, e o número total de neutrófilos, ou seja, formas jovens e segmentados), PCR e VHS atingiram sensibilidade próxima a 100% (43). Em trabalho realizado anteriormente, por Philip e colaboradores (87), foi analisado o valor de cinco testes laboratoriais em conjunto: relação I/T igual ou superior a 0,2, leucopenia, PCR, VHS e haptoglobina. A sensibilidade e a especificidade observadas mostraram um índice elevado, de 93% e 88%, respectivamente, considerando quaisquer dois ou mais testes positivos. Contudo, estes testes laboratoriais, normalmente utilizados nas unidades neonatais, demoram para se apresentar alterados, o que não é compatível com a necessidade de diagnóstico precoce que os RNs requerem.

Recentemente, mediadores de resposta inflamatória aguda têm sido estudados como marcadores fidedignos de sepse e de sepse presumível ou síndrome séptica (32,59,73,74,116). As citocinas são pequenas proteínas, semelhantes aos hormônios, com atividade autócrina, parácrina e endócrina, mediando a resposta do hospedeiro ao estímulo

inflamatório e podem ser vistas como um meio de comunicação entre leucócitos e células endoteliais. Muitas citocinas estão envolvidas na regulação da resposta imunológica e na hematopoiese, mas sua função não é específica de uma certa linhagem de células, como inicialmente se acreditava. As citocinas têm uma grande variedade de funções biológicas nos diversos tecidos e células do organismo, sendo a interleucina-6 o exemplo mais típico de citocina multifuncional (59,32,29).

As citocinas mais estudadas no período neonatal são a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β), sendo mediadores importantes na resposta do hospedeiro a estresse e infecção (5,19,32,49,73,94,105,106,114). Ao nascimento, anormalidades das citocinas plasmáticas podem contribuir para aumentar a susceptibilidade à infecção e à redução da resposta febril do RN (5,75).

1.1. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

Após uma lesão tecidual ou invasão de um microorganismo patogênico, desencadeia-se uma cascata de eventos locais e sistêmicos. Esta resposta generalizada à lesão é referida como uma resposta inflamatória aguda, mediada por componentes celulares e humorais:

- Componentes celulares: são constituídos primariamente pelas células responsáveis pela fagocitose, como os polimorfonucleares, monócitos e macrófagos e, secundariamente, pelos eosinófilos e linfócitos (38,72). Outro componente celular importante na inflamação são as plaquetas.

- Componentes humorais: compreendem o sistema complemento, fibronectina, molécula de adesão intercelular, molécula de adesão celular vascular, molécula de adesão leucócito-endotelial, imunoglobulinas e citocinas. Estas moléculas de adesão fazem parte da grande família das imunoglobulinas e seletinas, e atuam contribuindo para a retenção de neutrófilos na microvasculatura, o que favorece o dano tecidual (38,72).

Os efeitos vasculares da inflamação são imediatos, ocorrendo vasoconstrição das arteríolas próximas ao local da lesão, seguida por vasodilatação, proporcionando assim maior fluxo de sangue no local inflamado. A dilatação arteriolar aumenta a pressão na microcirculação, com conseqüente exudação de plasma e componentes celulares sangüíneos para o interior dos tecidos; com isso, a viscosidade do sangue é maior e o fluxo sangüíneo mais lento. Os leucócitos aderem-se à parede do vaso e depois migram. Ao mesmo tempo, mediadores bioquímicos promovem a formação de espaços entre as células endoteliais, o que permite a passagem dos leucócitos através da parede dos vasos. Este estado de maior permeabilidade vascular perdura durante todo o processo inflamatório agudo, permitindo a exudação de proteínas plasmáticas e células sangüíneas continuamente ao tecido inflamado (72).

Os neutrófilos são os primeiros fagócitos a atingir o sítio da inflamação. Eles fagocitam a bactéria, com conseqüente morte celular, e são removidos como pus através do epitélio ou sistema linfático (68). Em adultos ocorre uma infiltração proeminente de polimorfonucleares nas primeiras 4 a 12 horas do processo inflamatório; no RN esta resposta é mais lenta e menos intensa, refletindo um estado de maturação deficiente (34,94).

Os próximos fagócitos são os monócitos (circulantes) e macrófagos (teciduais), cuja função é a mesma dos neutrófilos, porém agem durante um período de tempo mais prolongado e mais tardiamente no processo inflamatório, exercendo a atividade bactericida através da secreção de mais de cem moléculas importantes na regulação da inflamação (108). Os produtos secretados incluem as citocinas, fatores de crescimento, substâncias eicosanóides, enzimas e inibidores de enzimas, diversos fatores de coagulação, componentes do complemento, radicais livres de oxigênio e produtos do nitrogênio de baixo peso molecular, entre outros (72).

A seguir, a célula que migra ao sítio da inflamação é o eosinófilo, auxiliando a controlar a resposta inflamatória através de seus lisossomas com mediadores bioquímicos que controlam os efeitos vasculares da serotonina e histamina (68).

O sistema do complemento participa ativamente no processo imuno-inflamatório, além de ter um papel direto na destruição de bactérias. Endotoxinas podem ativar o sistema de complemento, tanto pela via clássica como pela via alternativa, resultando na liberação de fatores capazes de promover quimiotaxia e fagocitose leucocitárias, com conseqüente liberação de prostaglandinas, endorfinas e anafilatoxinas, possibilitando aumento da permeabilidade capilar e intensa reação inflamatória (72).

A endotoxina ativa o fator XII (fator Hageman), iniciando, desta forma, a cascata da coagulação, pela conversão de pré-tromboplastina e fibrinogênio em fibrina. No mesmo momento, ocorre uma conversão de plasminogênio em plasmina, que provoca a lise da fibrina em peptídios solúveis (produtos da degradação da fibrina). A ativação da pré-caliceína promove a conversão de cininogênio em bradicinina. Serotonina, histamina,

bradicinina e endorfinas são vasodilatadoras, aprisionando o sangue nos tecidos e, conseqüentemente, ocorrendo redução no retorno venoso (38,72).

As plaquetas atuam como fragmentos citoplasmáticos que interrompem o sangramento quando ocorre injúria vascular, sendo ativadas estimulação de muitos produtos da inflamação, incluindo colágeno, fator ativador plaquetário e formação de complexos antígeno-anticorpo (7, 38).

A atividade dos monócitos é semelhante no RN e no adulto. Estudos demonstram que a quimiotaxia é primariamente deficiente, e esta redução de função dos macrófagos no RN pode estar relacionada com decréscimo na produção de citocinas ou na expressão do receptor do complemento 3 (Cr3) (60). Os fatores humorais deficientes no RN são componentes do complemento: C3, C5 e fibronectina (43, 87,105).

O deficiente funcionamento dos neutrófilos caracteriza-se pela falta de mobilização, quimiotaxia, agregação, deformidade e lesão endotelial que são responsáveis pela fagocitose (8). A queda dos neutrófilos circulantes, associada à redução de suas reservas medulares e sua capacidade proliferativa ocorre como conseqüência da produção deficiente dos fatores de crescimento hematopoiéticos: fator estimulante de colônia de granulócito e fator estimulante de colônia de granulócito-macrófago. Estes fatos impossibilitam ao RN a recuperação do seu estado neutropênico (94,97).

Um sistema imune imaturo predispõe os RNs pré-termo à sepse bacteriana fulminante (32,60). A relativa imunodeficiência do prematuro é explicada por três fatores: menor potencial de opsonização, causado pela redução da função do complemento, produção

reduzida de interferon-gama pelos linfócitos T e produção deficiente de imunoglobulinas pelos linfócitos B (8,94).

No prematuro há redução da fagocitose bacteriana devido, principalmente, às dificuldades dos monócitos em expressar o fator estimulante de colônia de granulócito após estímulo infeccioso (32).

Fibronectina é uma glicoproteína envolvida na opsonização de vários microorganismos patogênicos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* e algumas bactérias gram-negativas. A fibronectina induz expressão de receptores do complemento ampliando funções do sistema celular fagocitário, sendo que baixos níveis desta molécula podem contribuir para o hipofuncionamento deste sistema, predispondo ao desenvolvimento de sepse (38,43,113). Em estudo prospectivo, concentração baixa de fibronectina foi um indicador de sensibilidade razoável, mas oferecia pouca acurácia adicional para uma avaliação laboratorial de sepse, consistindo de leucograma, relação I/T, PCR e VHS (44).

Muitas proteínas plasmáticas encontram-se aumentadas durante um processo inflamatório, sendo referidas como reagentes de fase aguda. São proteínas antiinflamatórias que atingem níveis circulantes máximos em 10 a 40 horas do início do processo inflamatório (86). Níveis plasmáticos elevados destes reagentes de fase aguda, principalmente o fibrinogênio, podem associar-se a elevação do VHS (102). A haptoglobina, por sua vez, é um reagente de fase aguda de utilidade limitada pela sua resposta mais lenta à infecção que a encontrada com PCR, por exemplo (43).

Proteína C reativa é um reagente de fase aguda sintetizado pelo fígado entre 6 a 8 horas após um processo inflamatório ou lesão tecidual (104). Sendo a infecção o processo inflamatório mais apresentado pelo RN, o valor diagnóstico da PCR na sepse neonatal tem sido objeto de estudo nos últimos anos. No entanto, seus níveis podem elevar-se tão lentamente que, se obtidas amostras sanguíneas para dosar PCR quando o RN apresentar clínica de infecção, um número significativo de pacientes com sepse não mostraria níveis anormais da PCR (48,122). Por outro lado, foi observado que, na sepse bacteriana aguda por microorganismos gram-negativos principalmente, os níveis de PCR permaneceram elevados durante 48 horas a despeito da melhora clínica do paciente (55).

Ceruloplasmina, substância sérica amilóide A, ferritina, hemopexina, fator VIII, plasminogênio e protrombina são reagentes de fase aguda que atingem níveis séricos maiores na resposta inflamatória. Transferrina, albumina e pré-albumina apresentam decréscimo de seus níveis em resposta à sepse (47,86,102).

Portanto, sepse bacteriana estimula o sistema imunológico e ativa monócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, os quais são responsáveis pela secreção de várias citocinas. As citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 além do fator estimulante de colônia de granulócito encontram-se entre os primeiros mediadores a serem liberados juntamente com a anafilatoxina C5 (um produto da ativação da via alternativa do complemento). Estes mediadores têm a capacidade de desencadear rapidamente uma resposta celular intensa, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos (63). Os mediadores secundários promovem a reativação das células fagocíticas e da cascata inflamatória, disseminando esta resposta. Por outro lado, as

citocinas antiinflamatórias modulam a resposta inflamatória e podem auxiliar no reparo tecidual. São mediadores antiinflamatórios: IL-4, IL-10, e o antagonista do receptor da IL-1 (rIL-1) (126).

1.2. CITOCINAS

Citocinas constituem um grupo de proteínas ou glicoproteínas de baixo peso molecular que exercem seus efeitos em concentrações extremamente baixas (níveis picomolares), localmente ou à distância, por intermédio de seus receptores de superfície celular, de forma semelhante à dos hormônios. As citocinas podem apresentar função autócrina, ligando-se a receptores na membrana da célula que é secretada, função parácrina, ligando-se a receptores na célula vizinha àquela secretada, ou ainda função endócrina, ligando-se a receptores em células distantes daquela que a produziu e secretou (29,51). Usualmente, são potentes mediadoras da resposta inflamatória e imunológica, sendo mensageiras moleculares entre as células participantes. As citocinas são secretadas por linfócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (1,29,51).

Os primeiros estudos sobre estas substâncias solúveis envolveram a descrição de diversos fatores solúveis. Estes fatores foram chamados linfocinas quando eram o produto de linfócitos, e monocinas quando secretados pelos macrófagos e monócitos (29). Em trabalhos posteriores, foi observado que estas substâncias solúveis eram secretadas por outros tipos de células de origem hematopoiética e não-hematopoiética e, em 1974, foi

sugerido que, uma vez que representavam uma extensa classe de mediadores de defesa do hospedeiro envolvendo diversas células, seria mais apropriado receberem a denominação de citocinas (30).

As citocinas agem mediante interações altamente específicas com seus receptores localizados na superfície das células, e a resposta específica das células às citocinas são determinadas, em parte, pelo reservatório de receptores expressos naquelas células. Estes receptores dependem do tipo de célula-alvo e de seu estágio de diferenciação e ativação celulares (29). Os receptores solúveis das citocinas competem com os receptores ligados à membrana regulando a sinalização das citocinas. Tais receptores solúveis podem estar ligados à membrana, sendo liberados intactos na circulação, ou como formas truncadas, ou, ainda, como moléculas precursoras clivadas enzimaticamente (4).

As citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β têm sido estudadas, mais recentemente, no período neonatal. Durante sepse por germes gram-negativos em adultos e crianças, encontram-se níveis séricos elevados de IL-6, TNF- α e IL-1 β (22,33,46,120).

1.2.1. INTERLEUCINA-6

Em 1986, foram clonados DNAs para três fatores estimulatórios de células B: IL-4, IL-5 e IL-6, esta última responsável pela diferenciação final das células B, em células produtoras de anticorpos (58). A IL-6 consiste numa cadeia de 184 aminoácidos com dois sítios potenciais de N-glicosilação e 4 resíduos de cisteína. Sua estrutura foi comparada com a de outras proteínas conhecidas e somente o fator estimulante de colônia de granulócitos

apresentou significativa homologia na sua estrutura terciária, sugerindo que estas duas moléculas possam desempenhar funções semelhantes (59). Em 1988, Yamasaki e colaboradores (124) descreveram uma proteína capaz de ligar-se à molécula de IL-6; este receptor da IL-6 consiste em uma seqüência de 468 aminoácidos e apresenta sítios de ligação com alta e baixa afinidades.

A interleucina-6 é produzida por diferentes tipos de células linfóides e não-linfóides, como: células T, células B, monócitos, fibroblastos, queratócitos, células endoteliais, células mesangiais e várias células tumorais. A regulação desta produção ocorre mediante uma variedade de sinais: a produção da IL-6 pelas células T é induzida por mitógenos de células T ou estimulação antigênica na presença de contato direto com macrófagos (56,59). Os lipopolissacarídeos aumentam a produção de IL-6 pelos fibroblastos e monócitos (54,56). Diferentes citocinas, incluindo IL-1, TNF- α , fator de crescimento plaquetário e interferon-gama promovem a expressão da IL-6 por várias células (59). IL-6 atua na síntese de proteínas plasmáticas pelos hepatócitos, contribuindo na resposta de fase aguda e servindo como fator de crescimento para células plasmáticas malignas (29). Existem vírus que promovem a produção de IL-6 pelos fibroblastos. O vírus da imunodeficiência humana induz produção de IL-6 pelos monócitos (77). Os corticosteróides inibem a expressão de genes de IL-6 em células e tecidos (54).

A interleucina-6 é uma citocina com papel importante na síntese da PCR no fígado, podendo, hipoteticamente, ser detectada mais precocemente que a PCR durante uma infecção bacteriana (19). Age como um sinal na ativação de células T e induz secreção de anticorpos pelas células B e diferenciação de células T citotóxicas. É o maior indutor da

síntese protéica hepática, incluindo PCR, fibrinogênio e proteína sérica amilóide A, durante a resposta de fase aguda (59). A IL-6 é um dos fatores hepatócito-estimulantes derivados de monócitos envolvidos na indução da síntese de proteínas de fase aguda *in vivo* e *in vitro* (42).

Estudos de sepse em adultos demonstraram níveis elevados de IL-6 correlacionados com alta mortalidade, sugerindo que este mediador é importante na patogênese da infecção em seres humanos (21,52). Em crianças com infecção bacteriana, Sullivan e colaboradores (112) detectaram níveis elevados de IL-6. Vários outros trabalhos compararam a produção de IL-6 em crianças com hemocultura positiva e encontraram níveis superiores aos dos controles (49,55).

Em neonatos com complicações infecciosas perinatais, Miller e colaboradores (75) registraram concentrações elevadas de IL-6 no plasma de cordão umbilical. Lencki e colaboradores (65) sugeriram que os níveis de IL-6 no sangue de cordão umbilical podem ser usados para identificar RNs com risco para desenvolvimento de sepse.

Em estudos prospectivos, foi demonstrado que a IL-6 é um marcador muito precoce no diagnóstico de infecção neonatal, elevando-se várias horas antes do aumento das concentrações de PCR, além de apresentar boa especificidade e sensibilidade como marcador de infecção (19,49). Buck e colaboradores (19) observaram uma redução na IL-6 a níveis indetectáveis em 24 horas na maioria dos Rns infectados. A meia-vida curta da IL-6 deve-se à ligação com proteínas plasmáticas, como α 2-macroglobulina, ao fato de ser estocada precocemente no fígado ou à inibição por outras citocinas (25).

A interleucina-6 é importante na geração de proteínas de fase aguda. Heney e colaboradores (55), comparando a relação dos níveis de IL-6 e PCR em crianças com neutropenia e febre, observaram um pico de elevação nos níveis de PCR 24 horas após a elevação máxima dos níveis de IL-6, o que explicaria as dificuldades de estudos anteriores, onde apenas a PCR foi dosada (48).

1.2.2. FATOR DE NECROSE TUMORAL α

O sistema imunológico produz citocinas e outros fatores humorais para proteger o hospedeiro contra agentes inflamatórios, invasão microbiana, ou outros mecanismos de lesão. Alguns exemplos de lesão mediada pelo sistema imunológico incluem choque anafilático, doença auto-imune e desordens formadoras de imunocomplexos. Mais recentemente, o papel da caquexina ou TNF- α na fisiopatologia de diversos estados inflamatórios e de outra série de doenças, como choque séptico e caquexia tem sido melhor estudado (51).

A história do TNF- α teve seu início em 1890 com a observação de um cirurgião, William Coley, que notou a ocorrência de uma regressão tumoral esporádica em pacientes com infecção bacteriana intercorrente. Embora ele tenha sido capaz de induzir alguns casos de necrose tumoral, pelo crescimento de certos germes em culturas, ocorreram complicações pela toxicidade severa que causaram em outros tecidos não neoplásicos (51). Posteriormente, Carswell e colaboradores (26), isolaram o TNF- α no soro de ratos, identificando-o como o mediador endógeno ativo de regressão tumoral.

Caquexina ou TNF- α é produzida pelos macrófagos e outras células imunocompetentes fagocíticas e não-fagocíticas em resposta a uma variedade de estímulos, sendo a endotoxina e lipopolissacarídeos os mais potentes (29).

Fator de necrose tumoral- α desempenha um papel importante na função celular fagocitária e na indução de uma variedade de outras funções inflamatórias e imunológicas, tais como a expressão de moléculas de adesão isoladamente ou por indução da produção de outras citocinas. Acredita-se que seja o principal responsável pela lesão letal e insuficiência orgânica que ocorrem no choque séptico (32). Estudos em adultos têm demonstrado ser o TNF- α um dos principais mediadores do choque séptico (80). Altas concentrações na circulação sanguínea correlacionam-se com a gravidade da doença e prognóstico desfavorável (22).

O Fator de necrose tumoral- α medeia choque séptico e lesão tecidual difusa pelo seu efeito nas células endoteliais vasculares, causando um aumento na atividade pró-coagulante endotelial, funcionando como uma superfície anticoagulante e, portanto, trombogênica (79,81). Estas alterações contribuem para o desenvolvimento de um estado de trombose capilar difusa e inadequada perfusão tecidual. As células endoteliais são também ativadas para a expressão de moléculas de adesão leucócito-endotelial e moléculas de adesão leucócito-intercelular as quais medeiam a marginação de leucócitos polimorfonucleares e, conseqüentemente, elevam o número de leucócitos circulantes, resultando em leucocitose (89). Os leucócitos aderidos são estimulados pelo TNF- α a produzir ânions superóxidos e outros mediadores inflamatórios secundários. Esta resposta inflamatória contribui para lesão

e destruição dos tecidos do hospedeiro, como ocorre na síndrome da angústia respiratória do tipo adulto, complicação responsável pela alta mortalidade da sepse em humanos.

O Fator de necrose tumoral- α e a Interleucina-1 β são fundamentais na fisiopatologia da sepse, porém ainda não está bem definida sua importância no diagnóstico precoce de sepse em RNs (80). Foram observados níveis mais baixos de TNF- α em neonatos com complicações infecciosas perinatais, quando comparados com RNs saudáveis. Em neonatos com complicações infecciosas perinatal bem definidas, os níveis de IL-6 no cordão umbilical foram marcadamente elevados, enquanto o TNF- α foi marcadamente reduzido (75). Sabe-se que o TNF- α interage com várias citocinas e fatores humorais, com alguns deles sinergicamente, como IL-1, interferon-gama e outros, inibindo ou reduzindo seus efeitos. TNF- α e IL-1 β apresentam diversas interações: ambos induzem proliferação fibroblástica e síntese de colágeno, TNF- α estimula a produção de IL-1 β pelos monócitos e é também diretamente pirogênico como a IL-1 β , e níveis elevados de IL-1 β podem correlacionar-se com severidade da doença, desde que acompanhados de níveis elevados de TNF- α (34). Ambas as proteínas produzem hipotensão e choque, embora o TNF- α seja mais potente na produção de choque em modelos animais. Seus efeitos citotóxicos não são exatamente os mesmos: IL-1 β não é efetiva contra a maioria das células tumorais, ao contrário do TNF- α , que é uma citotoxina potente. Interleucina-1 β apresenta efeitos citotóxicos contra as células do melanoma, que são indetectáveis no TNF- α . Tais observações sugerem que o TNF- α pode ser um mediador de resposta inflamatória que regula a secreção de IL-1 β , e que estas citocinas, quando usadas em combinação, apresentam efeitos sinérgicos (34, 59).

1.2.3. INTERLEUCINA-1 β

O termo interleucina-1 foi primeiramente referido em 1979, por Aarden e colaboradores (1), ao descreverem um produto de macrófagos. Os relatos anteriores, datados de 1953, referiam-se a um material pirogênico produto de leucócitos ativados (11), o que posteriormente, Atkins e colaboradores (6) chamaram de pirogênio endógeno.

Há duas formas de IL-1, cujos genes foram localizados no cromossomo 2, ambas sintetizadas como precursoras com peso molecular de 31 kDa. A IL-1 α é composta por uma seqüência de 271 aminoácidos (forma ácida), e a IL-1 β , por 269 aminoácidos (forma neutra) (27,39). Estas duas diferentes proteínas apresentam 22% dos seus aminoácidos em comum e ligados ao mesmo receptor (29).

A interleucina-1 β é produzida principalmente por fagócitos, mediante a estimulação de substâncias associadas com lesão tecidual, incluindo bactérias, endotoxinas, interferon e complexos antígeno-anticorpo. É um fator ativador de linfócitos que, entre outras funções, aumenta a produção de anticorpos, estimulando assim a produção de interleucina-2 pelos linfócitos T (39).

A interleucina-1 β é mediador de aspectos múltiplos da resposta inflamatória, incluindo febre, síntese de proteínas de fase aguda e alterações na contagem de neutrófilos e promovendo neutrofilia, quimiotaxia e aumento da atividade de enzimas lisossomais. A maior síntese de proteínas hepáticas ocorre durante a reação de fase aguda à infecção e lesão, incluindo proteínas de fase aguda clássicas como PCR e substância sérica amilóide A, além das proteínas hepáticas normais, como os fatores de coagulação, componentes do

complemento, fibrinogênio, haptoglobina e ceruloplasmina (5). Ao mesmo tempo, ocorre redução da síntese de albumina (72).

É considerada pirogênio endógeno, produzindo febre pela ativação de receptores especializados localizados no hipotálamo anterior que estimulam a síntese local de prostaglandinas da série E (PGE₂) e demais metabólitos (34,107). Influencia na resposta imunológica e está envolvida na gênese de células produtoras de anticorpos e células T citotóxicas (29).

As interleucinas-1 α e β ligam-se ao mesmo receptor, possivelmente uma proteína de 80 kDa de massa molecular e uma segunda cadeia, semelhante ao receptor da IL-2. Um dos aspectos mais importantes do receptor da IL-1 é que as células respondem a concentrações mínimas de IL-1 sem uma ligação demonstrável (51).

Os monócitos do sangue periférico de RNs prematuros são capazes de produzir IL-1 β , e os níveis secretados são semelhantes aos dos monócitos do sangue do cordão umbilical de neonatos a termo (121). Parece que não há influência da idade gestacional na capacidade de secreção de IL-1 β pelos monócitos de RNs (121). No entanto, Dinarello (34) mostrou que os monócitos de bebês nascidos de parto cesareano produziram IL-1 β em concentrações significativamente menores que os de bebês nascidos de parto natural (34). Em estudo realizado por Miller e colaboradores (75) sobre os níveis de IL-1 β no cordão umbilical, foram encontrados níveis maiores de IL-1 β em RNs de parto vaginal induzido ou cesareano de urgência, em relação aos de RNs de parto vaginal normal ou cesareana eletiva. Em contraste, os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α não diferiram com o tipo de parto.

Especula-se que as citocinas maternas possam atravessar a barreira placentária, atingindo a circulação fetal. Em publicações recentes de Romero e colaboradores (95,96) foram encontrados níveis elevados de TNF- α e IL-1 β no líquido amniótico, durante trabalho de parto prematuro associado a infecção materna, o que pode sugerir o envolvimento destes mediadores como sinal de início de trabalho de parto.

1.3. DIAGNÓSTICO DE SEPSE

A sepse em adultos é caracterizada por duas formas distintas: “choque quente” e “choque frio”. O primeiro é descrito como uma condição com débito cardíaco elevado, redução da pressão arterial sistêmica e marcada queda da resistência vascular periférica. No segundo, o débito cardíaco e a pressão arterial sistêmica encontram-se reduzidos, e a resistência vascular periférica, elevada (3).

Ao contrário do referido na literatura para adultos, as descrições de sepse neonatal são uniformemente caracterizadas pelo “choque frio”. Os RNs com sepse são descritos como hipotérmicos, pele de coloração marmóreo-acinzentada ou “moteada”, com vasoconstrição periférica e oligúria, além de outras evidências de isquemia orgânica (3,20,85,92). Estudos detalhados de mudanças hemodinâmicas durante a sepse em modelos experimentais com animais logo após o nascimento demonstram redução do débito cardíaco e elevação da resistência vascular nas circulações pulmonar, mesentérica, sistêmica e cerebral (73).

O maior problema da sepse neonatal é a identificação do RN infectado, sendo o seu diagnóstico uma das questões mais difíceis da clínica médica. A observação clínica, a despeito das limitações, permanece a forma mais prática para o diagnóstico precoce de graves infecções bacterianas (105). Os sinais iniciais de sepse em RNs podem ser mínimos ou inespecíficos, tanto que neonatos assintomáticos mas com alto risco para desenvolvimento de infecção recebem antibioticoterapia empírica, mesmo sem evidência de germe em hemoculturas e demais exames de culturas (43).

Achados como recusa alimentar, hipoatividade, irritabilidade, ou simplesmente a impressão de que o RN “não parece bem”, podem levar à suspeita de um quadro infeccioso. Existem apresentações clínicas mais evidentes, como dificuldade respiratória (taquipnéia, gemência, retrações torácicas, batimentos de asas nasais), apnéia, letargia, convulsão, febre ou hipotermia, icterícia sem outra causa determinante, vômitos e diarreia, ou ainda manifestações cutâneas, incluindo petéquias, abscesso e escleredema (12,93).

Bonadio e colaboradores (12) determinaram os sinais clínicos mais evidentes de sepse em duzentas crianças com febre entre 0 e 8 semanas de vida. Alterações na atividade motora, perfusão periférica e desconforto respiratório foram os sinais que melhor identificaram infecção bacteriana grave.

As manifestações clínicas mais frequentes de sepse neonatal precoce apontada por autores como Fanaroff e colaboradores, Avery e colaboradores e Remington e colaboradores em seus livros-textos são (7,38,93):

- Instabilidade térmica: hipotermia ($\text{tax} < 36,5^{\circ}\text{C}$) ou hipertermia ($\text{tax} > 37,5^{\circ}\text{C}$), sendo hipotermia indicativa de maior gravidade, como componente clínico do “choque frio”. Os RNs podem também estar sépticos sem qualquer alteração de temperatura (93). Sepses bacteriana é observada em 10% dos RNs a termo com febre ($\text{tax} \geq 37,8^{\circ}\text{C}$), enquanto hipotermia é inespecífica nos primeiros dias de vida (43).

- Alterações cardiopulmonares: taquipnéia, apnéia e dificuldade respiratória como gemência, retrações torácicas, batimentos de asas nasais e ruídos adventícios, cianose central ou periférica. Em estágios de colapso circulatório podem ocorrer oligoanúria, taquicardia, hipotensão arterial e demais sinais de baixo débito cardíaco.

- Alterações do sistema nervoso central: irritabilidade, alterações do comportamento, letargia, hipotonia ou hipertonia, apnéia, tremores e abalos musculares, convulsões.

- Alterações gastrintestinais: intolerância gástrica, caracteristicamente com recusa ao seio materno, vômitos (pós-alimentares ou não), distensão abdominal com ou sem cólicas, diarreia e icterícia idiopática. Hepato e esplenomegalia são manifestações clínicas de sepsis grave, principalmente quando relacionadas a infecção congênita do grupo STORCH (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes), a icterícia neste caso, surgiria de forma mais grave e evidente, como parte destas síndromes clínicas.

- Manifestações cutâneas: além dos sinais de má perfusão periférica, como retardo do enchimento capilar, cianose, pele marmóreo-acinzentada e palidez, podem-se observar petéquias, púrpura, *rashes*, pústulas, celulite, onfalite, edema e escleredema.

- Manifestações oculares: conjuntivite, celulite orbital e as que fazem parte das manifestações clínicas do grupo STORCH.
- Distúrbios metabólicos: hipo ou hiperglicemia, acidose metabólica, alterações na natremia, calcemia e caemia.
- Manifestações hematológicas: sinais de coagulopatia disseminada, como sangramento em locais de punção, petéquias e equimoses, hematomas, hemorragia pulmonar e hemorragia digestiva.
- Avaliação subjetiva: refere-se ao RN que simplesmente “não parece estar bem”.

É necessária uma abordagem sistemática para o diagnóstico clínico de sepse neonatal baseado na importância dos sintomas clínicos e dos fatores de risco maternos e do RN.

1.3.1. FATORES DE RISCO

Os fatores de risco para a ocorrência de sepse neonatal podem estar relacionados ao RN e maternos ou periparto:

- Prematuridade: devido às deficiências imunológicas do RN prematuro, incluindo produção de imunoglobulinas, sistema complemento, capacidades de opsonização e de fagocitose, o risco de infecção nos prematuros é oito a onze vezes maior que nos Rns a termo, com uma taxa de infecção que oscila entre 4% e 11% (43). O risco de sepse por *Streptococcus* do grupo B é 7 vezes maior no prematuro, e os com peso de nascimento

inferior a 1.500 gramas apresentam um risco relativo de adquirirem sepse 8 a 11 vezes maior que os RNs a termo (15).

- **Asfixia perinatal:** em estudo de St.Geme e colaboradores (110), um escore de Apgar inferior a 6 na presença de bolsa rota constituiu um forte preditor de sepse neonatal. Há pesquisas que demonstram uma taxa de 27% de sepse comprovada em prematuros com bolsa rota e asfixia perinatal. A asfixia severa determina neutropenia e depleção da reserva medular de neutrófilos (43,61).

- **Sexo masculino:** observações da última década confirmam que os RNs do sexo masculino apresentam 2 a 6 vezes mais chances de desenvolver sepse perinatal que os do sexo feminino (110). Talvez este fato seja explicado pela deficiência de receptores para IL-1 no sexo masculino, o que poderia predispor à infecção (93).

- **Ruptura prematura de membranas ovulares ou bolsa rota e corioamnionite:** diversos estudos colaborativos concluíram que a incidência de sepse em RNs de mães com bolsa rota por tempo superior a 24 horas é de aproximadamente 1% (61,83,90). Na presença de sinais e sintomas de corioamnionite, o risco de sepse comprovada eleva-se para 3% a 5% (110). Infecção intra-amniótica clinicamente evidente, também denominada corioamnionite clínica, complica 1% a 10% das gestações, podendo resultar em morbidade materna e morbi-mortalidade perinatal mais elevadas (10). O diagnóstico clínico de corioamnionite, no entanto, algumas vezes é difícil, com achados não específicos, devendo-se suspeitar dessa infecção na presença de febre materna, hipertermia uterina, líquido amniótico purulento ou com odor fétido, leucocitose materna ou ainda taquicardia fetal. O diagnóstico obtido por exame anatomopatológico de placenta é de fácil execução, mas seu

resultado é raramente conhecido a tempo de influenciar no manejo clínico (37). Na corioamnionite o risco de sepse é de 10 a 15% no RN a termo e de 35% a 50% no prematuro.

St. Geme e colaboradores (109,110) recomendam critérios de pontuação (figura 1) para auxiliar na decisão terapêutica. Na presença de três ou mais pontos ou de dois pontos acompanhados de idade gestacional inferior a 34 semanas, está autorizado o uso de antibioticoterapia precoce, ou seja, enquanto se aguarda a investigação para sepse.

CRITÉRIOS	PONTOS
IG < 34 semanas	2
IG 34-37 semanas	1
Corioamnionite	1
Amnionite patológica	2
Apgar 5 min. < 6	1
Trabalho de parto > 20 h + Bolsa rota	1

Fonte: (110)

Fig. 1 - Bolsa rota e índices considerados para tratamento

- Colonização materna com *Streptococcus* do grupo B: na ausência de qualquer outra complicação clínica, *Streptococcus* do grupo B no trato genital materno não é significativo para o desenvolvimento de sepse, com um risco de 0,5% a 1%. Boyer e colaboradores (16) identificaram três situações de alto risco para o desenvolvimento de sepse neonatal nas mães colonizadas por *Streptococcus* do grupo B: 1) bolsa rota por tempo superior a 18 horas (aumenta o risco em 7 vezes); 2) febre materna (aumenta o risco em 4 vezes); 3) prematuridade (aumenta o risco em 7 vezes). Assim, a prevenção de infecção periparto tem sido preconizada para mães com suspeita clínica de infecção. Estudos avaliando a prevenção de sepse por *Streptococcus* do grupo B em RNs, mediante administração de ampicilina periparto e puerperal, encontraram resultados positivos na prevenção efetiva de infecção nos casos de bolsa rota por tempo superior a 12 horas e de mães colonizadas em trabalho de parto prematuro (83,91,111).

- Infecção do trato urinário materno: exceto nos casos tratados no início da gestação e resolvidos antes do início do trabalho de parto, a infecção urinária materna está associada com maior risco de infecção neonatal, provavelmente por aumentar as chances de trabalho de parto prematuro e nascimentos prematuros, além da frequência maior de corioamnionite (78).

- Doença hipertensiva específica da gestação: existe correlação positiva de pré-eclâmpsia com leucopenia, neutropenia absoluta, trombocitopenia e maior incidência de sepse (38).

- Gestação múltipla: o primeiro gêmeo é mais suscetível a sepse neonatal precoce, principalmente quando o agente etiológico é o estreptococo (38).

1.3.2. *DIAGNÓSTICO LABORATORIAL*

Isolamento do microorganismo patogênico em qualquer líquido ou secreção do organismo é o padrão áureo e o método mais específico para o diagnóstico de sepse neonatal (43,93).

- Hemocultura: embora considerada padrão áureo, a sensibilidade ainda é baixa, e a eficácia deste teste diagnóstico depende do meio de cultura utilizado e do microorganismo. Resultados falso-positivos podem ocorrer por contaminação do local de punção; a forma de evitá-los é uma coleta adequada e asséptica (115). Pode-se distinguir um resultado positivo verdadeiro de contaminação puncionando-se dois sítios diferentes ao mesmo tempo, realizando cultura da pele no local de punção ou, ainda, repetindo o teste com intervalo de 12 a 24 horas (43).

- Exame de líquido: realiza-se bacteriológico, bacterioscópico, contagem de células e bioquímica do líquido em todo RN candidato a tratamento antimicrobiano para sepse neonatal. É freqüente a associação de meningite neonatal e sepse e nem todos os RNs com meningite apresentam sintomas específicos. Além disso, 15% dos Rns com cultura de líquido positiva apresentam ausência de crescimento de germe na hemocultura (119).

- Urocultura: é útil no diagnóstico de infecção nosocomial no RN. Na sepse precoce é muito difícil a obtenção de cultura de urina positiva. A urina deve ser obtida por punção suprapúbica (93).

- Cultura de aspirado traqueal: embora a diferenciação entre colonização e infecção possa ser difícil quando se obtêm culturas de aspirado endotraqueal em neonatos

cronicamente ventilados, as amostras de aspirado endotraqueal são úteis quando coletadas nas primeiras 12 horas de vida (43). Sherman e colaboradores, demonstraram uma positividade de 44% no aspirado traqueal de RNs com pneumonia e hemocultura com ausência de germes (103).

Testes diagnósticos não específicos, coadjuvantes, têm sido empregados conjuntamente na prática clínica, na tentativa de identificar o RN infectado. São testes capazes de indicar infecção, mas não identificam o microorganismo causador da sepse.

- Leucograma: a liberação dos leucócitos é dinâmica; mesmo em condições normais existe uma leucocitose nas primeiras 12 a 18 horas de vida. Considera-se como leucocitose quando o número total de leucócitos é superior a 25.000. Há inúmeras outras condições em que leucocitose está presente, como asfixia perinatal, febre materna, condições associadas ao estresse do trabalho de parto. Leucopenia (número inferior a 5.000 leucócitos) também está associada a asfixia, além de hipertensão materna, hemorragia peri-intraventricular e hemólise (43). Neutropenia (contagem de neutrófilos inferior a 1.000) é o mais fidedigno preditor de sepse neonatal. A relação de neutrófilos imaturos (metamielócitos + mielócitos + bastonados) e neutrófilos totais é conhecida como relação I/T, sendo considerada de valor preditivo para sepse quando seu índice for igual ou superior a 0,2 ($I/T \geq 0,2$) (94). No entanto, este teste tem acurácia diagnóstica relativa devido à alta incidência de resultados falso-negativos e não deve ser analisado isoladamente (87,43). A fim de aumentar o valor diagnóstico do leucograma, alguns autores têm tentado demonstrar que a presença de neutrófilos vacuolizados ou granulações tóxicas são prováveis indicadores de sepse (66).

Philip e colaboradores (87) avaliaram a acurácia diagnóstica de testes individuais e associados (dois ou mais testes positivos) na sepse neonatal precoce. Os cinco testes mais úteis foram: relação I/T $\geq 0,2$; leucopenia; PCR (positiva $> 0,8$ mg/ dl); VHS (superior a 15 mm na primeira hora) e haptoglobina (positiva > 25 mg/dl). Na presença de resultados positivos em dois ou mais destes testes, a sensibilidade e a especificidade atingiram níveis mais satisfatórios (93% e 88%, respectivamente). Estes testes avaliados isoladamente apresentaram sensibilidade de 30% para PCR e VHS e especificidade de 78% para a relação I/T. A combinação de leucopenia e relação I/T $\geq 0,2$ parece ser particularmente expressiva para o diagnóstico precoce de sepse neonatal (87).

- Proteína c reativa: a elevação da PCR tem sido um marcador útil para sepse em muitos estudos, apesar de o valor preditivo negativo e a sensibilidade não serem suficientemente elevados para que a PCR sozinha se constitua no teste diagnóstico definitivo (43). Os valores da PCR são indicativos prognósticos, sendo observada uma boa resposta ao tratamento antimicrobiano, confirmada pelo retorno da PCR aos seus valores normais, no entanto, a persistência ou declínio insignificante da PCR reflete inadequação do tratamento ou desenvolvimento de complicações que requerem troca de antibiótico (102).

- VHS: é um teste diagnóstico pouco sensível e específico. Resultados falso-positivos podem ocorrer com hemólise, e falso-negativos com coagulação intravascular disseminada, em que há consumo de fibrinogênio que reduz a formação do empilhamento das hemácias (formação de *rouleaux*). VHS não tem valor prognóstico para sepse neonatal precoce, considera-se elevado quando superior a 15 mm/h (102).

- Outros reagentes de fase aguda: ceruloplasmina, haptoglobina, fibronectina plasmática e proteínas séricas amilóide A e α -1-ácido-glicoproteína são reagentes de fase aguda de um processo inflamatório ou infeccioso cuja utilidade diagnóstica é limitada. A fibronectina plasmática geralmente cai durante o curso da sepse em neonatos, sendo um indicador razoável de infecção, mas oferece pouca acurácia diagnóstica se comparada com PCR, relação I/T e VHS, quando avaliadas isolada ou conjuntamente (43,87,102).

1.4. TRATAMENTO

Na sepse precoce predominam os microorganismos colonizadores do trato genital materno, como *Streptococcus* do grupo B, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, entre outros. A antibioticoterapia empírica, portanto, deve ser direcionada a esses germes. O tratamento deve ser iniciado imediatamente após a coleta de exames para cultura. Os antibióticos de uso empírico inicial são ampicilina e gentamicina ou amicacina (7,38).

O tratamento do RN séptico após o quarto dia de vida, pode necessitar a inclusão de antibioticoterapia contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e bacilos gram-negativo entéricos (93).

2. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico precoce de sepse neonatal é de fundamental importância para o tratamento adequado e consequente prognóstico favorável. A maior mortalidade refere-se a sepse neonatal precoce, podendo atingir taxas de 15% a 50%, com envolvimento multissistêmico e curso fulminante (93).

A literatura não fornece evidências definitivas que favoreçam o diagnóstico de certeza de sepse, exceto pela hemocultura (padrão áureo), e exames culturais de líquidos biológicos e secreções do organismo que são mais representativos na sepse tardia que na sepse neonatal precoce.

No entanto, se tratarmos somente os RNs com sepse comprovada, estaremos cometendo o grave erro de não fazê-lo em pacientes potencialmente doentes. De outra forma, se tratarmos todos os RNs clinicamente suspeitos de infecção, conduta atualmente rotineira nos serviços de neonatologia, muito provavelmente estaremos usando antibioticoterapia em excesso e de forma desnecessária.

Sabe-se que um conjunto de achados laboratoriais, inespecíficos para o diagnóstico, aliados a fatores predisponentes maternos e do RN indicam alto risco para o desenvolvimento de sepse neonatal precoce (43,87,105).

São inúmeros os relatos de mediadores da resposta inflamatória aguda envolvidos na fisiopatologia da infecção bacteriana aguda de adultos e crianças, no entanto, há poucas referências sobre sua validade para RNs (19,43,94).

Mais recentemente, as citocinas têm sido estudadas como marcadores fidedignos de infecção neonatal. Raras publicações avaliam o valor diagnóstico de um conjunto de citocinas, como interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e interleucina-1 β . Em nosso meio, não existem estudos disponíveis.

Os trabalhos anteriormente realizados não apresentam uma distinção clara entre RNs com sepse comprovada, com sepse presumível e saudáveis no que se refere às dosagens das citocinas que analisamos.

3. HIPÓTESE

As citocinas são sintetizadas e secretadas em resposta a estímulos inflamatórios razão pela qual IL-6, TNF- α e IL-1 β podem ser indicadores precoces de sepse neonatal precoce.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a contribuição dos mediadores de resposta inflamatória aguda, interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e interleucina-1 β para o estabelecimento de critérios para o diagnóstico de sepse neonatal precoce.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os níveis de IL-6, TNF- α e IL-1 β em RNs com sepse comprovada e presumível em relação aos neonatos saudáveis.
- Definir o papel da relação entre neutrófilos (formas imaturas e maduros) e formas jovens, conhecida como I/T, no diagnóstico de sepse comprovada e presumível, correlacionando-o com os mediadores da resposta inflamatória aguda estudados.

-
-
- Determinar a associação entre sepse neonatal comprovada e presumível com mediadores da resposta inflamatória aguda: interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e interleucina-1 β .
 - Correlacionar a presença de febre com os níveis de interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e interleucina-1 β , definindo o melhor mediador da resposta febril do RN.

5. PACIENTES E MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

A pesquisa desenvolveu-se sob a forma de um estudo de coorte, controlado, eixo temporal contemporâneo, obedecendo a um eixo de montagem dinâmico (condicionado a partir do desfecho), de caráter observacional e com eixo de unidade individual. O fator em estudo foram os mediadores de resposta inflamatória aguda, e o desfecho clínico, a presença de sepse comprovada ou presumível.

5.2. POPULAÇÃO

5.2.1. POPULAÇÃO EM ESTUDO

A população em estudo constituiu-se de todos os RNs internados na Unidade de Neonatologia e Alojamento Conjunto do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

5.2.2. POPULAÇÃO DA PESQUISA

Os pacientes efetivamente estudados foram 117 (n) recém-nascidos com suspeita clínica de infecção admitidos na Unidade Neonatal e Alojamento Conjunto do HCPA no período compreendido entre julho de 1995 e agosto de 1996, com idade de zero a 5 dias de vida.

5.3. AMOSTRA E AMOSTRAGEM

5.3.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados elegíveis para a pesquisa todos os RNs admitidos na Unidade de Neonatologia do HCPA cujo médico-assistente tivesse solicitado coleta de sangue para realização de hemograma e hemocultura nos primeiros cinco dias de vida, desde que o RN não estivesse em uso de antibioticoterapia previamente à obtenção do material para esses exames e demais exames de culturas.

5.3.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Constituíram fatores de exclusão:

- RNs de muito baixo peso (peso inferior a 750 g) ou extremamente prematuros (idade gestacional até 26 semanas), devido às suas peculiaridades, pois neles uma coleta de

sangue adicional ao já requerido pela equipe assistencial poderia causar eventual dano à vida (40,57).

- RNs com suspeita clínica ou laboratorial de qualquer infecção congênita.
- Mães com soropositividade para o vírus da imunodeficiência humana (HIV +), ou com suspeita clínica de SIDA.
- Mães com qualquer infecção do grupo STORCH, suspeita ou comprovada, durante a gestação.

5.4. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado a partir de um valor esperado de poder estatístico do teste com a amostra coletada no estudo ($n=117$). Para tanto, foram necessárias análises complementares do poder estatístico e algumas suposições sobre o *effect size* (ES). O nível de significância utilizado durante o procedimento foi de $\alpha = 5\%$.

Poder estatístico: é a probabilidade de rejeitar qualquer hipótese estatística formulada quando a mesma é falsa. Para um determinado tamanho de amostra, o poder do teste será maior quanto maior for a diferença verdadeira entre as médias da amostra analisada. Por outro lado, quanto maior a diferença verdadeira entre as médias, menor tamanho de amostra será necessário para detectar estatisticamente essa diferença (28).

Effect size (ES): é um parâmetro que recebe o valor zero quando a hipótese formulada é verdadeira, e um valor diferente de zero quando a hipótese é falsa. Serve como uma medida do grau de afastamento da hipótese formulada. No caso de comparação entre médias, o ES é uma medida da diferença entre as médias como fração do desvio padrão dos grupos (28).

Esperou-se rejeitar a hipótese estatística formulada, provando que existe diferença nos níveis laboratoriais de interleucinas entre os grupos. Portanto, considerou-se que o ES poderia adquirir valores a partir de zero, formulando-se dois valores hipotéticos: ES=0,2 (ES “pequeno”, pouca diferença entre as médias dos grupos) e ES=0,8 (ES “grande”, maior diferença entre as médias). Esta hipótese foi testada com três situações distintas:

1. Considerando-se a existência de dois grupos na amostra, controles e casos + suspeitos, utilizou-se teste t para compará-los, e os valores obtidos de poder do teste foram 0,29 e 0,995 para ES=0,2 e ES=0,8 respectivamente.

2. Considerando-se a existência de dois grupos na amostra, porém distribuídos de forma diferente, casos confirmados pela presença de germe em culturais e controles + suspeitos; os valores obtidos para o poder do teste de comparação de médias dos dois grupos foram 0,16 e 0,85 para ES=0,2 e ES=0,8 respectivamente.

3. Quando se consideram quatro grupos na amostra, é necessário a utilização de análise de variância para comparar as médias de interleucinas nos quatro grupos e, neste caso, o ES é uma função da distância entre a maior e a menor média do grupo, em relação ao desvio padrão “dentro” dos grupos. No cálculo do tamanho da amostra, foram analisadas duas situações com relação ao afastamento das médias verdadeiras dos quatro

grupos: as médias poderiam estar equidistantes (variabilidade intermediária), obtendo-se um poder do teste de até 0,93 (93% de confiabilidade) para um $ES=0,4$. Outra possibilidade seria as médias concentrarem-se nos extremos da amplitude (máxima variabilidade) e, neste caso, o poder do teste atinge 93% para um ES de 0,38.

Em função dos valores obtidos, concluiu-se que a amostra coletada ($n=117$) tem um poder suficiente para a comparação das médias, mesmo que a diferença nos valores das interleucinas não seja grande (ES pequeno) e os grupos se apresentem quantitativamente diferentes. O tamanho da amostra coletada foi testado respeitando-se rigorosamente a distribuição (n) dos casos nos quatro grupos da pesquisa.

5.5. VARIÁVEIS EM ESTUDO

Foram estudados síndrome séptica ou sepse presumível e sepse comprovada, caracterizando RNs infectados, e os resultados de análises laboratoriais rotineiras dos serviços de neonatologia comparativamente com novos testes laboratoriais, as citocinas.

Síndrome séptica ou sepse presumível: todos os RNs com sinais clínicos de infecção, porém com resultado de hemocultura, após 72 horas de incubação, com ausência de germes (19,43,88).

Foi considerado como sinal clínico de infecção a presença um ou mais sinais de, pelo menos, três categorias referidas a seguir ou duas destas categorias associado a um ou mais fatores de risco materno:

- Instabilidade térmica (três aferições de temperatura axilar em 24 horas), sendo hipotermia a taxa inferior a 36,5°C e hipertermia a taxa superior a 37,5°C (38).
- Apnéia, bradipnéia, gemência, taquipnéia, retrações esternais e subcostais, batimentos de asas nasais e cianose. Para taquipnéia considerou-se a frequência respiratória superior a 60 mpm, e pausas respiratórias foram diagnosticadas quando a frequência respiratória era inferior a 30 mpm, com cessação instantânea da respiração.
- Hipotonia e convulsões.
- Irritabilidade e letargia.
- Sintomas gastrintestinais, como distensão abdominal, vômitos, resíduo gástrico e dificuldade de aceitação alimentar (inapetência).
- Icterícia idiopática.
- Palidez cutânea, pele fria e sudorética, hipotensão e tempo de enchimento capilar superior a 3 segundos.
- Sinais de sangramento, com quadro clínico sugestivo de coagulação intra-vascular disseminada.
- Avaliação subjetiva: RN que “não parece estar bem”.

Os fatores de risco materno considerados no estudo foram todos os achados clínicos e laboratoriais da história materna e perinatal:

- Febre materna.
- Infecção do trato urinário suspeita ou comprovada.
- Infecções do trato genital, como corioamnionite, líquido amniótico fétido, leucorréia, herpes genital, papiloma vírus, febre periparto e hipertermia uterina.

Bolsa rota foi considerada como de risco quando superior a 18 horas (43).

Sepse comprovada: o diagnóstico de sepsis comprovada foi estabelecido somente quando uma bactéria sabidamente patogênica foi isolada de cultura de secreção do organismo (hemocultura, urocultura, exame bacteriológico de secreção traqueal e de ponta de catéter de artéria umbilical) (93).

As variáveis em estudo foram obtidas a partir de informações presentes nas ficha obstétrica e do RN, preenchidas rotineiramente no momento do nascimento, e de amostras de sangue coletadas dos RNs estudados. Nestas últimas foram realizadas as seguintes avaliações laboratoriais:

- *Leucograma:* leucopenia (menos de 5.000 leucócitos totais) e neutropenia (menos de 1.000 neutrófilos totais). Ambas estariam mais relacionadas à infecção neonatal do que leucocitose e neutrofilia. A relação $I/T \geq 0,2$ é definida como a relação entre os neutrófilos imaturos e os neutrófilos totais, sendo um dos parâmetros laboratoriais para o diagnóstico de sepsis neonatal (87,94). A análise laboratorial foi realizada na rotina do Laboratório de

Emergência do HCPA, sendo uma única bioquímica responsável pelo preparo e leitura das lâminas.

- *Plaquetas*: Sua análise foi processada no momento da coleta do leucograma. Trombocitopenia (menos de 100.000 plaquetas) é de valor preditivo na sepse neonatal precoce (43).
- *Interleucina-6* : a concentração plasmática da IL-6 foi determinada pelo método de ensaio enzimático quimioiluminescência, com *kit* específico R&D System (Míniapólis - USA), comercialmente disponível.
- *Fator de necrose tumoral- α* : a concentração do TNF- α foi medida pelo método de enzimoimunoensaio com *kit* disponível comercialmente.
- *Interleucina-1 β* : os níveis plasmáticos de IL-1 β foram determinados pelo método de ensaio enzimático quimioiluminescência, com os *kits* da R & D System, disponível comercialmente.
- *Hemocultura, exame de cultura de secreção traqueal, de secreção de cateter de artéria umbilical, e de secreção de pústulas.*

5.6. VARIÁVEIS CONTROLADAS

As variáveis controladas são listadas a seguir.

- Sexo

- Idade gestacional: considera-se prematuro o RN com idade gestacional pediátrica inferior a 37 semanas completas pelo método de Capurro ou Ballard (9,23).

- Peso de nascimento

- Classificação quanto ao peso e idade gestacional: RNs são classificados em pequenos para idade gestacional (PIG), adequados para idade gestacional (AIG) e grandes para idade gestacional (GIG), de acordo com a classificação de Battaglia E.C. & Lubchenco L.O., 1967.

- Índice de Apgar no 5º minuto de vida: valores de Apgar iguais ou inferiores a seis constituem asfixia perinatal.

- Tipo de parto: vaginal, vaginal com necessidade de fórceps e cesáreo.

- Uso de antibioticoterapia materna no parto.

5.7. LOGÍSTICA

O estudo foi executado na Unidade de Neonatologia do HCPA, incluindo todos os RNs nos primeiros cinco dias de vida, sem uso prévio de antibioticoterapia, nos quais houvesse sido coletado sangue para hemograma e hemocultura a critério do médico assistente, ou seja, os RNs deveriam apresentar alguma suspeita clínica de infecção (mesmo não preenchidos os critérios) para justificar a coleta laboratorial.

Os pacientes eram acompanhados quanto à necessidade de antibioticoterapia, resultados de hemoculturas e demais testes culturais e tinham seus prontuários revisados quanto ao uso pela mãe de antimicrobianos no periparto. Desta forma a amostra dos pacientes estudados foi constituída pelos seguintes grupos:

Grupo I : RNs com sepse comprovada, ou seja, associação de alteração clínica e resultados positivos de hemocultura ou outro exame de cultura de secreções do organismo (n=13).

Grupo II : RNs com sepse presumível ou síndrome séptica, com suspeita clínica de infecção presente (conforme critérios anteriormente estabelecidos), mas sem presença de germe em culturas (n=36).

Grupo III : RNs com sepse presumível ou síndrome séptica, com suspeita clínica de infecção, e ausência de germe em culturas, mas com uso materno de antibioticoterapia periparto (n=17).

Grupo IV : RNs com alguma suspeita clínica inicial de sepse, sem, no entanto, necessidade de antibioticoterapia para melhorarem e com ausência de germe em hemocultura e demais exames culturais (n= 51).

Nos quatros grupos foi coletado sangue adicional ao solicitado pelo médico assistente, para dosagem dos mediadores da resposta inflamatória aguda, que foi estocado e congelado para avaliação posterior pela pesquisadora. Todos os exames foram realizados no Laboratório de Pesquisa Biomédica do HCPA com supervisão e orientação do Prof. Jarbas Oliveira.

Exame de hemocultura e outros exames culturais realizados na rotina do Serviço de Microbiologia do HCPA, foram posteriormente protocolados pela pesquisadora para análise e divisão entre os grupos. O hemograma solicitado pelo médico assistente foi o mesmo utilizado para este estudo, sem implicar coleta de sangue específica para a pesquisa. As amostras de sangue foram devidamente identificadas, encaminhadas à rotina do hospital, sendo processadas no Laboratório de Emergência do HCPA, com a colaboração de um profissional que procedeu a todas as análises dos hemogramas. O mesmo não conhecia a história clínica dos pacientes nem o posterior resultado das hemoculturas e das interleucinas dosadas.

As hemoculturas foram acompanhadas, quanto ao crescimento de germe, até 72 horas após sua incubação em meio de cultura pela equipe do laboratório de microbiologia.

Os familiares ou responsáveis foram consultados para autorização de coleta de sangue adicional, em uma mesma amostra de sangue. Cada RN tinha uma ficha-protocolo com seus dados de identificação, sexo, idade gestacional, peso de nascimento, escores de Apgar,

com sinais clínicos preenchidos, fatores de risco materno e perinatais, dados maternos quanto ao uso de antibiótico, tempo de antibioticoterapia pré-parto, antimicrobiano empregado e sua indicação.

5.7.1. TÉCNICA DE COLETA DE SANGUE

Na coleta eram retirados no máximo 3,2 ml de sangue, ficando 1 ml em frasco com EDTA para análise de leucograma; 1,2 ml em outro frasco contendo EDTA para análise das citocinas e 1 ml para hemocultura em meio aeróbico e anaeróbico.

Dentro de no máximo trinta minutos, o sangue destinado às dosagens de IL-6, TNF- α e IL-1 β era centrifugado a 5.000 rotações por minuto, e o plasma armazenado em 1 tubo Eppendorf, identificado com o número do paciente e congelado a -70°C.

A inoculação do sangue no frasco de hemocultura foi procedida imediatamente após a coleta; o frasco foi adequadamente vedado, utilizando-se meio de cultura para germes aeróbicos e anaeróbicos. Para a coleta utilizou-se venopunção ou catéter de artéria umbilical, este último procedimento realizado pela pesquisadora, cuidando-se de respeitar normas de assepsia como correta higiene das mãos do coletador e do local de obtenção do sangue.

5.7.2. MÉTODO BIOQUÍMICO EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS

5.7.2.1. Interleucina-6

Os níveis plasmáticos de IL-6 foram determinados pela técnica de enzimoimunoensaio com *kit* R & D Systems, (Quantikine Human IL-6, R & D Systems, Inc. MN, USA) cujo limite de detecção é 0,7 pg/ml e coeficientes de variação intra e interensaios inferiores a 5%. O *kit* contém 96 pocinhos, sendo 7 destinados ao desenvolvimento de uma curva padrão (figura 2), realizada em duplicata, da mesma forma que as amostras de plasma.

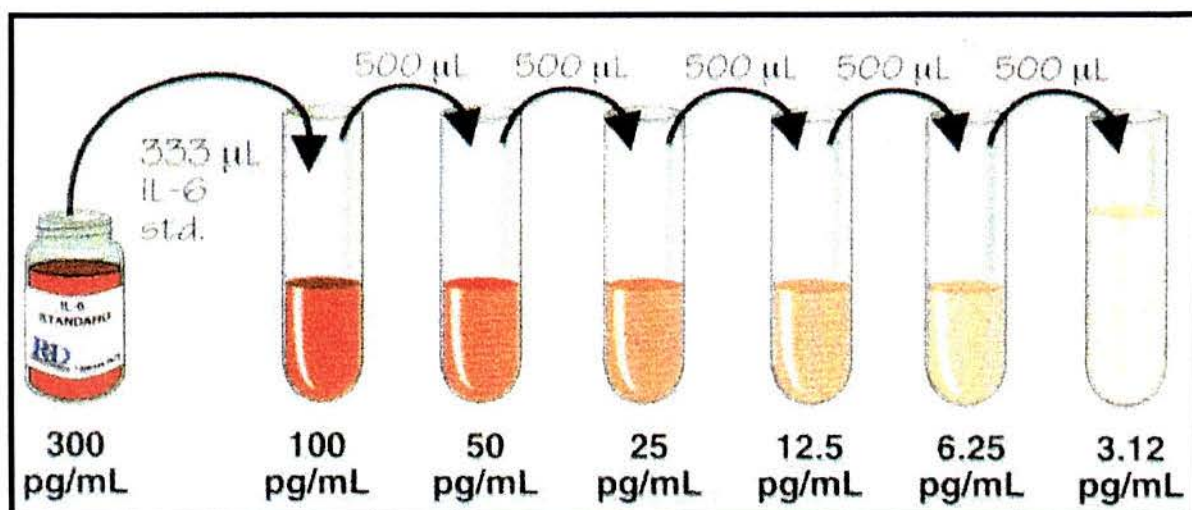


Fig. 2 - Curva padrão para Interleucina-6

O princípio do desenvolvimento da técnica é baseado em uma reação do tipo antígeno-anticorpo. Pipetaram-se 100 µl de RD1A (diluyente com ação tampão da reação)

em cada pocinho contendo previamente um anticorpo monoclonal específico para IL-6. Em seguida eram adicionados 100 µl de amostras de plasma ou de soluções-padrão em cada pocinho, incubando-se durante 2 horas. Após lavagem de qualquer substância não-ligada, eram adicionados em cada um deles 200 µl de um conjugado composto por uma enzima ligada a um anticorpo policlonal específico para IL-6, procedendo-se a nova incubação durante 2 horas e lavagem. Em cada pocinho eram acrescentados 200µl de uma solução substrato previamente preparada com a mistura de dois reagentes responsáveis pelo desenvolvimento da coloração da reação. A seguir eram mantidos por 20 minutos em incubação, adicionando-se então a solução *stop*. Dentro de 30 minutos, a intensidade da cor era medida pelo método ELISA. Todo procedimento dispndia aproximadamente 6 horas.

5.7.2.2. Fator de neucrose tumoral- α

Para determinar os níveis plasmáticos de TNF- α foi adotada a técnica de enzimoimunoensaio com *kit* R & D Systems, (Quantikine Human TNF- α , R & D Systems, Inc. MN, USA) com limite de detecção de 4,4 pg/ml e precisões intra e interensaios inferiores a 6 %. As placas eram compostas de 96 pocinhos e, para o desenvolvimento da curva padrão, foram necessários 7 deles (figura 3). Todos os testes foram realizados em duplicata.

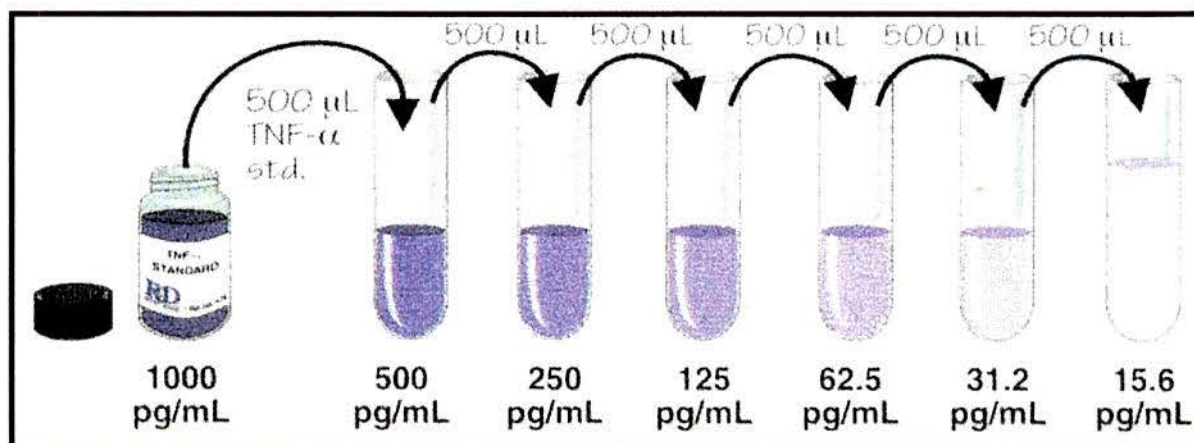


Fig. 3 - Curva padrão para Fator de necrose tumoral- α

O princípio da técnica também é o de uma reação antígeno-anticorpo. Um anticorpo monoclonal específico para o TNF- α estava pré-colocado nos pocinhos, e amostras e padrões foram pipetados em cada um deles. Qualquer TNF- α presente ficava ligado e imobilizado pelo anticorpo. Procedia-se a um período de incubação de 2 horas, lavagem e adição de um conjugado enzima-anticorpo específico TNF- α , com nova lavagem para remover qualquer anticorpo-enzima não-ligado. Era adicionada uma solução substrato, incubando-se por 20 minutos antes de colocar a solução *stop* e observar o desenvolvimento e intensidade da cor da reação. O tempo total utilizado para dosagem e leitura era de aproximadamente 6 horas.

5.7.2.3. *Interleucina-1 β*

Para a determinação quantitativa das concentrações plasmáticas de IL-1 β foi utilizada a técnica de enzimoimunoensaio com *kit* comercialmente disponível (Quantikine Human IL-1 β , R&D Systems, Inc. MN, USA), que apresenta um limite de detecção de 0,3 pg/ml e um coeficiente de variação intra e interensaio inferior a 5%. O *kit* contém uma placa com 96 pocinhos (= 96 testes), sendo 14 destinados ao desenvolvimento de uma curva-padrão com 7 pontos em duplicata (figura 4). Da placa contendo um anticorpo específico para IL-1 β eram pipetados 50 μ l de reagente RD1C, reagente composto de uma proteína básica com função preservativa da reação. Amostras de 200 μ l de plasma ou solução-padrão eram colocadas em cada pocinho, e qualquer IL-1 β presente poderia ligar-se ao anticorpo imobilizado durante um período de incubação de 2 horas em temperatura ambiente, durante o qual a placa ficava coberta com uma fita adesiva. Após, todos os pocinhos eram aspirados e lavados 5 vezes, para retirar qualquer substância não-ligada que pudesse interferir na reação, pipetando-se em cada um deles 200 μ l de uma solução conjugada de IL-1 β , que é um anticorpo policlonal específico contra IL-1 β . Em seguida cobria-se a placa novamente com fita adesiva por um período de incubação de mais 2 horas. Seguindo-se nova aspiração e mais 5 lavagens com o objetivo de remover qualquer complexo anticorpo-enzima não-ligado, antes de se adicionarem 200 μ l de uma solução substrato em cada pocinho, incubando-se durante 20 minutos, para após acrescentar uma solução *stop*. Durante esse período há desenvolvimento de uma coloração na mesma proporção e intensidade da quantidade de IL-1 β que reage na fase inicial do processo. O desenvolvimento da cor é uniformemente interrompido pela solução *stop*, e a intensidade da reação medida pela

intensidade da cor. A leitura era realizada dentro de 15 minutos; todo o procedimento dispndia seis horas.

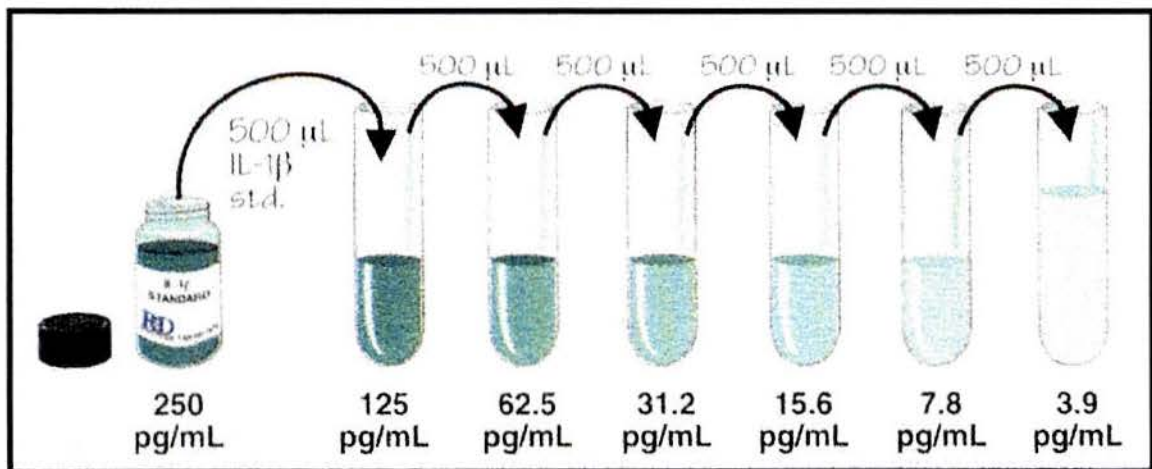


Fig. 4 - Curva padrão para Interleucina-1β

Para a leitura das placas dos *kits* de IL-6, TNF- α e IL-1 β foi empregado o aparelho *Behring Elisa Data Analysis Software* que forneceu os dados em números absolutos de acordo com a absorbância das reações.

Foi criado um programa de computador baseado em função polinomial de base 4, com a finalidade específica de criar uma curva padrão reduzida para cada placa dos diferentes *kits*, transformando, desta forma, valores obtidos em densidade óptica em concentrações dadas em pg/ml.

5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizado o cálculo das médias e dos desvios padrões de todos os dados obtidos a partir da amostra. Em algumas situações a mediana foi mais representativa dos dados, devido à assimetria da variável considerada.

Na análise dos dados foram utilizados os testes t de Student para amostras independentes e, nas situações de assimetria, o teste de Mann-Whitney. Em tabelas cruzadas foram empregados os testes Qui-quadrado e exato de Fisher.

Para comparar os quatro grupos entre si e verificar a hipótese de que os grupos I, II e III eram semelhantes e diferiam do grupo IV (controles), foi utilizado o teste de Mann-Whitney sequencialmente e teste de Kruskal-Wallis para comparar os valores de medianas das citocinas nos quatro grupos estudados.

Nas proporções (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo), foram calculados os percentuais com intervalos de confiança determinados pela distribuição quadrática de Fleiss.

A curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) foi obtida plotando-se a sensibilidade no eixo Y e a taxa de resultados falso-positivos (1-especificidade) no eixo X para todos os possíveis valores de ponto de corte, determinando-se o ponto de corte mais adequado para IL-6 e TNF- α .

A razão de chances (OR) foi empregada para verificar a acurácia diagnóstica das citocinas IL-6 e TNF- α como preditoras de sepse neonatal precoce.

O nível de significância estatística aceito foi de $\alpha= 0,05$. O programa estatístico empregado na análise foi o SPSS (*Statistical Package for Social Science*).

5.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Toda pesquisa realizada em seres humanos visa o mínimo de intervenções possível. Portanto, os RNs não foram puncionados exclusivamente para a pesquisa, foi obtido amostra de sangue adicional ao solicitado pela equipe médica assistencial. O volume máximo coletado foi 1 ml/kg, que correspondeu a 1,2% da volemia do RN. Constitui-se em pesquisa com risco mínimo quando o volume de sangue extraído do RN é no máximo 2% de sua volemia (81).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através da Comissão Científica e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, com o número 0120/95.

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

Ao todo, integraram o estudo 117 RNs, dos quais 66 apresentavam sepse comprovada ou síndrome séptica, e 51 eram saudáveis.

Os RNs infectados (n=66) constituíram três grupos, de acordo com a presença de germe em testes culturais e o uso de antibioticoterapia no periparto:

Grupo I: sepse clínica com cultura positiva, sem uso de antibioticoterapia materna no periparto (n=13).

Grupo II: sepse clínica com cultura negativa, sem uso de antibioticoterapia materna no periparto (n = 36).

Grupo III: sepse clínica com cultura negativa, com uso de antibioticoterapia materna no periparto (n= 17).

Os RNs saudáveis formaram o Grupo IV (n=51).

As características clínicas dos grupos estudados quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, tipo de parto e escore de Apgar estão resumidas na tabela 1.

TABELA 1 - Características clínicas da população estudada

CARACTERÍSTICAS	GRUPO I n = 13	GRUPO II n = 36	GRUPO III n = 17	GRUPO IV n = 51
Peso de nascimento (gramas)	2825 ± 267	2958 ± 125	2762 ± 237	3182 ± 621
Idade gestacional (semanas)	37,4 ± 1,1	37,1 ± 0,3	36,4 ± 1,1	39,1 ± 1,8
Tipo de parto				
vaginal	8(61,5%)	22(61,1%)	10(58,8%)	25(49,0%)
vaginal + fórceps	0	0	1 (6,0%)	6(12,0%)
cesáreo	5(39,5%)	14(39,9%)	6(35,2%)	20(39,0%)
Apgar 5º minuto	9(7-10)	9(3-10)	9(4-10)	9(6-10)

As médias dos pesos de nascimento entre os grupos não foram estatisticamente diferentes ($p=0,298$). Quanto à idade gestacional, as médias dos grupos I, II e III são semelhantes, mas diferentes das do grupo IV ($p=0,0466$). O parto vaginal foi o tipo predominante, sendo de 61% nos grupos I e II, de 58,8% no grupo III e de 49% no grupo IV. Parto vaginal com fórceps ocorreu apenas nos grupos III e IV, em 1 e 6 casos

respectivamente. A percentagem de parto cesáreo foi de 39% nos grupos I, II e IV e de 35% no grupo III. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao tipo de parto ($p=0,773$). O escore de Apgar no 5º minuto nos quatro grupos estudados apresentou exatamente a mesma mediana, mas amplitudes de variação diferentes entre os grupos.

Staphilococcus aureus foi o germe mais frequentemente encontrado em todas as culturas dos RNs do Grupo I e em dois pacientes, presente em mais de uma cultura (tabela 2). O material para hemocultura foi coletado juntamente com o dos demais exames de laboratório, sendo, na sua maioria, nas primeiras 24 horas após o nascimento (82,9%). O crescimento bacteriano foi observado, em média, 3 dias após coleta do material. Treze RNs tiveram exames culturais positivos: 5 (40%) nas primeiras 24 horas de vida, 3 (23%) antes de se completarem 72 horas, 2 no 4º dia de vida, outros 2 no 5º dia e finalmente, 1 no 6º dia de vida .

TABELA 2 - Germes encontrados nas culturas dos recém-nascidos (Grupo I)

GERMES	HEMO*	CULT.UMB**	CULT.PUST.***
<i>Staphilococcus aureus</i>	7	1	2
<i>Staphilococcus coagulase negativa</i>	1	0	0
<i>Streptococcus β</i> hemolítico grupo B	2	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	1	0
Bacilo gram-negativo oxidase negativa	1	0	0

* Hemocultura

** Cultural de secreção umbilical

*** Cultural de secreção de pústula

A avaliação de parâmetros laboratoriais comumente utilizados como coadjuvantes para o diagnóstico de sepse neonatal precoce não evidenciou diferença significativa entre os quatro grupos. Foram estudadas as seguintes variáveis: leucograma, considerando-se como leucopenia valores inferiores a 5.000 leucócitos e como leucocitose valores superiores a 25.000 leucócitos; relação I/ T \geq 0,2 (relação entre o número de neutrófilos imaturos e o número total de neutrófilos); neutropenia, quando o número total de neutrófilos fosse inferior a 1.000 e a contagem de plaquetas inferior a 100.000, trombocitopenia. Um número reduzido de RNs apresentou alguma dessas alterações laboratorias (tabela 3).

Os mediadores de resposta inflamatória aguda estudados, IL-6, TNF- α e IL-1 β têm seus valores apresentados em mediana e amplitude de variação em cada grupo na tabela 3. Não foi observada diferença significativa nos níveis de IL-6, TNF- α e IL-1 β entre os grupos I, II, e III. Com relação ao grupo IV, os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α foram significativamente diferentes dos demais grupos estudados ($p=0,000001$). No que se refere a IL-1 β , não houve diferença estatística entre RNs do grupo IV comparados com os dos grupos I, II e III ($p= 0,7511$).

TABELA 3 - Dados laboratoriais da população estudada

Dados Laboratoriais	GRUPO I n = 13	GRUPO II n = 36	GRUPO III n = 17	GRUPO IV n = 51
Leucócitos				
< 5.000	2 (15,4%)	0	2(11,8%)	0
> 25.000	0	2 (5,6%)	0	3 (5,9%)
I/T \geq 0,2	1 (7,7%)	9 (25%)	6 (35,3%)	5 (9,8%)
Neutrófilos < 1.000	0	0	1 (5,9%)	0
Plaquetas < 100.000	2 (15,4%)	2 (5,6%)	1 (5,9%)	2 (3,9%)
IL-6 *	60,58 (29,7-3000)	82,89 (14,4-3000)	126,26 (20,2-3000)	38,64 (1,08-283,8)
TNF- α *	33,79 (11,57-380,04)	20,91 (10,62-59,5)	20,89 (9,72-2516,28)	14,98 (6,94-50,14)
IL-1 β	6,08 (2,66-193,43)	6,67 (0,49-350,17)	3,12 (1,66-1270,52)	5,66 (0,88-35,70)

* p = 0,00001

* Kruskal-Wallis

Como o comportamento dos parâmetros clínicos e laboratoriais dos grupos I, II e III não mostrou diferença estatisticamente significativa, foi possível agrupá-los em RNs infectados (n= 66) e compará-los com os não-infectados (n=51).

A média do peso de nascimento no grupo de RNs sépticos foi de 2881 g e, nos controles, de 3182 g , não ocorrendo diferença estatística (p= 0,074). A idade gestacional média no grupo com sepse foi de $37 \pm 3,95$ semanas, não apresentando diferença

estatisticamente significativa entre o grupo controle, cuja idade gestacional média foi de $39,1 \pm 1,84$ semanas ($p= 0,084$). A mediana de Apgar no 5º minuto não foi diferente entre os grupos. O tipo de parto dominante foi o vaginal, ocorrendo em 60,6% dos RNs sépticos e em 49% dos não sépticos, sem diferença significativa entre os dois grupos ($p= 0,288$).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto aos índices laboratoriais (leucopenia, leucocitose, relação I/T, neutropenia e trombocitopenia).

O valor de mediana para IL-1 β no grupo com sepse foi de 4,93 pg/ml e, nos controles, de 5,66 pg/ml, não se observando diferença significativa ($p=0,733$). IL-6 apresentou mediana de 86,9 pg/ml no grupo de RNs sépticos e de 38,64 pg/ml nos não sépticos ($p =0,00001$). TNF- α apresentou mediana de 21,52 pg/ml nos RNs infectados, no entanto, a mediana obtida com os controles foi 14,98 pg/ml. IL-6 e TNF- α foram os únicos parâmetros laboratoriais que demonstraram diferença estatisticamente significativa entre RNs infectados e não-infectados. Estes achados encontram-se sumarizados na tabela 4.

TABELA 4 - Comparação entre recém-nascidos infectados (Grupos I, II e III) e controles (Grupo IV)

Características	GRUPOS I, II e III n = 66	GRUPO IV n = 51
Peso nascimento (gramas)	2881 ± 848	3182 ± 621
Idade gestacional (semanas)	37,0 ± 3,95	39,1 ± 1,84
Tipo de Parto		
Vaginal	40 (60,6%)	25 (49,0%)
Vaginal + fórceps	1 (6,6%)	6 (12,0%)
Cesáreo	25 (32,8%)	20 (39,0%)
Apgar 5º minuto	9 (3-10)	9 (6-10)
Leucócitos		
< 5.000	4 (6,06%)	0
> 25.000	3 (3,03%)	3 (5,90%)
I/T ≥ 0,2	16 (24,20%)	5 (9,80%)
Neutrófilos < 1.000	1 (1,51%)	0
Plaquetas < 100.000	5 (7,6%)	2 (3,9%)
IL-6 (pg/ml)*	86,9 (14,4-3000)	38,64 (1,08-283,8)
TNF-α (pg/ml)*	21,52(1,57-2516,2)	14,98(6,94-50,1)
IL-1β (pg/ml)	4,93 (0,49-1270,5)	5,66 (0,88-35,7)

*p < 0,0001

*Kruskal-Wallis

6.2. MEDIADORES DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA

A grande maioria dos RNs tiveram seu sangue coletado para avaliação dos níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α e IL-1 β nas primeiras 24 horas de vida (82,9%); entre 24 e 48 horas foram coletadas 7,69% das amostras e, entre 48 horas e o 5º dia de vida, as dos restantes 9,4% dos RNs (figura 5).

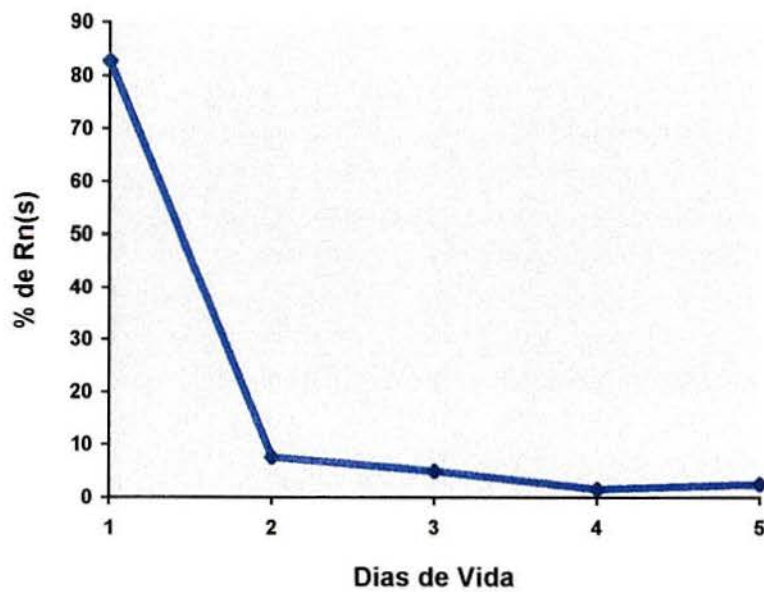


Fig. 5 - Momento da coleta de sangue dos RNs para análise das citocinas

6.2.1. INTERLEUCINA-6

Os níveis plasmáticos de IL-6 foram significativamente mais elevados nos grupos I, II e III, quando comparados tanto em conjunto quanto isoladamente com o grupo IV ($p=0,0001$). A ilustração IL-6 e infecção neonatal expressa os valores em mediana para cada grupo, sendo que o Grupo III apresentou o valor mais elevado (figura 6).

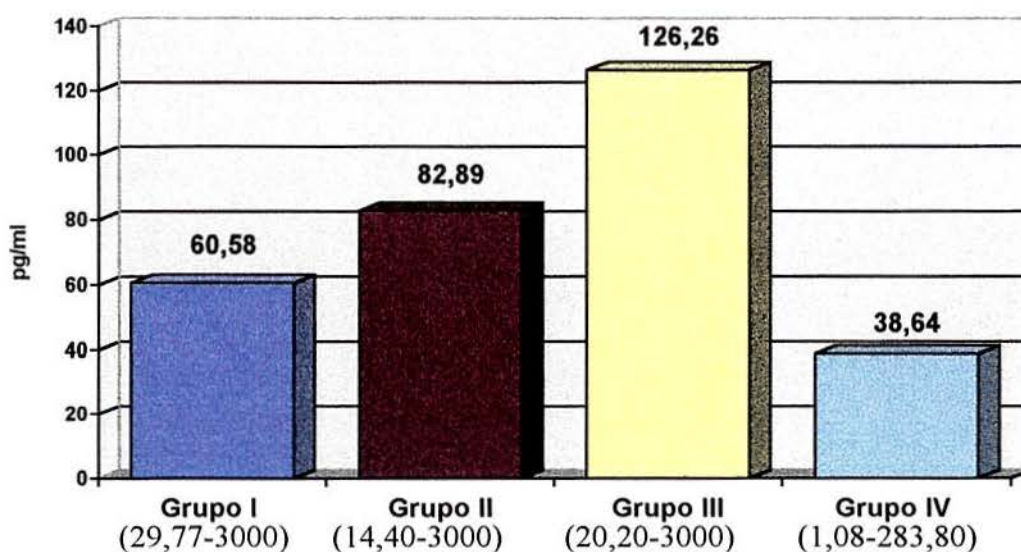


Fig. 6 - Interleucina-6 e infecção neonatal

6.2.2. FATOR DE NECROSE TUMORAL α

Houve diferença significativa entre os grupos estudados ($p=0,0001$). Os RNs com maiores valores laboratoriais para TNF- α são os do grupo I (mediana= 33,79 pg/ml), sem, contudo, haver diferença estatisticamente significativa entre eles e os dos grupos II e III. A diferença observada foi entre os grupos I, II e III quando comparados com os controles

(grupo IV). Abaixo estão demonstrados os valores de mediana do TNF- α em cada grupo (figura 7).

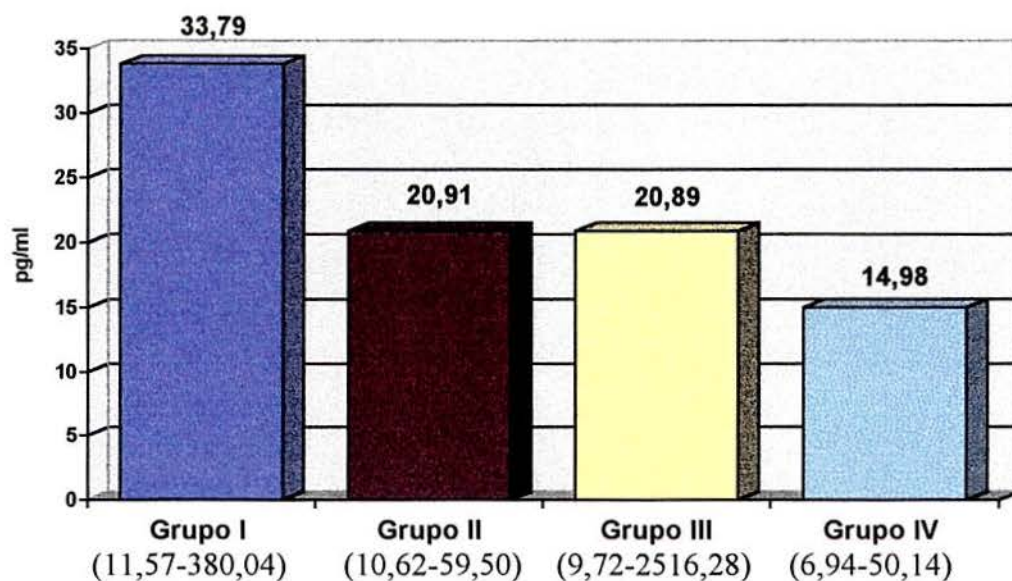


Fig. 7 - Fator de necrose tumoral- α e infecção neonatal

6.2.3. INTERLEUCINA-1 β

As medianas dos valores de IL-1 β dos quatro grupos não foram estatisticamente diferentes ($p=0,7511$). RNs do Grupo III tiveram seus valores inferiores aos do Grupo controle (figura 8).

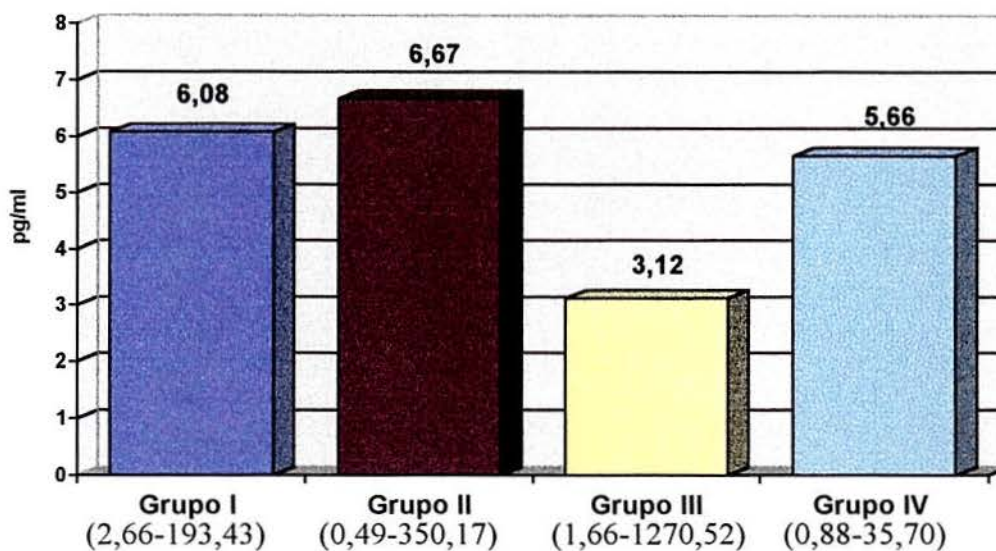


Fig. 8 - Interleucina-1 β e infecção neonatal

6.2.4. CITOCINAS E A RESPOSTA FEBRIL DO RECÉM-NASCIDO

Os RNs foram avaliados quanto à resposta febril, analisando-se os níveis de IL-6, TNF- α e IL-1 β dicotomizados para a presença ou não de febre. Dos 117 RNs estudados, 45 (38,46%) apresentaram-se com febre.

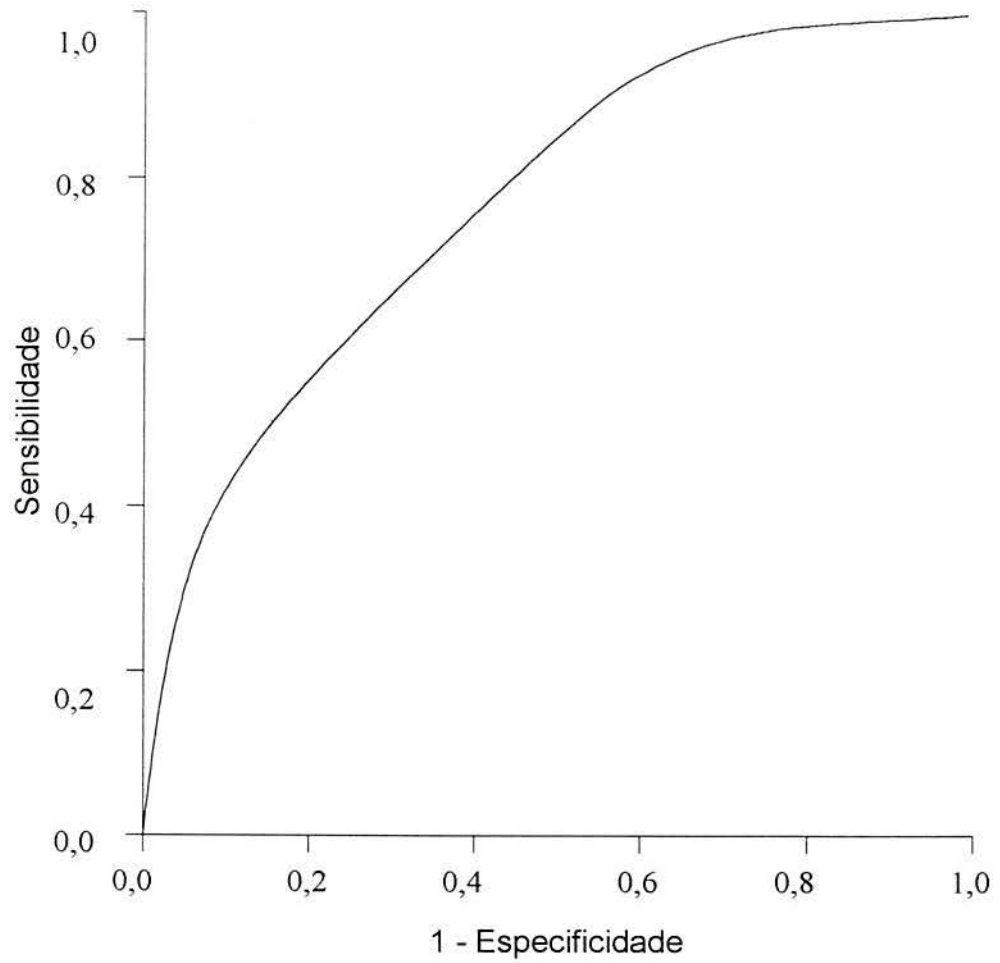
Os níveis plasmáticos de IL-6 em RNs com febre apresentaram mediana de 557,8006 pg/ml, e nos sem febre o valor de mediana obtido foi 217,6999 pg/ml. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,0401$).

Analisando os valores de TNF- α nos RNs com febre, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa em relação aos sem febre ($p=0,0814$). Os valores de mediana obtidos foram 78,0405 pg/ml e 24,498 pg/ml respectivamente.

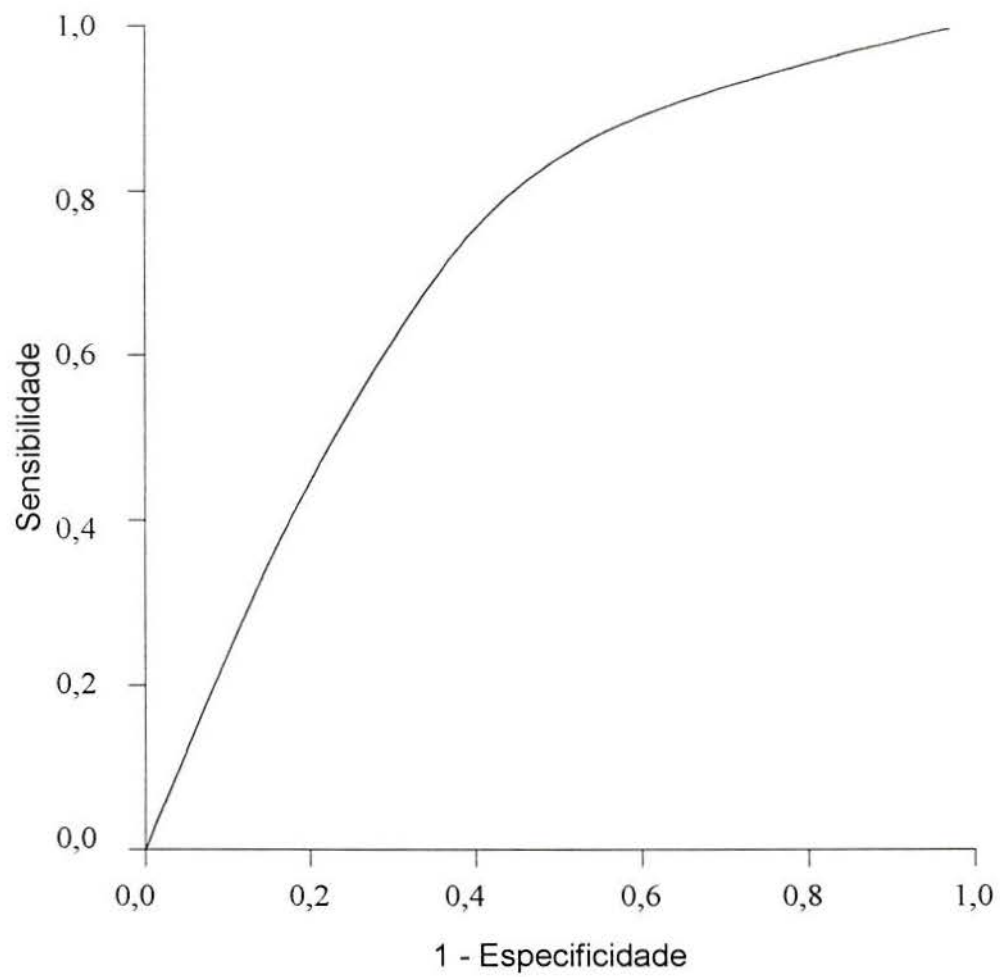
O valor de mediana para IL-1 β nos RNs com febre foi de 53,1767 pg/ml e nos sem a presença de febre a mediana foi 5,7971 pg/ml, assim, os níveis de IL-1 β foram significativamente mais elevados nos RNs com febre ($p=0,001$).

6.3. CURVA ROC - RECEIVER OPERATING CHARACTERISTICS

Como IL-6 e TNF- α mostraram-se significativamente diferentes nos RNs com sepsis em relação aos controles, foram construídas curvas ROCs para estes mediadores. Todos os valores possíveis de IL-6 foram utilizados a fim de estabelecer o melhor ponto de corte. O ponto de corte ótimo obtido a partir de uma curva ROC para IL-6 foram valores iguais ou superiores a 32 pg/ml (figura 9). O ponto de corte ideal para IL-6 e TNF- α deve ser um valor capaz de detectar quase todos os casos verdadeiramente positivos (alta sensibilidade), com o menor risco de resultados falso-positivos (alta especificidade). Para TNF- α este valor correspondeu a 12 pg/ml (figura 10). A seguir encontram-se ilustradas as curvas ROCs para os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α .



**Fig. 9 - Curva ROC (*receiver operating characteristics*)
para os níveis plasmáticos de IL-6**



**Fig. 10 - Curva ROC (*receiver operating characteristics*)
para os níveis plasmáticos de TNF- α**

6.4 ANÁLISE DO VALOR DIAGNÓSTICO DE IL-6 E TNF- α

Com um ponto de corte de 32 pg/ml para IL-6, a sensibilidade obtida foi de 90%, e a especificidade de 43%; o valor preditivo positivo foi de 67,4% e o valor preditivo negativo foi de 78,6%. Com relação ao TNF- α , o ponto de corte de 12 pg/ml forneceu uma sensibilidade de 87,9% e uma especificidade de 43%. Os valores preditivos positivo e negativo foram, respectivamente de 66,7% e 73,3%. Combinando os valores de pontos de corte de IL-6= 32 pg/ml e de TNF- α = 12 pg/ml, a sensibilidade aumentou para 98,5% (tabela 5).

TABELA 5 - Valor diagnóstico de IL-6 e TNF- α na admissão de recém-nascidos com sepse neonatal precoce

TESTES	IL-6	TNF- α	IL-6 E/OU TNF- α
SENSIBILIDADE	90%	87,9%	98,5%
VPP *	67,4%	66,7%	60,7%
VPN **	78,6%	73,3%	90%
1-VPN	21,4%	26,7%	10%
ODDS RATIO	7,59	5,50	13,93
	(2,55-23,65)***	(2,01-15,45)***	(1,69-304,22)***

* VPP = VALOR PREDITIVO POSITIVO

** VPN = VALOR PREDITIVO NEGATIVO

*** INTERVALO DE CONFIANÇA

Frente a qualquer um dos testes negativos, a probabilidade de o RN ainda estar com sepse foi de 10%, com os testes usados de forma combinada. Quando utilizados isoladamente, no caso de IL-6, 21% dos RNs ainda teriam chance de se apresentar com sepse mesmo com teste negativo. No caso de TNF- α , 26% dos RNs poderiam estar sépticos após um resultado negativo (tabela 5).

7. DISCUSSÃO

7.1. HIPÓTESE OPERACIONAL

Considerando as dificuldades diagnósticas e as altas taxas de mortalidade por sepse neonatal precoce, que variam de 15% a 50% na maioria dos estudos (93), torna-se evidente a necessidade de um marcador precoce e de valor preditivo no diagnóstico desta patologia.

O manejo adequado do RN com sepse depende do diagnóstico precoce e da imediata instituição de terapêutica antimicrobiana, entretanto os achados clínicos são sutis e inespecíficos, podendo retardar o diagnóstico clínico. Quanto à avaliação laboratorial, há testes utilizados rotineiramente em RNs com suspeita clínica de sepse: leucograma e índices leucocitários (leucopenia, relação I/T), PCR, VHS, hemocultura e demais testes culturais de líquidos e secreções do organismo. Philip e colaboradores (87) encontraram índices elevados de sensibilidade e especificidade com quaisquer dois ou mais destes testes alterados, quando utilizados em associação. Outros estudos, porém, têm observado a demora destes testes, rotineiramente utilizados, em mostrarem alterações diante de um quadro de sepse (43,94,102,113). Mathers e Pohlhandt (71), por exemplo, encontraram

sensibilidade de 16% quando a PCR estava acima de 1,0 mg/dl na admissão de um quadro inicial de sepse, mas que aumentou para 92% após 24 horas.

Como as citocinas são sintetizadas e secretadas em resposta a estímulos inflamatórios, por monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, a hipótese operacional testada foi que IL-6, TNF- α e IL-1 β são indicadores mais precoces de sepse neonatal precoce do que outras proteínas de fase aguda anteriormente estudadas, pois reagem mais rapidamente após instituição do processo inflamatório agudo (3,19,32,33,36,49,74).

Em estudo realizado por Buck e colaboradores (19), foram comparados os níveis plasmáticos de IL-6 e PCR no momento da suspeita diagnóstica de infecção (admissão) e 24 horas após início de antibioticoterapia. IL-6 apresentou maior sensibilidade (S= 73%) que PCR (S= 58%) na admissão de RNs infectados. Ambos os testes, quando utilizados em conjunto, obtiveram sensibilidade de 100% em RNs com sepse comprovada e presumível. Em pesquisas anteriores, foi avaliada a produção de IL-6 em crianças com hemocultura com presença de germe, tendo sido encontrados níveis elevados de IL-6 em relação aos controles (55).

Interleucina-6 é importante na produção e liberação hepática de PCR. O pico plasmático de PCR ocorre 24 horas após a liberação máxima de IL-6, persistindo com níveis elevados nas primeiras 48 horas, apesar da melhora clínica (55). No presente trabalho, não foi possível compararmos PCR e IL-6, devido ao pequeno volume de sangue disponível. Optamos por coletar o menor volume aceito eticamente como pesquisa de risco mínimo em RNs (81). Quanto aos demais reagentes de fase aguda, em alguns casos obtivemos dosagens de VHS, mas preferimos não incluí-los na análise, a fim de não

estratificar a amostra e reduzir sua confiabilidade. Além disso, estudos anteriores demonstraram que VHS isoladamente apresentou baixa sensibilidade (27%), com valor máximo de sensibilidade obtido de 50% (44,87,102).

Treluyer e colaboradores (114), estudaram o valor diagnóstico de PCR, VHS e fibrinogênio em RNs com sepse precoce e tardia comprovadas, comparando-os com testes bacteriológicos, como aspirado gástrico, detecção de antígenos e cultura de fezes e de secreção de coto umbilical. Os testes bacteriológicos demonstraram melhor sensibilidade que os bioquímicos. Todos os RNs de nosso estudo que apresentaram qualquer secreção, fosse de coto umbilical, aspirado traqueal, aspirado gástrico ou de pústulas, realizaram exame bacteriológico das secreções.

7.2. METODOLOGIA DO ESTUDO

Em um estudo de coorte, é fundamental o adequado acompanhamento dos casos quanto ao seus desfechos clínicos. Eventuais exclusões de integrantes da amostra em estudo podem se fazer necessárias. Durante o período da pesquisa obtivemos 151 casos de suspeita clínica de sepse neonatal precoce. No entanto 34 RNs foram excluídos: 4 porque os familiares não autorizaram a coleta de sangue adicional; 16 por não ter a bioquímica realizado a análise dos hemogramas; 7 foram classificados como controles e, ao acompanhá-los, necessitaram reinternação por febre, disfunção respiratória ou vômitos em no máximo 1 semana após a alta hospitalar; 3 por serem filhos de mães com história de

drogadição, tendo-se posteriormente confirmado a soropositividade para o vírus HIV; 1 por apresentar microcefalia; 2 por terem mães com VDRL reagente; e, finalmente, 1 por suspeita de hepatite B, cuja segunda hemocultura foi positiva com 7 dias de vida. Houve preocupação em evitar potenciais vícios de seleção da amostra, considerando-se no estudo somente casos prováveis de sepse neonatal precoce de origem bacteriana. Os controles foram obtidos mediante acompanhamento individualmente dos casos quanto à necessidade de antibioticoterapia para resolução da clínica, e somente permaneceram no grupo controle os RNs que, após rigoroso acompanhamento, receberam alta hospitalar sem necessidade de antibiótico e sem outras variáveis clínicas que pudessem distorcer os nossos resultados. Para minimizar vícios de seleção, os controles tinham a mesma probabilidade de exposição e foram provenientes da mesma população que os casos.

Os pacientes não foram selecionados por critérios bioquímicos ou bacteriológicos, visto que o enfoque principal do estudo é o diagnóstico precoce de sepse neonatal precoce estabelecido por testes laboratoriais. Portanto, a seleção dos RNs para cada grupo foi procedida mediante acompanhamento para a presença de sinais clínicos do RN e de fatores de risco materno, da necessidade de antibioticoterapia para melhora dos sinais clínicos e do acompanhamento quanto ao crescimento bacteriano em culturas. O estabelecimento de regras cuidadosas para decidir a ocorrência do desfecho clínico (sepse comprovada ou presumível) e a obediência a elas minimizaram vícios de aferição.

Houve o cuidado de numerar cada paciente seqüencialmente, sem o conhecimento do grupo a que pertenceria; a bioquímica que analisou os hemogramas desconhecia a clínica do RN, uma garantia a mais contra potenciais vícios de aferição. A variabilidade

interobservadores na análise de um teste de laboratório foi controlada, na medida em que todas as lâminas para realização dos hemogramas foram analisadas pelo mesmo profissional.

A divisão da amostra (n=117) em 4 grupos, mesmo que numericamente diferentes, mostrou aspectos que merecem ser comentados.

O grupo de casos (Grupo I), ou seja, com alguma cultura positiva para infecção (n=13), foi pequeno quando comparado com os demais. No entanto, o cálculo para tamanho mínimo de amostra evidenciou que este número seria suficiente mesmo para evidenciar uma diferença pequena nos valores de citocinas entre os grupos, e estes se apresentarem quantitativamente diferentes (28).

Os RNs com sepse presumível foram divididos em dois grupos (II e III), de acordo com o uso materno de antibioticoterapia no periparto, para com isto determinar se os níveis de interleucinas poderiam ser alterados em função desse. Integraram o grupo IV RNs com critérios bem definidos de ausência de doença, constituindo os controles. Esta divisão não é comumente encontrada na literatura que estuda os mediadores de resposta inflamatória aguda na sepse neonatal precoce. De Bont e colaboradores (32,33) quando estudaram IL-6, TNF- α e IL-1 β na sepse neonatal, definiram sepse como a presença de sinais clínicos e/ou hemocultura positiva, ou como a suspeita clínica associada a fenômenos inflamatórios como leucocitose (mais de 20.000 leucócitos) ou leucopenia (menos de 5.000 leucócitos) e relação I/T \geq 0,2. Mais recentemente, Buck e colaboradores (19), para investigar o valor diagnóstico da IL-6 na sepse neonatal precoce, classificaram os RNs em 5 grupos: sepse comprovada com hemocultura positiva, sepse clínica, sepse clínica associada a alterações laboratoriais exceto culturais, grupo controle e miscelânea (aqueles RNs não incluídos nos

grupos anteriores). Nesse trabalho foi dosada PCR na avaliação de alterações laboratoriais, além dos dados fornecidos pelo leucograma, contudo não houve preocupação em utilizar somente critérios clínicos na classificação dos RNs.

Em outro estudo que realizamos foi possível avaliar a repercussão da antibioticoterapia materna intraparto na sepse neonatal precoce, tendo-se verificado que nenhum RN com mães em tratamento apresentou qualquer exame de cultura com presença de germe ($p=0,0164$) e, na avaliação do risco relativo, as chances de cultura positiva em RN com síndrome séptica ou sepse presumível cuja mãe não usou antibiótico foram 12 vezes maiores. Com isto concluímos que a administração de antibióticos às gestantes no momento do trabalho de parto pode suprimir potencialmente a infecção fetal e retardar o diagnóstico e o tratamento do RN com sepse neonatal precoce. O uso de antibióticos antes do parto faz com que as culturas resultem negativas, constituindo um dos fatores de dificuldade diagnóstica da sepse neonatal precoce (118).

O uso de antibióticos no periparto nas mães colonizadas pelo *streptococcus* do grupo B, visando a profilaxia de sepse neonatal precoce, tem sido muito estudado, havendo referências que o apontam como principal agente da sepse neonatal de início precoce (16,90,91,93,111,125). No entanto, nas culturas realizadas em nosso estudo, predominou o estafilococo, principalmente o *Staphilococcus aureus*. Este fato poderia gerar a especulação de contaminação da amostra de sangue durante a coleta, contudo todo o material hemocultura foi coletado com os cuidados de assepsia recomendados. O preparo para coleta inclui higiene da pele com solução anti-séptica à base de iodo, seguida da aplicação de tampão de álcool para remoção do iodo em excesso, e o uso de luvas esterilizadas.

Shahar e colaboradores (101) compararam assepsia cutânea com álcool seguida de solução à base de iodo com assepsia somente com álcool, provando que a frequência de contaminação não é influenciada pelo anti-séptico utilizado.

O volume de sangue coletado para realização da hemocultura foi 1 ml para cada Rn. A quantidade mínima de sangue necessária para detecção de bacteremia no RN ainda é motivo de discussão (123). A partir de estudos quantitativos de microorganismos no sangue circulante, Schelonka e colegas (99) calcularam as probabilidades de detectar bacteremia utilizando vários volumes de sangue; e 1 a 2 ml foi o volume ideal (99).

Com relação ao método bioquímico empregado para dosagem dos mediadores de resposta inflamatória aguda, o método ELISA tem permitido considerável avanço no estudo de diversas doenças, e a técnica tem relativa simplicidade, permitindo avaliação *in vivo* do comportamento de diferentes proteínas. Os ensaios da R & D Systems para dosagens de IL-6, TNF- α e IL-1 β apresentam alta sensibilidade, podendo atingir valores de sensibilidade dez vezes superiores aos de outros métodos imunoabsorventes (50,70). Utilizamos um método que permitiu detecções bastante sensíveis e com estreita variabilidade, o que favorece os resultados de nosso estudo. A especificidade também é muito boa, uma vez que o método não apresenta reatividade cruzada com outros mediadores ou interferência significativa nas dosagens. O fator limitante do método bioquímico é seu custo elevado, restringindo-o, no momento, apenas a pesquisas. Contudo seu emprego clínico rotineiro, acreditamos, é uma questão de tempo.

A adequação dos ensaios realizados ficou bem documentada pela qualidade das curvas padrão obtidas e dos coeficientes de correção observados, com equações polinomiais

de quarto grau. Além disso, todas as curvas padrão e amostras foram processadas em duplicata para reduzir a variabilidade do método.

7.3. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

As variáveis controladas, como peso de nascimento, idade gestacional, escore de Apgar no 5º minuto e tipo de parto não evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre quaisquer dos grupos estudados, mesmo quando comparados os Grupos I, II e III com os controles (Grupo IV). Índices leucocitários, relação I/T e contagem de plaquetas também não foram diferentes. Estes fatos possibilitaram correta avaliação do valor diagnóstico das citocinas entre os quatro grupos, sem outras variáveis intervenientes.

Miller e colaboradores (75) avaliaram os níveis de IL-6, TNF- α e IL-1 β no sangue de cordão umbilical de acordo com o tipo de parto, não encontrando diferença entre os distintos tipos de parto nos valores de IL-6 e TNF- α . Em contraste, os níveis de IL-1 β foram muito baixos nos RNs submetidos a cesareana eletiva ou parto vaginal e significativamente elevados no parto vaginal com fórceps. Esses autores especularam ser possível que citocinas maternas atravessassem a placenta e entrem na circulação fetal, ou que citocinas fetais façam o caminho inverso. Já Messer e colaboradores (74) não encontraram nenhuma correlação entre os níveis de IL-6 e receptores do TNF- α no sangue materno ou no sangue de cordão umbilical, razão pela qual acreditam que estes mediadores não atravessam a placenta e seus níveis no sangue de cordão são representativos dos níveis

fetais. Não constataram também nenhuma correlação entre idade gestacional e níveis de IL-6.

Dinarelli e colaboradores (34) observaram uma atividade reduzida do pirogênio endógeno pelas células de RNs submetidos a cesareana eletiva, antes de iniciado o trabalho de parto, em comparação com a atividade das células de RNs após trabalho de parto normal ou induzido. Este fato poderia suportar a hipótese de que parto induzido ou vaginal com fórceps estimulariam a produção de IL-1 β . Em nossa pesquisa não observamos tal associação, principalmente se considerarmos que a maioria dos partos foi vaginal sem uso de fórceps, vindo em segundo lugar parto cesáreo. Poucos foram os casos de parto com necessidade de fórceps.

Hipóxia e escore de Apgar inferior a seis têm sido relacionados com produção aumentada de TNF- α e IL-1 β (45). Não registramos diferença significativa entre os quatro grupos estudados quanto ao valor de Apgar dos RNs no 5º minuto.

Ao contrário de algumas publicações (43,87,94), nossos resultados não evidenciaram diferença nos índices leucocitários entre os diversos grupos, nem mesmo considerando RNs infectados e não-infectados. Trombocitopenia não mostrou valor coadjuvante no diagnóstico laboratorial. A explicação mais provável é que nossas dosagens laboratoriais foram muito precoces e estes índices demandam maior tempo para se alterarem, daí seu valor diagnóstico limitado na sepse neonatal de início precoce (104).

7.4. MEDIADORES DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA

Os comportamentos clínico e laboratorial, inclusive nos valores de mediana de IL-6, TNF- α e IL-1 β , dos Grupos I, II, e III não diferiram estatisticamente entre si, o que permitiu visualizá-los em dois grandes conjuntos e compará-los entre si: RNs infectados (n=66) e RNs não-infectados (n=51). Concordando com dados da literatura atual (19,32,33,36,74), os níveis de IL-6 e TNF- α foram significativamente mais elevados nos RNs com infecção. Já, para IL-1 β , a mediana obtida no grupo com sepse não diferiu do valor da mediana do grupo de RNs saudáveis. Miller e colaboradores (75) avaliaram RNs com complicações infecciosas perinatais bem definidas, encontrando níveis elevados de IL-6 no sangue de cordão umbilical e paralelamente níveis reduzidos de TNF- α e indetectáveis de IL-1 β . Uma possível explicação é o fato de a prostaglandina E2, ao induzir infecção, ser capaz de inibir TNF- α e IL-1 β , mas não fazê-lo com IL-6. Além disso, IL-6 pode inibir TNF- α e IL-1 β (2,100). É lícito especular que IL-6 seja o melhor marcador de sepse neonatal precoce. Lehrnbecher e colaboradores (64) observaram, em RNs com sepse neonatal precoce, que os valores plasmáticos de IL-6 coletados ao nascimento, com 24 horas e 48 horas de vida, foram mais elevados do que nos RNs não-sépticos.

Os valores absolutos dos níveis plasmáticos das citocinas que estudamos diferiram dos da literatura, uma vez que usamos curvas de ajuste de função polinomial a fim de obtermos uma curva padrão precisa, e existem diferentes *Kits* comercialmente disponíveis.

As amostras sanguíneas para avaliação do nível plasmático de IL-6, TNF- α e IL-1 β foram obtidas, em sua maioria, nas primeiras 24 horas de vida dos RNs, fato de extrema importância, uma vez que as citocinas apresentam um pico de nível sérico precoce ao evento inflamatório (3,49,94). Após a produção de endotoxemia experimental, foi observada a cinética de liberação plasmática de três das principais citocinas. Lipopolissacarídeo tem seu pico sérico em 30 minutos de vida e atinge valores mínimos uma hora após. Como TNF- α é secretado em resposta a vários estímulos, principalmente aos dos lipopolissacarídios, atinge pico plasmático antes da IL-6 e IL-1 β . O nível sérico máximo para o TNF- α ocorre 1 hora após produção de endotoxemia experimental, com concentrações próximas de zero em 3 horas. Interleucina-6 apresenta um nível máximo em 3 horas e meia, estando ausente da circulação até 6 horas após o evento e IL-1 β tem seu pico plasmático em 2 horas e desaparece em 4 horas (3). Portanto, o valor diagnóstico de IL-6, TNF- α e IL-1 β é limitado pelo momento da coleta da amostra sanguínea que deve ser o mais precoce possível a partir da suspeita de sepse neonatal.

Todos os pacientes tiveram as amostras de sangue coletadas para obtenção dos níveis plasmáticos das citocinas no momento da suspeita diagnóstica de sepse neonatal precoce e antes de se iniciar qualquer tratamento antimicrobiano. No estudo de Groll e colaboradores (49) IL-6 foi dosada nas primeiras 12 horas após a suspeita de infecção e início de antibioticoterapia, mesmo assim foram encontrados valores de IL-6 80 vezes maiores em 8 dos 10 RNs sépticos quando comparados com os de 10 RNs não sépticos. Em muitos casos, o pico de nível sérico da IL-6 ocorre na admissão hospitalar e decresce nas primeiras 24 horas até níveis indetectáveis (19). A meia-vida muito curta da IL-6 foi confirmada por Castell e colaboradores (24) em estudo experimental, sendo explicada pela

ligação a proteínas plasmáticas específicas como, por exemplo, α 2-macroglobulina, pelo rápido acúmulo hepático ou, ainda, pelo efeito inibitório de outras citocinas (24,76).

Quando analisamos os valores de mediana dos mediadores IL-6, TNF- α e IL-1 β nos quatro grupos, novamente observamos que a IL-1 β não diferiu estatisticamente entre os grupos e, curiosamente, apresentou valores inferiores de mediana nos RNs do Grupo III (sepsis presumível associada a antibioticoterapia materna no periparto) quando comparados com os de RNs do grupo IV (controles). Existem várias explicações possíveis: o Grupo III é representado pelos RNs com sepsis parcialmente tratada pelo uso de antibiótico materno no periparto; alguns controles, ao terem suas amostras coletadas, encontravam-se com hipertermia, e há vários relatos na literatura correlacionando níveis elevados de IL-1 β com febre (33,73,107); e finalmente, IL-1 β pode não ser um bom marcador de sepsis neonatal. Em nosso estudo, os níveis plasmáticos de IL-1 β foram muito baixos, especialmente quando comparados com os encontrados na sepsis em adultos (22,46,120), possivelmente porque os monócitos de RNs secretam IL-1 β em concentrações menores que os de adultos (33,107).

Inteleucina-6 e TNF- α apresentaram níveis significativamente mais elevados nos Grupos I, II e III quando comparados com o Grupo IV. Esta diferença foi mais evidente com IL-6. De Bont e colaboradores (32) estudaram um número pequeno de RNs com suspeita clínica de infecção (n=33), encontrando nos níveis de IL-6 superiores a 500 pg/ml e nos de TNF- α superiores a 70 pg/ml indicadores precoces de sepsis neonatal. Em estudo anterior, os mesmos autores (33) observaram que durante um quadro de sepsis neonatal, principalmente por bactérias gram-positivas, os níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α e IL-1 β encontravam-se, respectivamente, 1.500, 15 e 2 vezes mais elevados (33). Doellner e

colaboradores (36) avaliaram seis mediadores da resposta inflamatória aguda no diagnóstico de sepse neonatal precoce: IL-6, PCR, receptores solúveis do fator de necrose tumoral (sTNF-R) p55 e p75, além das moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e E-selectina, e somente a combinação de IL-6 e PCR foi significativa no diagnóstico de sepse neonatal precoce. No estudo de Messer e colaboradores (74) foram avaliados IL-6 e sTNF-R p55 e p75, demonstrando-se correlação com sepse somente com níveis plasmáticos de IL-6 elevados nas primeiras 12 horas de vida do neonato. Em nossa pesquisa não dosamos receptores de citocinas em função desses relatos demonstrando sensibilidade inexpressiva para o diagnóstico de sepse neonatal.

Ao analisarmos a resposta febril do RN, IL-6 e IL-1 β demonstraram ser bons marcadores de febre, principalmente IL-1 β . Estes achados são superponíveis aos da literatura (33,41,55,107). Interleucina-1 β é conhecida como a citocina mais pirogênica (35). Contrariando o esperado, TNF- α não foi significativamente mais elevado nos RNs com presença de febre, achado este que pode ser explicado pelo fato de muitos RNs apresentarem hipertermia sem se encontrarem realmente sépticos (38,43,93).

7.5. CURVA ROC - RECEIVER OPERATING CHARACTERISTICS

Obteve-se curva ROC para IL-6 e TNF- α , utilizando-se todos os valores possíveis para estas citocinas a fim de estabelecer o melhor ponto de corte. O ponto de corte ideal de cada uma das citocinas estudadas foi um valor capaz de detectar quase todos os casos

verdadeiramente positivos (alta sensibilidade), com o menor risco de resultados falso-positivos (alta especificidade). Os valores de ponto de corte encontrados para IL-6 e TNF- α foram, respectivamente, 32 pg/ml e 12 pg/ml, sendo inferiores aos registrados no estudo de Messer e colaboradores (74). É difícil compararmos os níveis plasmáticos de citocinas do nosso estudo com os da literatura por termos utilizado diluições diferentes e uma equação com função polinomial para ajuste de valores.

Ao estabelecer o melhor ponto de corte para um teste diagnóstico, o investigador deve avaliar a importância relativa da sensibilidade e da especificidade do teste (57). Uma maneira de fazê-lo é considerar as implicações de duas situações possíveis: se devemos evitar um resultado falso-positivo, por exemplo, um teste que definirá um procedimento cirúrgico num paciente, o ponto de corte deverá encontrar-se o máximo de especificidade possível para o teste. De outro modo, se devemos evitar um resultado falso-negativo, como não diagnosticar e, conseqüentemente, não tratar um caso de sepse neonatal precoce, a escolha do ponto de corte deve fundamentar-se no nível máximo possível de sensibilidade do teste (40). Os diferentes pontos que compõem a curva ROC representam as diversas escolhas de pontos de corte construídos a partir do equilíbrio entre a sensibilidade e a especificidade do teste diagnóstico (62). Em última análise, o ponto de corte numa curva ROC é o divisor entre normalidade e anormalidade quando o resultado de um teste é dicotomizado (62).

7.6. ANÁLISE DO VALOR DIAGNÓSTICO DE IL-6 E TNF- α

A eficácia de um teste diagnóstico depende da sensibilidade, da especificidade e da prevalência da doença na população na qual ele é aplicado. Quando a prevalência é alta, como na sepse neonatal, a eficácia do teste é mais diretamente influenciada pela sensibilidade; quando a prevalência é baixa, a especificidade torna-se particularmente importante (17).

A determinação de um valor plasmático como ponte de corte é de interesse prático, uma vez que pode auxiliar o clínico na definição da melhor conduta terapêutica após estabelecidos os limites de normalidade e anormalidade (62).

Utilizando-se o ponto de corte de 32 pg/ml para IL-6, obteve-se sensibilidade de 90% e especificidade de 43%, o que é considerado um bom índice para o teste na situação de sepse neonatal precoce, na qual é necessário um nível mais alto de sensibilidade porque todos os RNs efetivamente infectados devem ser identificados. Estudos recentes apontam uma sensibilidade para IL-6 isoladamente que oscila entre 73% e 90% (32,33,36,74,84). Como optamos pelo máximo de sensibilidade possível em função das características acima comentadas da sepse neonatal, assumimos o risco de perder em especificidade. A melhor especificidade descrita para IL-6 foi 93%, por De Bont e colaboradores (32).

O ponto de corte de 12 pg/ml para TNF- α forneceu sensibilidade de 87,9% e especificidade de 43%. Novamente, optamos pelo ponto de corte com melhor sensibilidade que apresentasse uma especificidade aceitável. Os relatos avaliando TNF- α evidenciam

especificidade e sensibilidade menores que para IL-6 (32,36,75). A determinação dos receptores solúveis de TNF- α parece ser menos informativa, principalmente quando as amostras sanguíneas são obtidas mais precocemente (74).

Observamos que TNF- α é de particular interesse no diagnóstico de sepse neonatal precoce quando utilizado em combinação com IL-6. Interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α associados apresentaram sensibilidade de 98,5%, um dos melhores resultados já descritos na literatura para estes mediadores. De Bont e colaboradores (32) encontraram sensibilidade baixa (60%) com a associação de ambos os testes diagnósticos, talvez porque os pontos de corte adotados não tenham sido adequados.

Valores preditivos positivo e negativo são formas alternativas para avaliar um novo teste diagnóstico, fornecendo um tipo diferente de sensibilidade e especificidade, diretamente aplicável ao diagnóstico (17). Valor preditivo negativo (VPN) é a proporção de pacientes com teste negativo que realmente estão livres da doença (40). Observamos que em 90% dos casos a combinação de IL-6 e TNF- α possibilitou excluir o diagnóstico de sepse neonatal precoce nos RNs realmente saudáveis; este resultado é mais fidedigno e aplicável na nossa prática clínica que a especificidade. Além disso, estes testes isolados ou combinados nos forneceram valores preditivos positivos superiores a 60%, o que é de especial significado diagnóstico, considerando-se as dificuldades no diagnóstico clínico de sepse neonatal precoce (7,43,93). Na avaliação da probabilidade de erro do teste diagnóstico, ou seja, o RN ainda apresentar-se séptico mesmo diante de um teste negativo (1-VPN), obtivemos excelentes resultados, principalmente quando utilizados IL-6 e TNF- α

combinados. Somente em 10% dos casos é possível um RN apresentar-se com sepse a despeito de qualquer um dos testes resultar negativo.

Lencki e colaboradores (65), sugeriram que os níveis plasmáticos de IL-6 no sangue de cordão umbilical poderiam ser úteis na identificação de neonatos de risco para sepse neonatal precoce. Esses pesquisadores encontraram valor preditivo negativo de 97%, podendo praticamente excluir infecção. Avaliando nossos resultados globalmente, sensibilidade de 98,5% e valor preditivo negativo de 90% para a combinação de IL-6 e TNF- α , há boas probabilidades de diagnóstico e de exclusão de infecção, com o que o tratamento antimicrobiano desnecessário pode ser evitado.

Com a preocupação de analisarmos sob diferentes aspectos a capacidade diagnóstica dos dois mediadores que se mostraram significativos para o diagnóstico de sepse neonatal precoce, IL-6 e TNF- α , utilizamos também o *odds ratio* (OR), teste que pode estimar o risco relativo. Valores superiores a 1 (OR>1) indicam que a exposição associa-se com um risco aumentado de desenvolver o evento (62). No presente estudo, podemos inferir que IL-6 e TNF- α isolados ou associados, ao se apresentarem com valores de OR superiores a 1 e dentro do intervalo de confiança do OR (Tabela 5), foram significativos em prever sepse neonatal precoce. Em outras palavras, estes testes, quando positivos, aumentam as chances de diagnóstico.

7.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As citocinas são sintetizadas e secretadas em resposta a estímulos inflamatórios, por monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, e portanto, IL-6, TNF- α e IL-1 β podem ser indicadores mais precoces de sepse neonatal precoce que outras proteínas de fase aguda anteriormente estudadas, como PCR, VHS, haptoglobina e fibronectina (19,32,36,59,73,74). Ao constatarmos a eficácia diagnóstica desses mediadores, especialmente a IL-6, outras possibilidades diagnósticas tornam-se secundárias. É usual tratarmos RNs com clínica sugestiva de sepse neonatal precoce, e certamente, alguns pacientes recebem antibioticoterapia desnecessária. Por outro lado, o risco de não tratarmos o RN envolve seqüelas graves e mortalidade de até 50% (38,43,93).

Os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α devem ser avaliados o mais precocemente possível no curso da doença, pois as citocinas, de um modo geral, alteram-se no início da instalação do processo inflamatório e apresentam meia-vida muito curta. Este perfil é de particular interesse para diagnóstico muito precoce de infecção neonatal. Ao contrário, outros parâmetros utilizados na nossa prática clínica diária, como leucograma (leucopenia, leucocitose, relação I/T), trombocitopenia, VHS, PCR e a própria clínica do RN, muito embora inespecífica na maioria das situações, demandam maior tempo para apresentar alguma alteração sugestiva (43). Os exames de culturas de secreções do organismo, especialmente a hemocultura, ainda encontram espaço no diagnóstico, mas as dificuldades

na obtenção de um resultado positivo e o tempo para o crescimento do germe tornam sua utilidade limitada (53).

A despeito de recentes estudos envolvendo alguns receptores solúveis de citocinas pró-inflamatórias, estes não têm sido efetivos no diagnóstico precoce de sepse neonatal precoce (31,36,74). Ao contrário, em adultos os níveis plasmáticos de TNF- α e seus receptores solúveis encontram-se mais elevados nos pacientes em choque séptico, não dependendo diretamente da sobrevida (18).

É possível caracterizar a resposta inflamatória e o comportamento dos mediadores quando precocemente estudados na evolução da sepse neonatal precoce. Os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α são significativamente mais elevados em RNs com sepse neonatal comprovada ou presumível quando comparados com os de RNs saudáveis, constituindo-se em marcadores fidedignos de sepse neonatal de início precoce. As limitações para o emprego destes testes na prática clínica são o custo elevado dos *Kits* para dosagens e a complexidade da técnica laboratorial. A tendência atual, contudo, é o desenvolvimento de técnicas mais simples e práticas, acessíveis à implantação na rotina de laboratórios de análises clínicas.

8. CONCLUSÕES

A análise dos resultados deste estudo possibilitou-nos estabelecer as seguintes conclusões que seguem.

- Os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α foram significativamente mais elevados nos recém-nascidos com sepse presumível ou comprovada, em relação aos de recém-nascidos saudáveis.
- Não foi possível observar diferença significativa nos níveis plasmáticos de IL-1 β entre recém-nascidos sépticos e não-sépticos.
- O ponto de corte ótimo para determinar presença ou não de sepse neonatal precoce foi 32 pg/ ml para IL-6 e 12 pg/ ml para TNF- α .
- A combinação entre IL-6 e TNF- α proporcionou uma sensibilidade de 98%, superior à demonstrada com os testes isoladamente.
- A associação entre IL-6 e TNF- α mostrou-se o melhor marcador para sepse no período pós-natal imediato.

-
-
- Os níveis plasmáticos de IL-6 e IL-1 β foram significativamente mais elevados nos recém-nascidos com febre; para o TNF- α essa diferença não foi demonstrada.
 - Interleucina-1 β mostrou-se o melhor mediador da resposta febril no recém-nascido.
 - A avaliação do hemograma (leucograma; relação I/T) não foi efetiva para o diagnóstico de sepse neonatal precoce, provavelmente porque estes parâmetros laboratoriais necessitam de maior tempo para se mostrarem alterados que as citocinas estudadas.
 - Interleucina-6 e TNF- α são mediadores de resposta inflamatória aguda que contribuem decisivamente para o diagnóstico precoce de sepse neonatal precoce.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AARDEN, L.; LANSDORP, P.; DE GROOT, E.. A growth factor B cell hybridomas produced by human monocytes. **Lymphokines**. v.10 p.175- 186, 1985.
2. ADERKA, D.; LE, J.; VILCEK, J. IL-6 inhibits lipo[plyssaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes U937 cells and in mice. **J Immunol**. v.143 p.3517- 3521, 1989.
3. ANDERSON, M.R.; BLUMER, J.L. Advances in the therapy for sepsis in children. **Pediatr Clin North Am**, v. 44. n. 1, p.179- 186, 1997.
4. ARAI, K.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.. Cytokynes: coordinators of immune and inflamatory responses. **Ann Rev Bioch** v.59 p.783- 788, 1990.
5. ATICI, A .; SATAR, M.; ALPARSLAN, N.. Serum interleukin-1 β in neonatal sepsis. **Acta Paediatr**.v.85 p. 371- 374, 1996.
6. ATKINS, E.. Fever: the old and the new. **J Infect Dis** v.3 p.339-346, 1984.
7. AVERY, G.B.; FLETCHER, M.A.; MACDONALD, M.G. **Neonatology, Pathophysiology and Management of the Newborn**. 4th edition. Philadelphia : J. B. Lippincott Co., 1994.
8. BALEY, J.E.; STORK, E.K.; WARKETIN, P.I.; SHURIN, S.B.. Neonatal neutropenia : clinical manifestations, cause, and outcome. **Am J Dis Child**, v.142 p.1161- 1165, 1988.
9. BALLARD, J.L.; KHOURI, J.C.; WEDIG, K.; WANG, L.; ELLERS-WALSMAN, L.; LIPP, R..New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. **J Pediatr** v.119 n.3 p.417- 423, 1991.
10. BELODY, P.H.; FARKOUH, L.J.; GIBBS, R.S..Intra-amniotic infection and premature rupture of the membranes. **Clinics in Perinatology**. v.24 n.1, p.43- 51, 1997.
11. BENETT, I.L. Jr; BEESON, P.B. The effect of the injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabitts. **J Exp Med** v.98

- p.477- 479, 1953.
12. BONADIO, W.A .; HENNES, H.; SMITH, D.. Reability of observation variables in distinguishing infectious outcome of febrile young infants. **Pediatr Inf Dis J** v.12 p.111- 119,1993.
 13. BONE, R.C.; FISCHER, C.J.; CLEMMER, T.P.. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. **Crit Care Med.**, v.17 n. 5, p.389- 394, 1989.
 14. BONE , R. C..Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure; a plea for comparable definitions. **Ann Intern Med.** , v. 114 n. 4, p. 332- 336, 1991
 15. BOYER, K.M.; GADZALA, C. A; BURD, L.I.. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease: I epidemiologic rationale. **J Infect Dis** v.148. p. 795- 798, 1983.
 16. BOYER, K.M.; GOTOFF, S.P..Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. **New Engl J Med.** v.314 p.1665-1669, 1986.
 17. BRADLEY, G.W.. **Disease, Diagnosis and Decisions**. New York: John Wiley & Sons (SEA), 1993.
 18. BRAUNER, J.L.; CLAUSELL, N. Dosagem seqüencial de Fator de Necrose Tumoral Alfa, seus Receptores Solúveis e Endotelina-1 em pacientes com choque séptico. **Dissertação de Mestrado: Faculdade de Medicina, pós-graduação em Clínica Médica-UFRGS**, 1997.
 19. BUCK, C.; BUNDSCHU, J.; GALLATI, H.; BARTMANN, P.; POHLANDT, F.. Interleukin-6 : a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. **Pediatrics**, v. 93 n.1, p. 54- 58, 1994
 20. CABAL, L.A.; SIASSI B.; CRISTOFANI, C.. Cardiovascular changes in infants with β -hemolytic Streptococcus sepsis. **Crit Care Med.** V.18.p.715- 718, 1990.
 21. CALANDRA, T.; GERAIN, J.; HEUMANN, D.; BAUMGARTNER, J.D.; GLAUSER, M.P.. High circulation levels of interleukin-6 in patients with shock septic: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. **Am J Med.** v.91 p.23- 32, 1991.
 22. CANNON, J.G.; TOMPKINS, R.G.; GELFAND, J.A.; MITCHIE, H.R.; STANFORD, G.G.; VAN DER MEER, J.W.M.; ENDRES, S.; LONNEMAN, G.; CORSETTI, J.; CHERNOW, B.; WILMORE, D.W.; WOLFF, S.S.; BURKE, J.F.; DINARELLO, C.A .. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. **J Infect Dis.** v. 161 p.79- 84,1990.
 23. CAPURRO, H.; KORICHEZKY, S.; FONSECA, D.. Simplified method for diagnosis of

- gestational age in the newborn infant. **J Pediatr** v.93 p.120, 1978.
24. CASTELL, J.V.; GEIGER, T.; GROSS, V.. Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte stimulating factor in the rat. **Eur J Biochem** v.177 p.357- 361, 1988.
 25. CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, M. J.; DAVID, M.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; HEINRICH, P.C.. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2 γ /HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. **FEBS Lett** v. 232 p.347-350, 1988.
 26. CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B.. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** v.72 p.3666- 3670, 1975.
 27. CLARK, B.D.; COLLINS, K.L.; GANDY, M.S., WEBB, A.C.; AURON, PE.. Genomic sequence for prointerleukin-1 β : possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin-1 α gene. **Nucleic Acids Res** v.14 p.7897- 7899, 1985.
 28. COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. New Jersey: Erlbaum Associates, publishers, 1988.
 29. COHEN, M.C.; COHEN, S..Cytokine function. A study in biologic diversity (review article). **A J C P**, v. 105 n.5 p.589- 598, 1996.
 30. COHEN,S.; BIGAZZI, P.E.; YOSHIDA, T. Commentary:Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. **Cell Immunol.** v.12 p.150- 154, 1974.
 31. DE BONT, E.S.J.M.; DE LEIJ, F.M.; OKKEN, A .; BAARSMA, R.; KIMPEN, J.L.L..Increased plasma concentrations of interleukin-1 receptor antagonist in neonatal sepsis. **Pediatrics Res** v37 n.5 p.626- 629, 1995.
 32. DE BONT, E.S.J.M.; MARTENS, A .; RAAN, J.V.; SAMSON, G.; FETTER, W.P.F.; OKKEN, A .; LEIJ, L.H.F.M.; KIMPEN, J.L.L.. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis. **Acta Paediatr**, v. 83. p.696- 699, 1984.
 33. DE BONT, E.S.J.M; MARTENS, A.; VAN RAAN, J.; SAMSON, G.; FETTERW.P.F.; OKKEN, A .; LEIJ, L.H.F.M.. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis. **Pediatrics Res** v.33 n.4 p.380- 384 , 1993.
 34. DINARELLO, C.A.; SHARBER, M.; KENT, E.F.Jr; WOLFF, S.M.. Production of leucocyte pyrogen from phagocytes of neonates. **J infect Dis** V.144 p. 337- 342, 1981.
 35. DINARELLO, C.A .; WOLF, S.H.. Molecular basis of fever in humans. **Am J Med** v.72

- p.799- 806, 1982.
36. DOELLNER, H.; JOHSEN, H.; HAEREID, P.E.; ARNTZEN, K.J.; AAG, S.; AUSTGULEN, R.. The value of six inflammatory mediators in the diagnosis of early onset neonatal sepsis.(Abstract) **Prenatal and Neonatal Med.**FC4.1 p.12, 1995.
 37. DOERING, P.L.; STEWART, R.B..The extent and characer of drug consumption during pregnancy. **JAMA** v.239 p.843- 849, 1978.
 38. FANAROFF, A .A .; MARTIN, R. J. **Neonatal-Perinatal Medicine. Diseases of the Fetus and Infant.** 6 th edition. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1997.
 39. FENTON, M.J.; VERMEUHLLEN, M.W.; CLARK, B.D.; WEBB, A .C.; AURON, P.E.. Human pro-IL-1 β gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. **J Immunol** v.140 p.2267- 2272, 1988.
 40. FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H.. Epidemiologia Clínica (Clinical Epidemiology).(trad.). 2ª edição. Porto Alegre: Artes Médicas, 1991.
 41. FRIEDLING, J.T.M.; VAN DEUEN, M.; WIJDENES, J.; VAN DER MER, C.C; VAN DER LINDEN, C.J.; SAUERWEIN, R.W.. Circulating Interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome. **J Infect Dis** v.171 p.469- 472, 1995.
 42. GAULDIE, J.; RICHARDS, C.; HARNISH, D., LANDSDORP, P.; BAUMANN, H.. Interferon- β /BSF-2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte stimulating factor (HSF) and regulates the major acute-phase protein response in liver cells. **Proc Natl Acad Sci USA** v.84 p.7251- 7255, 1987.
 43. GERDES, J.S. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. **Clinics in Perinatology**, n.18, p. 361- 381, 1991.
 44. GERDES, J.S.; POLIN, R.A .. Sepsis screen in neonates with evaluation of plasma fibronectin. **Pediatr Inf Dis J** v. 6 p. 443- 446, 1987
 45. GHEZZI, P.; BIANCHI, M.; DINARELLO, C.. Hypoxia increases IL-1 and TNF production. (Abstract).**Cytokine** v.1 n1.p.122, 1989.
 46. GIRARDIN, E.; GRAU, G.E.; DAYER, J.M.; ROUX-LOMBARD, P. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. **New Engl J Med.**v. 319 p.397- 401, 1988
 47. GOBEL, U.; PETRICH, C.; VON VOSS, H.; SCHMELZER, L.. Alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin in newborn infants.The influence of perinatal complications. **Eur J Pediatr.** v.129 p.117- 119, 1978.
 48. GOZZARD, D.I.; FRENCH, E.A .; BLECHER, T.E.; POWELL, J.R.. C-reactive protein levels in neutropenic patients with pyrexia. **Clin Lab Haematol.** v.7 p.307- 310, 1985.

49. GROLL, A. H.; MEISER, A. ; WEISE, M.; RETTWITZ-VOLK, W.; VON LOEWENICH, V.; GUSSETIS, E.S.. Interleukin-6 as early mediator in neonatal sepsis. **Pediatr Inf Dis J**, v.11 n.6 p.496- 498,1992.
50. GROOTE, M.; MARTIN, M.; DENSEN, P.; PFALLER, M.; WENZEL, R.. Plasma Tumor Necrosis Factor levels in patients with presumed sepsis. **J Am Medical Association**. v.262 p.249- 253, 1989.
51. HABENICHT, A. **Growth Factors, Differentiation Factors, and Cytokines**. Berlim: Springer-Verlag ,1990
52. HACK, C.E.; DE GROOT, E.R.; FELT-BERSMA, R.J.F. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. **Blood** v.74 p.1704- 1710,1989.
53. HAMMERBERG, O. ; BIALKOWSKA-HOBRANSKA, H. ; GREGSON, D.; POTTERS, H.; GOPAUL, D. ; REID, D..Comparison of blood cultures with corresponding venipuncture site cultures of specimens from hospitalized premature neonates. **J Pediatr**, n. 120. p. 120- 124, 1992.
54. HELFGOTT, D.C.; MAY, L.T.; STHOEGER, Z.; TAMM, I.; SEHGAL, P.B.. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of $\beta 2$ interferon by human fibroblasts. **J Exp Med**. v.166 p.1300- 1308, 1987.
55. HENEY, D.; LEWIS, I.J.; EVANS, S.W.; BANKS, R.; BAILEY, C.C; WHITCHER, J.T.. Interleukin-6 and its relationship to C-Reactive Protein and fever in children with febrile neutropenia. **J Infect Dis**. v.165 p.886- 890, 1992.
56. HORII, Y.; MURAGUCHI, A. ; SUEMATSU, S.; MATSUDA, T.; YOSHIZAKI, K.; HIRATO, T.; KISHIMOTO, T.. Regulation of BSF-2/il-6 production by human mononuclear cells. **J Immunol**. v. 141 p.1529- 1535, 1988.
57. HULLEY, C.B.; CUMMINGS, S.R.. **Designing Clinical Research na epidemiologic Approach** .Baltimore: Williams & Wilkins, 1988.
58. KINASHI, T.; HARADA, N.; SEVERINSON, E.; TANABE, T.; SIDERAS, P.; KONISHI, M.; AZUMA, C.; TOMINAGA, A.; BERGSTEDT, S.L.; TAKAHASHI, M.; MATSUDA, F.; YAOITA, Y.; TAKATSU, K.; HONJO, T..Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. **Nature** v.324 n.6 p.70- 73, 1986.
59. KISHIMOTO, T.. The biology of interleukin-6 (review article). **Blood**, v.74 n. 1 p. 1- 10, 1989.
60. KLEIN, R.B.; FISHER, T.J.; GARD, S.E.. Decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants, and young children. **Pediatrics**, v. 60 p. 467- 472, 1977.

61. KNUDSEN, F.U.; STEINRUD, J.. septicemia of the newborn, associated with ruptured foetal membranes, discoloured amniotic fluid or maternal fever. **Acta Paediatr Scand** V.65 p. 725- 731,1976.
62. KRAMER, S.M. **Clinical Epidemiology and Bioestistics**. London: Library of Congress Catalogin-in .Publication Data, 1988
63. LAMY, M.; DEBY-DUPONT, G.: Is sepsis a mediator-inhibitor mismatch? **Intesive Care Medicine** v.21 p.5250-5257, 1995.
64. LEHRNBECHER, T.; SCHROD, L.; KRAUS, D.; ROOS, T.; MARTINS, J.; VON STOCKHAUSEN, H.B..Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in cord blood in the diagnosis of early onset sepsis in neonates. **Acta Paediatr** v.84 p.806- 809, 1995.
65. LENCKI, S.G.; MANCILLA, M.B.; EGLINTON, G.S.. Maternal and umbilical cord serum interleukin-6 levels in preterm labor with clinical chorioamnionitis. **Am J Obstet Gynecol** v.170 p.1345- 1349, 1994.
66. LIU, C.H.; LEHAN, C.; SPEER, M.E.. Degenerative changes in neutrophils: an indicator of bacterial infection. **Pediatrics** v.74 p.823- 829, 1984.
67. LLOYD, B.W.; OTO, A . Normal values for mature and immature neutrophils in very preterm babies. **Arch Dis Child**. n . 57, p.233- 239, 1982.
68. MALECH, H.L.; GALLEN, J.I..Current concepts-immunobiology : neutrophils in human diseases. **New Engl J Med.**, v. 317 p. 687- 690, 1987.
69. MANROE, B.L.; WEINBERG, A .G.; ROSENFELD, C.R.; BROWNE, R.. The neonatal blood count in health and disease, I: refernce values for neutrophilic cells. **J Pediatric**, v. 95, p. 89- 98, 1979.
70. MARECAUX, G.; PINSKY, M.; DUPONT, E.; KAHN, R.; VICENT, J.. Blood lactate levels are better prognostic indicators than TNF and IL-6 levels in patients with septic shock. **Intensive Care Medicine** v.22 p.404- 409, 1996.
71. MATHERS, N.J.; POLHANDT, F..Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection. **Eur J Pediatr** v.146 p.147- 151, 1987
72. MCCANCE, K.L.; HUETHER, S.E..**Pathophysiology. The biologic basis for disease in adults and children**. St. Louis : Mosby Co., 1990.
73. MEADOW, W.; RUDINSKY, B.. Inflammatory mediators and neonatal sepsis. **Clinics in Perinatology.**, v. 22 n. 2 p. 519- 536, 1995.
74. MESSER, J.; EYER, D.; DONATO, L.; GALLATI, H.; MATIS, J.; SIMEONI, U.. Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early

- diagnosis of neonatal infection. **J Pediatr.**, v. 129 n. 4 p.574- 580, 1996.
75. MILLER, L.C.; ISA, S.; LOPRESTE, G.; SCHALLER, J.G.; DINARELLO, C.A.. Neonatal interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor: cord blood levels and cellular production. **J Pediatr**, v.117 n.6 p.961- 965,1990.
 76. MUSSO, T.; ESPINOZA-DELGADO, J.; PULKI, K.; GUSSELA, G.L.; LONGO, D.L.; VARELIO, L. Transforming growth factor beta down regulates interleukin 1 induced Il-6 production by human monocytes. **Blood** v.76 p.2466- 2500, 1990.
 77. NAKAJIMA, K.; MARTINEZ-MAZA, O.; HIRANO, T.; NISHANIAN, P.; SALAZAR-GONZALEZ, J.F.; FAHEY, J.L.; KISHIMOTO, T..Induction of interleukin 6 (BSF-2/IFN- β 2) production by the human immunodeficiency virus (HIV). **J Immunol.** v. 142 p.531- 536, 1989.
 78. NAEYE, R.L. Causes of excessive rates of perinatal mortality and prematurity in pregnancies complicated by maternal urinary tract infections. **New Engl J Med** v.300 p.819-824,1979.
 79. NAWROTH, P.P.; STERN, D.M.. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. **J Exp Med** v.163 p.740- 745, 1986.
 80. NETEA, M.G.; BLOK, L.W.; KULBERG, B.J.; BEMELMANS, M.; VOGELS, M.T.E; BUURMAN, W.A.; VAN DER MEER, J.W.M..Pharmacologic inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice. **J Infect. Dis.**v.171 p.393- 399, 1995.
 81. NORMAS DE PESQUISA EM SAÚDE.Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 01 de 13 de junho de 1988.
 82. NORTH, R.J.; HAVELL, E.A .The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF): Analysis of the role of endogenous TNF in endotoxin-induced hemorrhagic necrosis and regression of na established sarcoma. **J Exp Med** v.167 p.1086-1089, 1988.
 83. OHLSSON, A .; MYHR, T..Intrapartum chemoprophylaxis of perinatal Group B Streptococcal infections: A critical review of randomized controlled trials. **Am J Obstet Gynecol** v.170 p.910-917, 1994
 84. PANERO, A;PACIFICO, L.; ROSSI, N.; MANCUSO, G.; STEGAGNO, M.; CHIESA, C.. Interleukin-6 in neonates with early and late onset infection. **Pediatr Inf Dis J** .v.16 n.4 p.370- 377, 1997.
 85. PAYNE, N.E.; BURKE, B.B; DAY, D.L.. Correlation of clinical and pathologic findings in early onset neonatal group B streptococcal infection with disease severity and prediction of outcome. **Pediatr Inf Dis J** v. 7 p. 836- 847 , 1988.
 86. PHILIPS, A .G.S.. Acute phase proteins in neonatal infection. **J Pediatr.** v.105 p. 940-

- 945, 1984.
87. PHILIP, A.G.S.; HEWITT, J.R.. Early diagnosis of neonatal sepsis. **Pediatrics**, v. 65 n. 5. p. 1036- 1041, 1980.
 88. PLACZEK, M.M.; WHITELAW, A .. Early and late neonatal septicemia. **Arch Dis Child** v.58, 728- 731, 1983.
 89. POBER, J.S. Effects of tumor necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. **Ciba Found Symp** v.131 p.88- 95, 1987.
 90. PYATI, S.P.; PILDERS, R.S.; RAMAMURPHY, R.S.; JACOBS, N.. Decreasing mortality in neonates with early-onset Group B Streptococcal infection: reality or artifact. **J Pediatr** v.98 p.625- 627, 1981.
 91. PYLIPOW, M.; GADDIS, M.; KINNEY, J.S.. Selective intrapartum prophylaxis for Group B Streptococcus colonization: management and outcome of newborns. **Pediatrics** v.93 p.631- 635 ,1994
 92. QUIRANTE, J.; CEBALLOS, R.; CASSADY, G.. Group B β -hemolytic streptococcal infection in the newborn. **Am J Dis Child** v.128 p.659- 665, 1974.
 93. REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O .**Infectious Diseases of the fetus & newborn infant**. 4 edition. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1995.
 94. RODWELL, R.L.; TAYLOR, K.M.; TUDEHOPE, D.I.; GRAY, P.H.. Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns. **Pediatr Inf Dis J**, v.12 n.5 p.372- 376, 1993.
 95. ROMERO, R.; BRODY, D.; OVARZUM, E..Infection and labor.III.Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. **Am J Obstet Gynecol**. V.160 p.1117, 1989.
 96. ROMERO, R.; MANOGUE, K; MITCHELL, M..Infection and labor.IV.Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. **Am J Obstet Gynecol** v. 161 p.336, 1989.
 97. RUSSELL, A .R.B.; DAVIES, E.G.; BALL S.E.; GORDON-SMITH, E.. Granulocyte colony stimulating factor treatment for neonatal neutropenia. **Arch Dis Child**. v.72 p. F53-F54, 1995.
 98. SCCM Consensus Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med**. n. 20, p.864- 869, 1992
 99. SCHELONKA, R.;CHAI, M.; YODER, B.; HENSLEY, D.; ASCHER, D. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. **J Pediatr** v.129 p.275-278, 1996.
 100. SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S.;

- DINARELLO, C.. Correlations and interaction in the production of interleukin-6, IL-1, and TNF in human blood mononuclear cells: IL-6 supress IL-1 and TNF. **Blood** v.75 p.40- 47, 1990.
101. SHAHAR, E.; WOHL-GOTTESMANN, B.S.; SHENKMAN, L.. Contamination of blood cultures during venopuncture: fact or mith? **Posgraduated Medicine J.** v.66 p. 1053-1058, 1990.
102. SHARMA, A .; KUTTY, C.V.K.; SUBHARWAL, U.; RATHI, S.; MOHAN, H..Diagnostic and prognostic role of CRP and m-ESR in neonatal septicemia. **Indian Pediatrics.** v.30 p.347- 350, 1993.
103. SHERMAN, M.P.; GOETZMAN, B.W.; AHLFORS, C.E..Tracheal aspiration and its clinical correlates in the diagnosis of congenital pneumonia. **Pediatrics.** v.65 p.258-262, 1980.
104. SILVA, O.; OHLSSON, A .; KENYON, C.. Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. **Pediatric Inf Dis J**, v. 14 n. 5, p. 362- 366, 1995.
105. SIMON, C.; SCHRODER, H.; BEYER, C.; ZERBST, T. Neonatal sepsis in an Intensive Care Unit and results of treatment. **Infection**, v.19 n. 3. p. 146- 149,1991.
106. SPEAR, M.L.; STEFANO, J.L.; FAWCETT, P.; PROUJANSKY, R.. Soluble interleukin-2 receptor as a predictor of neonatal sepsis. **J Pediatr.**, v. 126 n.6 p.982- 985, 1995.
107. SRUGO, I.; BERGER, A.; LAPIDOT, Z.; KATZ, R.; POLLAK, S.. Interleukin-1 secretion by blood monocytes of septic premature infants. **Infection** v.19 n.3 p.150- 154, 1991.
108. STEIN, M.; KESHAV, S.. The versatility of macrophage. **Clin Exp Allergy.**, v.22 p.19- 25 ,1992.
109. ST GEME, J.W.; BELL, L.M. ; BAUMGART, S..Distinguishing sepsis from blood culture contamination in young infants with blood cultures growing coagulase-negative staphylococci.**Pediatrics** v. 86. p. 157- 161, 1990.
110. ST GEME, J.W.; MURRAY, D.L.; CARTER, J..Perinatal infection after prolonged rupture of membranes: na analysis of risk and management. **J pediatr** v.104 p.608-612, 1984.
111. STOLL, B.J.; GORDON, T.; KORONES, S..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 Pediatr** v.129 p.72- 80, 1996.
112. SULLIVAN, J.S.; KILPATRICK, L.; COSTARINO, A .T.; LEE, S.C.; HARRIS, M.C.. Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. **J Pediatr** v. 120 p.510- 515, 1992.

113. SURI, M.; SHARMA, V.K.; THIRUPURAM, S.. Evaluation of ceruloplasmin in neonatal septicemia. **Indian Pediatrics**. v. 28 p. 489- 493, 1991
114. TRELUYER, J.M.; BOMBARD. Y.; GANTZER, A .; AUFRANT, C..Septicémes néonatales: diagnostic biologique et antibiothérapie. **Arch Fr Pediatr**, v. 48 p.317-321, 1991.
115. THULER, L.C..Diagnóstico microbiológico das bacteriemias. **JBM** v.69 p.123-128, 1995.
116. VALLEJO, J.G.; BAKER, C.J.; EDWARDS, M.S.. Interleukin-6 production by human neonatal monocytes stimulated by type III group B streptococci. **J Infect Dis**, v.174 p.332- 337, 1996.
117. VESIKARI, R.; JANAS, M.; GRONROOS, P. Neonatal septicemia. **Arch Dis Child.**, v. 60, p.542- 546, 1985.
118. VIEIRA, R. S.; PROCIANOY, R. S.; DALLE MULLE, L.; PRADO, C. H. A. Repercussão da antibioticoterapia materna intraparto no diagnóstico de sepse neonatal precoce. **Jornal de Pediatria** v.73 n.3.p.171- 175, 1997.
119. VISSER, V. E.; HALL, R. T.. Lumbar puncture in the evaluation of suspected neonatal sepsis. **J Pediatr** v.96 p. 1063- 1067, 1980.
120. WAAGE, A.; BRANDTZAEG, P.; HALSTENSEN, A.; KIERULF, P.; ESPEVIK, T.. The complex pattern of cytokines in plasma from patients with meningococcal septic shock, association between interleukin-6, interleukin-1 and fatal outcome. **J Exp Med**. v. 169 p.333-338, 1989.
121. WEATHERSTONE, K.B.; RICH, E.A.. Tumor necrosis factor/ cachectin and Interleukin-1 secretion by cord blood monocytes from premature and term neonates.**Pediatrics Res** v. 25 p. 342- 246, 1989
122. WILLIAMS, M.; MCCALLUM, J.; DICK, H.M.. The detection of infection in leukaemia by serial measurement of C-reactive protein. **J Infect Dis**.v. 4 p.139-145, 1982.
123. WILSON, D.C.; EDGAR, J.D.. Predictors of bacterial infection in neonates.(Letter). **J Pediatr** v.130 p.166, 1997.
124. YAMASAKI, K.; TAGA, T.; HIRATA, Y.; YAWATA, H.; KAWANISHI, Y.; SEED, B.; TANIGUCHI, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN- β 2) receptor. **Science** v.241 p.825- 831, 1988.
125. YOW, M.D.; MASON, E.O.; LEEDS, L.J.. Ampicilin prevents intrapartum transmission of Group B Streptococcus. **JAMA** v.241 p.1245- 1251, 1979.

126. ZIVOT, J.; HOFFMANN, W.: Pathogenic effects of endotoxin. **New Horizons** v. 3 p.267- 275, 1995.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO

A infecção no sangue dos bebês é condição grave, muitas vezes com risco de vida, e seu diagnóstico e tratamento precoces certamente modificam o seu curso clínico. Por outro lado, o uso desnecessário de antibióticos submete os pacientes aos efeitos adversos desses medicamentos e à internação hospitalar para receber medicações na veia e, neste caso, há o risco de adquirir infecção hospitalar. Estas situações devem ser evitadas.

O objetivo principal deste estudo é estabelecer critérios mais definidos para o diagnóstico precoce de infecção neonatal, para isto solicito seu consentimento na coleta de um volume de sangue adicional ao que será coletado a pedido de seu médico, correspondente a 2ml/kg de peso. Seu filho não será submetido a exame de sangue exclusivamente para a pesquisa e nenhuma intervenção será procedida com essa finalidade. O volume de sangue adicional é pequeno e não causa risco de vida.

Eu, _____,
responsável pelo recém-nascido de _____, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre o procedimento no qual meu filho ou tutelado estará envolvido, e os desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto sobre os benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento.

Declaro, para os devidos fins, que autorizo a inclusão do meu filho ou tutelado no estudo realizado pela Dra. Rita de Cássia Silveira.

Porto Alegre, _____

Assinatura do responsável _____

Assinatura do investigador _____

ANEXO II

PROTOCOLO

NOME: _____ REG: _____
 SEXO: _____ 1.F. _____ 2.M. _____ 3.IGO : __s__d _____ 4.IGP: __s__d _____
 Capurro 5.IGP : __s__d Ballard. 6. APGAR (5° min.): _____
 7. PN (g): _____ 8. Época do diagnóstico de sepse : _____ dias de vida.
 9.Data /coleta: _____ 10.Data/nascimento: _____ 11.Tipo parto: _____

FATORES DE RISCO MATERNO: 12. _____ ausentes

- a. Infecção do T. urinário: 13. _____ suspeita. 14. _____ comprovada.
 b. Infecção T. gen.materno (corioamnionite,LAF,leucorréia,herpes genital, papiloma):
 15. _____ Sim 16. _____ Não
 c. Bolsa rota > 18 h. 17. _____ Sim 18. _____ Não
 d. Outras infecções no periparto (febre) : 19. _____ Sim 20. _____ Não.
 e. Alterações do STORCH: 21. _____ Sim 22. _____ Não.
 f. Doença hipertensívica espec. gestação: 23. _____ Sim 24. _____ Não.
 g. Diabetes materno: 25. _____ Sim 26. _____ Não.
 h. DPP ou ruptura uterina: 27. _____ Sim 28. _____ Não.

FATORES CLÍNICOS DO RN: 29. _____ Presentes 30. _____ Ausentes.

- a. Instabilidade térmica (3 aferições em 24 h): 31. _____ < 36° C 32. _____ > 37° C.
 b. Estresse respiratório (gemência, BAN): 33. _____ Sim 34. _____ Não. 35. _____ FR > 60 mrm
 36. _____ FR < 30 mrm (pausa). 37. _____ Apnéia
 c. Sintomas gastrintestinais: 38. _____ Sim 39. _____ Não.
 d. Letargia ou hipoatividade: 40. _____ Sim 41. _____ Não.
 e. Hipotonia: 42. _____ Sim 43. _____ Não.
 f. Cianose: 44. _____ Sim 45. _____ Não.
 g. Convulsões: 46. _____ Sim 47. _____ Não
 h. Icterícia idiopática: 48. _____ Sim 49. _____ Não.
 i. Sinais de sangramento (petéquias, equimoses, hematomas, sangr. vivo):
 50. _____ Sim 51. _____ Não
 j. Sinais de choque: 52. _____ Sim 53. _____ Não.
 k. avaliação subjetiva (paciente não parece bem): 54. _____ Sim 55. _____ Não.

ANEXO III**PROTOCOLO (parte II)**

AVALIAÇÃO LABORATORIAL

NOME: _____ REG: _____

Leucograma: 56. ___ < 5000 57. ___ > 25000 58. Neutr. ___ < 1000

59. ___ I/T > 0,2.

60. plaquetas ___ < 100000

61. VHS ___ \geq 15mm/h62. TNF- α ___ pg/ mL63. IL-1 β ___ pg/ mL.

64. IL-6 ___ pg/ mL.

65. Alterações morfológicas do hemograma (anotar):

66. ___ hemocultura

67. ___ Urocultura

68. ___ LCR.

69. ___ Cultural de secreção coto umbilical.

70. ___ Outros (TET; Swab, aspirados).

ANEXO IV

GRUPO I - CONTROLES

PAC	PN(g)	IG (dias)	TP*	APGAR 5	DIAG (d)	FEBRE (1)	IL-6(pg/ml)	TNF(pg/ml)	IL-1 (pg/ml)
1	2750	280	3	9	3	1	36.9073	12,6299	6,08
2	3200	287	1	10	4	1	32.3515	35,6187	12,2223
3	1710	238	3	9	1	2	55.7429	15,5436	2,702
4	2110	270	3	9	6	2	60.5811	380,035	6,7975
5	4330	275	1	10	1	1	212,0947	11,567	34,0316
6	2900	260	1	8	1	1	3000	17,9566	193,43
7	3100	280	3	9	3	1	23,77189	24,374	8,478
8	3960	285	1	8	3	2	43,7168	33,3348	3,6355
9	1800	232	1	8	1	1	158,8389	57,2913	4,4734
10	1600	252	1	7	1	2	1114,178	50,6516	10,9532
11	1700	182	1	7	1	2	381,8624	46,2289	2,6629
12	3820	280	1	10	3	2	53,7045	33,7866	5,3266
13	3750	288	3	9	3	1	83,2576	35,5882	3,7827

* tipo de parto

1- vaginal

2- vaginal + fórceps

3- cesareo

ANEXO V

GRUPO II - SEPSE CLÍNICA

PAC	PN(g)	IG (días)	TP*	APGAR5	DIAGN (d)	FEBRE (1)	IL-6(pg/ml)	TNF(pg/ml)	IL-1(pg/ml)
1	2910	287	1	9	1	1	130,8377	21,6369	7,872
2	1930	245	3	9	3	1	27,4527	18,4706	1,5744
3	1820	245	3	9	2	1	36,1155	30,0064	3,685
4	3330	273	1	10	1	2	52,8695	21,9617	1,6956
5	4130	282	3	8	4	2	88,9013	44,0186	2,1111
6	3320	280	3	8	3	2	14,3998	17,7941	1,1
7	2650	255	3	6	1	2	107,658	11,5113	0,489
8	4050	250	3	8	1	2	46,2186	10,8416	2,9088
9	3380	266	3	8	2	1	143,9989	59,506	9,089
10	3850	287	3	9	1	1	27,3716	13,9726	8,4785
11	2770	245	1	8	1	1	3000	10,6185	3,22
12	1460	224	1	9	2	2	45,3297	16,218	1,565
13	1950	252	1	8	3	2	56,645	24,031	4,3509
14	3400	280	1	9	1	1	97,5256	17,118	6,6775
15	3130	266	3	9	1	2	3000	18,9221	9,7055
16	2430	252	3	9	3	2	39,9324	14,1968	4,3509
17	2600	259	2	4	1	1	3000	21,8636	350,1697
18	2900	266	1	10	1	2	518,144	16,893	1,6957
19	2200	237	3	9	1	1	92,6115	19,1479	7,3448
20	3220	279	3	9	1	2	71,6849	26,3631	19,074
21	2950	239	1	9	4	2	22,8214	28,934	13,409
22	1750	217	1	8	1	2	32,9048	28,934	16,47
23	3050	245	1	8	1	1	43,0447	21,4102	4,36
24	3850	288	3	9	2	1	49,6391	27,6453	19,074
25	3100	245	1	9	3	2	32,3515	21,9566	3,7545
26	4050	280	1	9	1	1	616,6699	34,3353	20,2555
27	4060	285	1	9	1	1	69,7249	20,5044	6,6676
28	1770	210	1	6	1	1	76,8776	18,5628	7,873
29	3530	280	1	9	2	2	33,6046	11,8978	2,9558
30	3100	224	1	9	2	2	137,8221	21,3209	3,2863
31	2970	288	1	5	1	1	2606,9605	23,2889	29,5232
32	3610	273	1	9	3	1	190,3495	16,6594	28,8105
33	3540	273	1	9	1	1	1454,8501	20,06	26,7902
34	1700	224	1	8	2	2	865,9011	22,1474	3,8294
35	2855	246	1	9	3	2	2403,5297	17,7909	7,151
36	3200	276	1	7	1	2	3000	30,0064	6,8

* tipo de parto

1- vaginal

2- vaginal + fórceps

3- cesareo

ANEXO VI

GRUPO III - SEPSE CLÍNICA + USO DE ATB MATERNO NO PERIPARTO

PAC	PN(g)	IG (dias)	TP*	APGAR 5	DIAG (d)	FEBRE (1)	IL-6(pg/ml)	TNF(pg/ml)	IL-1(pg/ml)
1	3950	287	2	3	1	1	3000	2516,2833	1270,5183
2	3950	259	3	10	3	2	59,2754	49,7651	2,1586
3	2350	286	3	9	2	1	126,2627	22,2524	3,11508
4	3550	276	3	9	2	2	46,8843	19,7621	1,7628
5	860	195	3	7	1	1	84,8956	20,8929	17,4734
6	2320	231	1	7	1	1	154,2765	16,1557	17,6277
7	2950	260	1	9	1	1	109,7328	15,931	2,7863
8	2000	234	3	8	1	2	36,3378	17,9565	2,1586
9	2850	287	1	8	1	1	2586,9516	22,7062	23,634
10	2840	289	1	9	1	1	78,855	38,6022	4,5264
11	2850	274	1	9	1	1	194,1538	39,5242	7,4898
12	3930	288	2	9	5	1	187,0675	9,7282	3,3541
13	940	158	1	8	1	1	3000	31,3836	85,6026
14	3820	276	1	4	1	2	148,1185	20,226	2,0579
15	1650	249	1	9	1	2	185,7875	11,6745	2,2604
16	2895	241	1	7	2	2	41,3978	23,3488	1,6666
17	3255	261	3	10	1	2	20,1965	10,7817	1,7627

* tipo de parto

1- vaginal

2- vaginal + fórceps

3- cesareo

ANEXO VII

GRUPO IV - CONTROLES

PAC	PN (g)	IG (dias)	TP*	APGAR5	DIAGN(d)	FEBRE (1)	IL-6 (pg/ml)	TNF (pg/ml)	IL-1(pg/ml)
1	1830	263	1	8	2	2	19,3915	11,5913	32,1871
2	3370	289	1	8	1	2	30,226	9,2222	2,7867
3	4000	285	1	9	1	2	55,6902	23,645	12,7225
4	3800	287	1	9	1	1	43,6415	37,9769	15,4175
5	2850	255	3	9	1	2		10,2873	7,08
6	4530	272	1	9	4	2	29,5964	8,9837	26,663
7	2620	259	1	9	2	2	66,1134	10,287	5,762
8	4020	288	1	9	2	2	45,2861	9,7282	0,9458
9	3460	278	3	9	3	2	14,9496	15,342	8,798
10	3200	278	3	9	1	2	42,1602	11,5937	7,719
11	2310	256	2	10	1	1	24,0355	9,9145	35,698
12	2760	245	2	10	1	2	102,1723	11,4069	5,8978
13	3270	273	3	9	1	2	68,8889	7,6829	8,1382
14	3940	287	2	8	1	2		8,9837	11,4419
15	2080	249	1	8	2	2	23,8117	20,06	2,1423
16	3440	270	3	9	1	2	32,6084	16,2827	4,3755
17	3240	263	3	8	1	2	283,799	6,9409	8,138
18	2820	255	1	10	5	2	17,5842	19,6812	0,8798
19	2750	280	1	9	3	2	51,3808	16,471	1,364
20	2830	281	3	9	1	2	23,1571	11,406	1,0112
21	3190	280	3	9	1	2		11,4069	6,0281
22	2500	275	1	10	2	2	21,3015	15,342	3,0022
23	2300	289	2	8	2	2	13,3878	17,9796	5,9831
24	3250	266	1	8	1	1	39,073	11,5937	5,5037
25	4270	272	1	9	1	2	153,6804	11,0335	1,4757
26	3240	279	1	9	1	2	72,2548	12,3415	0,9692
27	3870	287	2	7	2	2	51,3808	13,6524	2,039
28	2820	260	1	10	1	2	1,078	50,1395	1,078
29	3300	252	1	9	1	1	33,3898	7,4973	13,125
30	2980	280	1	10	1	2	38,6356	7,8686	10,119
31	2180	273	3	9	2	2	38,6356	9,3558	1,4957
32	3080	251	3	10	1	2	134,3456	7,6829	1,8878
33	1970	238	1	9	3	1	3,5662	7,8686	9,4583
34	3380	288	1	10	1	2	90,7732	15,1541	1,8751
35	3550	280	3	8	1	2	50,3624	11,8978	3,1434
36	2860	276	2	10	1	2	42,9748	31,3836	5,2878
37	3100	287	3	9	2	1	18,1003	22,4793	28,2737
38	3510	279	1	9	1	1	32,1827	21,7999	12,1669
39	3590	284	2	6	1	2	146,2513	20,892	5,5726
40	3380	280	1	8	1	2	56,1269	18,6331	17,2733
41	3770	273	2	7	1	1	91,2361	24,2966	13,394
42	2260	255	1	8	1	1	12,7197	13,9114	13,333
43	3330	281	3	9	1	2	9,3526	21,1194	10,06
44	3980	277	3	9	1	2	142,1748	25,4392	4,3112

Continuação Anexo VII

PAC	PN (g)	IG (dias)	TP*	APGAR5	DIAGN(d)	FEBRE (1)	IL-6 (pg/ml)	TNF (pg/ml)	IL-1(pg/ml)
45	3890	280	3	9	4	1	5,8277	17,0556	2,77
46	4040	283	1	9	2	2	34,3015	24,0692	3,1434
47	3020	266	3	10	2	2	14,6699	23,8418	11,001
48	3530	287	1	9	1	2	127,5715	26,3468	4,114
49	3415	277	3	9	1	1	63,8054	14,1355	3,72
50	2815	276	1	9	1	2	30,6223	14,8008	11,0019
51	3230	281	1	8	2	2	26,096	24,5241	5,866

* tipo de parto

1- vaginal

2- vaginal + fórceps

3- cesareo