



## A influência do tempo de coleta sobre os níveis de interleucina-6 na sepse neonatal precoce

*The role of sample collection timing on interleukin-6 levels in early-onset neonatal sepsis*

Renato S. Procianoy<sup>1</sup>, Rita C. Silveira<sup>2</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Avaliar os diferentes achados perinatais e o tempo da coleta da amostra em recém-nascidos com sepse neonatal precoce, comparando os recém-nascidos com nível baixo e alto de IL-6.

**Métodos:** Oitenta e cinco recém-nascidos com sinais clínicos de sepse e/ou hemoculturas positivas tiveram plasma coletado na avaliação inicial da sepse neonatal precoce nas primeiras 96 horas de vida. Foram divididos em: a) acima (grupo de nível elevado) e b) igual ou abaixo (grupo de nível baixo) da mediana da IL-6 do grupo total.

**Resultados:** A mediana da IL-6 para o grupo total foi de 89 pg/ml. Os grupos de nível elevado e de nível baixo foram constituídos por 42 e 43 recém-nascidos, respectivamente. Não houve diferença significativa entre ambos os grupos quanto a idade gestacional, peso de nascimento, proporção de parto cesariano, escores de Apgar, número de recém-nascidos cujas mães tiveram fator de risco para infecção, número de mães que receberam antibiótico intraparto e número de hemoculturas positivas. A mediana da IL-6 plasmática do grupo de nível elevado foi 287 pg/ml, e do grupo de nível baixo foi 46 pg/ml ( $p < 0,001$ ). A mediana do tempo de coleta foi 17,5 horas de vida no grupo de nível elevado e 36 horas de vida no grupo de nível baixo ( $p < 0,001$ ). Houve uma significativa correlação negativa entre níveis de IL-6 e tempo de coleta da amostra.

**Conclusão:** O tempo de coleta da amostra é um fator importante para a detecção de níveis elevados de IL-6 em recém-nascidos com sepse neonatal precoce.

*J Pediatr (Rio J). 2004;80(5):407-10: Citoquinas, sepse neonatal, infecção, interleucina-6.*

### Abstract

**Objective:** To assess different perinatal findings and sample collection timing in newborns with early-onset sepsis comparing those with low IL-6 levels to the ones with high levels.

**Methods:** Eighty-five newborn infants, with clinical signs of sepsis and/or positive blood cultures, had plasma IL-6 collected in the initial evaluation for early-onset sepsis in the first 96 hours of life. They were classified in two groups according to their plasma IL-6 levels: higher, and equal to or lower than IL-6 median value for the whole septic group

**Results:** Median IL-6 for the whole group was 89 pg/ml. High and low level groups were formed by 42 and 43 newborns respectively. There were no differences between the two groups regarding gestational ages, birth weights, cesarean-section proportion, Apgar scores, number of neonates with maternal risk factors for infection, number of maternal intrapartum antibiotic therapy, and number of positive blood cultures. Median plasma IL-6 in the high level group was 287 pg/ml, and in the low level group 46 pg/ml ( $p < 0.001$ ). Median sample timing was 17.5 hours of life for the high level group and 36 hours of life for the low level group ( $p < 0.001$ ). There was a significant negative correlation coefficient between IL-6 levels and sample collection timing.

**Conclusion:** Sample collection timing is an important factor for detection of high plasma IL-6 level in newborn infants with early-onset sepsis.

*J Pediatr (Rio J). 2004;80(5):407-10: Cytokines, neonatal sepsis, infection, interleukin-6.*

1. Professor titular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Chefe do Serviço de Neonatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS.
2. PhD. Neonatologista, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS.

Apoio financeiro: este projeto foi parcialmente financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) processo nº 99069.

Artigo submetido em 05.04.04, aceito em 09.06.04.

**Como citar este artigo:** Procianoy RS, Silveira RC. A influência do tempo de coleta sobre os níveis de interleucina-6 na sepse neonatal precoce. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:407-10.

### Introdução

A resposta inflamatória é mediada pelas citocinas usadas como marcadores da infecção neonatal, especialmente a interleucina-6 (IL-6). A IL-6 é uma indutora da síntese hepática de proteínas, promove a produção e liberação da proteína C reativa, e pode ser detectada precocemente quando houver invasão bacteriana na corrente sanguínea. Ela atua como um sinal para a ativação das células T, promove a secreção de anticorpos pelas células B e a diferenciação das células T citotóxicas, e estimula a liberação de outras citocinas, em especial da TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ <sup>1-5</sup>.

A IL-6 é um marcador precoce da sepse neonatal. Vários estudos têm demonstrado sensibilidade em torno de 75 a 90% nas primeiras 24 horas da infecção neonatal, e uma redução abrupta 48 horas após o início da manifestação clínica<sup>1-9</sup>. Estudos recentes mostram altos níveis de IL-6 no sangue do cordão umbilical em recém-nascidos com sepse neonatal precoce cujas mães tiveram corioamnionite<sup>10-11</sup>. Entretanto, muito embora alguns recém-nascidos tenham apresentado infecção neonatal, eles apresentaram baixos níveis plasmáticos de IL-6<sup>12</sup>.

O objetivo deste estudo é avaliar os diferentes achados perinatais e o tempo da coleta da amostra em recém-nascidos com sepse neonatal precoce comparando os com nível baixo e alto de IL-6.

### **Pacientes e métodos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e um consentimento informado foi obtido dos pais ou responsáveis pelos pacientes. As amostras foram coletadas antes do início da antibioticoterapia, juntamente com a coleta de sangue para exames de rotina.

### **População estudada**

Um estudo prospectivo foi realizado a fim de avaliar consecutivamente os recém-nascidos com idade gestacional igual ou superior a 34 semanas nascidos no centro obstétrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e admitidos na unidade de tratamento intensivo neonatal com diagnóstico de sepse neonatal precoce, a qual foi determinada pela manifestação clínica e/ou hemocultura positiva nas primeiras 96 horas de vida. Todos os recém-nascidos foram submetidos a uma coleta adicional de sangue para a determinação de IL-6 no momento da suspeita clínica de infecção.

Os critérios de exclusão foram escore de Apgar menor que 8 aos 5 minutos de vida, evidências clínicas ou laboratoriais de infecção congênita, má formação congênita, sífilis materna, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes vírus 1 e 2 durante a gestação, mães HIV positivas, e uso pré e pós-natal de corticosteróides.

Os critérios para o diagnóstico de sepse foram os seguintes: presença de hemocultura positiva, ou hemocultura negativa quando o recém-nascido apresentava sinais clínicos de infecção. No último caso, o diagnóstico foi definido pela presença de três ou mais dos seguintes fatores<sup>2,6</sup>: a) fatores de risco maternos tais como febre, ruptura prematura de membranas por um período maior que 18 horas, e infecção urinária; b) achados clínicos tais como apnéia, dificuldade de respirar, cianose, taquicardia ou bradicardia, déficit de perfusão ou choque; irritabilidade, letargia; hipotonia, convulsões; distensão abdominal, vômito, intolerância a alimentos, resíduo gástrico, hepatomegalia; icterícia sem causa definida; temperatura instável; petéquias ou púrpura; e uma aparência geral de quem "não está se sentindo bem".

### **Classificação dos recém-nascidos**

Os recém-nascidos foram classificados em dois grupos de acordo com seus níveis plasmáticos de IL-6: superiores, e iguais ou inferiores à mediana da IL-6 do grupo total.

Grupo de nível elevado: recém-nascidos com sepse com níveis de IL-6 mais altos que a mediana do grupo total.

Grupo de nível baixo: recém-nascidos com sepse com níveis de IL-6 iguais ou inferiores à mediana do grupo total.

### **Determinação dos níveis plasmáticos de IL-6**

As amostras de sangue (100 l) foram coletadas em tubos com EDTA e imediatamente centrifugadas; o plasma foi congelado a -70 °C. Nenhuma venopunção foi realizada apenas por causa do estudo.

Os níveis de IL-6 foram medidos utilizando-se um imunoenensaio enzimático (*Quantikine Human IL-6 R & D Systems, Inc. MN, USA*). O limite de detecção foi de 0,7 pg/ml, com coeficientes de variação intra e interensaios menores que 5%. As leituras foram feitas em um leitor óptico automático Spectramax a 570 nm.

### **Análise estatística**

Os resultados estão expressos como média±desvio padrão (DP) ou medianas e amplitude interquartil (p25-p75). As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste *t* de Student. O teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher foram utilizados para tabelas 2x2.

Uma vez que as funções logarítmicas foram empregadas para a comparação dos níveis de IL-6 nos dois grupos, foi possível usar o teste *t* de Student para as amostras independentes. O teste de Mann-Whitney foi usado para as diferenças no tempo de coleta da amostra. O coeficiente de correlação linear de Pearson foi calculado para IL-6 e tempo de coleta. O nível de significância foi estabelecido em < 0,05.

A amostra incluiu um total de 60 pacientes, considerando-se um nível de significância de 0,05, poder de 90%, e uma diferença de 20% nos níveis de IL-6 entre ambos os grupos.

### **Resultados**

Oitenta e cinco recém-nascidos diagnosticados com sepse neonatal precoce participaram do estudo. A mediana da IL-6 do grupo total foi de 89 pg/ml. O grupo de nível elevado (IL-6  $\geq$  89 pg/ml) foi constituído de 42 recém-nascidos, e o grupo de nível baixo (IL-6 < 89 pg/ml) incluiu 43 recém-nascidos.

Os fatores de risco maternos para infecção foram encontrados em 59 (69%) recém-nascidos: corioamnionite clínica em 15, corioamnionite clínica associada à infecção urinária em sete, ruptura prematura de membranas > 18 horas em 11, ruptura prematura de membranas associada à infecção urinária em sete, infecção urinária em 14, e febre em cinco.

Houve semelhança entre os dois grupos quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, proporção de parto cesariano, escores de Apgar, número de recém-nascidos com fatores de risco maternos para infecção, e número de hemoculturas positivas. Dezoito pacientes tiveram hemocultura positiva, nove em cada grupo com a seguinte distribuição: estafilococo do grupo B em sete (39%), *Staphylococcus aureus* em oito (44%), estafilococo coagulase-negativo em um, *Enterococcus faecalis* em um, e bacilo gram-negativo oxidase-negativo em um. Não houve diferenças entre os grupos em relação às mães tratadas com antibióticos (ampicilina) intraparto: 12 mães receberam antibióticos no grupo de nível elevado e 10 mães no grupo de nível baixo (Tabela 1).

A mediana da IL-6 no grupo de nível elevado foi de 287 pg/ml e de 46 pg/ml no grupo de nível baixo, e o tempo mediano de coleta da amostra foi 17,5 horas de vida para o grupo de nível elevado e de 36 para o grupo de nível baixo. Essas diferenças foram estatisticamente significantes (Tabela 1). Houve um coeficiente de correlação negativo significativo entre os níveis de IL-6 e o tempo de coleta da amostra ( $r = -0,4$ ,  $p < 0,001$ ).

Quando consideramos apenas recém-nascidos com hemoculturas positivas, as diferenças no tempo mediano da amostra também foram estatisticamente significantes: 20 e 77 horas de vida para os grupos de nível elevado e baixo, respectivamente ( $p < 0,001$ ).

Os níveis medianos de IL-6 foram semelhantes nos recém-nascidos com sepse com ou sem hemocultura positiva: 108 e 121 pg/ml, respectivamente.

## Discussão

A IL-6 é um mediador inflamatório neonatal importante. Vários estudos mostram uma elevação nos níveis plasmáticos da IL-6 em recém-nascidos com sepse<sup>6,13,14</sup>. O equilíbrio entre as citocinas pró e antiinflamatórias é determinante para seus níveis plasmáticos. Um nível plasmático de IL-10 baixo em recém-nascidos infectados contribui para um aumento da IL-6<sup>4,15,16</sup>.

Em estudos com animais, os níveis máximos de IL-6 são atingidos três horas e meia após endotoxemia provocada. Seis horas mais tarde, os níveis já se encontram muito baixos<sup>17</sup>. O tempo de coleta das amostras é um fator importante que deve ser considerado para a detecção do pico de IL-6 na sepse.

Lactentes com sepse neonatal precoce geralmente apresentam fatores de risco maternos para infecção; eles são geralmente contaminados no útero ou durante o trabalho de parto e no parto<sup>18</sup>. O aumento dos mediadores inflamatórios provavelmente ocorrerá no início da doença<sup>10,19</sup>.

Estudamos recém-nascidos com idade gestacional igual ou superior a 34 semanas que apresentaram sepse neonatal precoce definida pela manifestação clínica e/ou hemocultura positiva nas primeiras 96 horas de vida. Os recém-nascidos com sepse foram divididos em dois grupos utilizando-se a mediana da IL-6 do grupo total como ponto de corte. Os recém-nascidos com níveis baixos e altos de IL-6 foram semelhantes no que diz respeito a todas as características avaliadas, com exceção do tempo de coleta da amostra.

Como o nosso objetivo foi comparar os altos e baixos níveis de IL-6 em recém-nascidos com sepse neonatal

**Tabela 1** - Dados clínicos e laboratoriais dos recém-nascidos estudados

	Grupo de nível elevado	Grupo de nível baixo
Número de recém-nascidos	42	43
Peso ao nascer (gramas)	3.002±745	3.054±710
Idade gestacional (semanas)	38,3±1,9	38,3±2,2
Parto cesariano	14 (33%)	15 (35%)
Apgar de 5 min	9 (8-10)	9 (8-10)
Antibioticoterapia intraparto	12 (28,5%)	10 (23,3%)
Fatores de risco maternos para infecção	31 (73,8%)	28 (65%)
Tempo de coleta (horas de vida) *	17,5 (12-24) [4-77]	36 (21-57) [3-96]
Níveis de IL-6 (pg/ml) *	287 (149-1,455) [90-3.000]	46 (33,6-69,7) [14-89]

Dados expressos como média±desvio padrão ou mediana com amplitude interquartil (p25-p75) e [variação: min-max].

\* Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0,001$ .

precoce em relação aos diferentes achados perinatais e tempo de coleta da amostra, e como já se sabe que os níveis de IL-6 são altos em recém-nascidos infectados, achamos que não era necessário incluir um grupo de controle no estudo<sup>5-9</sup>.

Lactentes muito prematuros e aqueles cujas mães tiveram exposição pré-natal a corticosteróides não foram incluídos no estudo. Um estudo *ex vivo* mostrou um nível reduzido de IL-6 em monócitos desses lactentes em comparação a recém-nascidos a termo ou quase termo, e adultos<sup>20</sup>.

Recentemente, demonstramos que lactentes nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica têm altos níveis de IL-6 no plasma e no líquido, mostrando que a produção local de IL-6 no cérebro dos recém-nascidos é muito significativa<sup>21</sup>. Portanto, lactentes com sepse e asfíxia não foram incluídos neste estudo.

Embora as amostras de sangue tenham sido coletadas logo que os achados clínicos de sepse foram detectados, os níveis mais baixos de IL-6 foram observados em recém-nascidos cuja coleta foi realizada após mais de 24 horas de vida. Como a maioria dos pacientes incluída neste estudo apresentou manifestação clínica precocemente, acreditamos que a origem da sepse tenha sido perinatal na maioria deles<sup>22</sup>. Desta forma, as manifestações clínicas podem aparecer várias horas após a invasão bacteriana.

No momento, a aplicabilidade clínica das citocinas não é prática porque o imunoenensaio enzimático é oneroso e requer várias horas para ser realizado. Um ensaio que seja automático e que possa ser utilizado prontamente se faz necessário para fins clínicos, e deverá estar acessível no futuro<sup>19</sup>.

Demonstramos que a IL-6 é um marcador bastante precoce e sensível para sepse neonatal<sup>5</sup>, e sugerimos que a presença de fatores de risco maternos ou qualquer sinal clínico neonatal sutil seja suficiente para a indicação da coleta de amostra de IL-6 para que se estabeleça um diagnóstico bastante precoce da sepse. Portanto, nossos dados sugerem que altos níveis de IL-6 em recém-nascidos com sepse neonatal precoce estão relacionados à coleta precoce de amostras nas primeiras 24 horas de vida.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Prof. Isaura Riedl pela revisão do inglês.

### Referências

- Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989;74:1-10.
- Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol*. 1991;18:361-81.
- Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol*. 1992;51:153-80.
- Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol*. 1996;105:589-98.
- Buck C, Bundschu J, Gallati H, Bartman P, Pohlandt F. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics*. 1994;93:54-8.
- Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr*. 1999;88:647-50.
- Panero A, Pacifico L, Rossi N, Mancuso G, Stegagno M, Chiesa C. Interleukin-6 in neonates with early and late onset infection. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:370-7.
- de Bont ES, Martens A, van Raan J, Samson G, Fetter WP, Okken A, et al. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in newborn with sepsis. *Acta Paediatr*. 1994;83:696-9.
- Mehr S, Doyle LW. Cytokines as marker of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:879-87.
- Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SY, Kim CJ, et al. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin-6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183:1124-9.
- Naccasha N, Hinson R, Montag A, Ismail M, Bentz L, Mittendorf R. Association between funisitis and elevated interleukin-6 in cord blood. *Obstet Gynecol*. 2001;97:220-4.
- Reyes CS, García-Muñoz, Reyes D, Gonzales G, Dominguez C, Domenech E. Role of cytokines (interleukin-1 $\beta$ , 6, 8, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and soluble receptor of interleukin-2) and C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr*. 2003;92:221-7.
- Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, et al. C-Reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem*. 2003;49:60-8.
- Dollner H, Vatten L, Austgulen R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis: Comparing C-reactive protein, interleukin-6 soluble tumor necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *J Clin Epidemiol*. 2001;54:1251-7.
- Messer J, Eyer D, Donato L, Gallati H, Matis J, Simeoni U. Evaluation of IL-6 and soluble of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr*. 1996;129:574-80.
- Damman O, Leviton A. Brain damage in preterm newborns: Biological response modification as a strategy to reduce disabilities. *J Pediatr*. 2000;136:433-8.
- Anderson MR, Blumer JL. Advances in the therapy for sepsis in children. *Pediatr Clin North Am*. 1997;44:179-86.
- Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkrantz RA, et al. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*. 2002;347:240-7.
- Shalak LF, Lupton AR, Jafri HS, Ramilo O, Perlman JM. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. *Pediatrics*. 2002;110:637-80.
- Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Möller JC, Bucsky P. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res*. 2002;51:317-22.
- Silveira RC, Procianoy RS. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in plasma and cerebrospinal fluid of term newborn infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2003;143:625-9.
- Klein JO. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infants*. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2001. p. 943-998.

Endereço para correspondência:

Renato S. Procianoy  
Rua Tobias da Silva, 99/302  
CEP 90570-020 - Porto Alegre, RS  
Fone: (51) 3222.7889 - Fax: (51) 3331.2738  
E-mail: renatosp@terra.com.br