

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

***PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E INTERLEUCINAS 6 E 10 EM  
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL PARA DIAGNÓSTICO DE SEPSE  
NEONATAL***

**ANA CAROLINA LOBOR CANCELIER**

**CRICIÚMA – SANTA CATARINA**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

***PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E INTERLEUCINAS 6 E 10 EM  
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL PARA DIAGNÓSTICO DE SEPSE  
NEONATAL***

**ANA CAROLINA LOBOR CANCELIER**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em ciências da Saúde  
como requisito para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr Felipe Dal Pizzol  
Co-orientadora: Prof. Dra. Silvana de Almeida

CRICIÚMA – SANTA CATARINA

**2006**

### ***DEDICATÓRIA***

Dedico esse trabalho aos meus pais, Natália e Rogério, que estiveram sempre ao meu lado, me incentivando em tudo que eu sempre quis ser e fazer e sendo para mim durante todos esses anos os pilares de minha vida pessoal e profissional. Obrigada por serem meus pais e por terem desempenhado com tanto amor e compreensão esse papel. Nunca será muito repetir que amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Felipe Dal-Pizzol, pelo empenho em me iniciar na pesquisa. Suas qualidades como pesquisador não caberiam nesse espaço e muito me honrou em ter me aceitado como orientanda.

À minha co-orientadora, Dra Silvana de Almeida, pela paciência em me explicar coisas que realmente ainda não existiam em minha cabeça e por ter conseguido me fazer entender um pouco da complexidade da Biologia molecular.

A todos os envolvidos no Programa de pós-graduação, sempre gentis e solícitos em resolver problemas – e acreditem foram muitos.

Ao Laboratório Santa Catarina, na figura do Bqco. Responsável José Carlos Mamprim, pela disponibilidade em auxiliar na coleta e armazenamento das amostras durante todo o período do estudo.

Aos colegas do mestrado, em especial Luciano, Zélia e Alexandre, companheiros de carona na BR 101 e de reclamações e alegrias.

Ao meu marido, Lawrence, por ter entendido que essa etapa foi importante e necessária à minha vida profissional e ter sido paciente com as muitas horas em que não pude estar com ele.

À minha filha, Ana Laura, meu pedacinho de céu, que, mesmo sem entender muito bem o que acontecia dizia; “Já sei mamãe. Estás terminando teus negócios e não podes brincar agora, né?” Tenha certeza que estarei sempre ao teu lado.

## PARTE I

## RESUMO

**Introdução:** A sepse neonatal é causa importante de morbidade e mortalidade em unidades de neonatologia. Apesar da evolução na terapêutica da sepse e no suporte de recém-nascidos graves, o período neonatal ainda concentra a maior faixa de mortalidade infantil. Entretanto, a maior dificuldade ainda reside na inexistência de um teste diagnóstico que diferencie corretamente a sepse neonatal de início precoce dentre outras situações não infecciosas cujas manifestações clínicas podem ser indistinguíveis.

**Objetivos:** Este trabalho teve como objetivo determinar se marcadores de estresse oxidativo e interleucinas 6 e 10 em sangue de cordão, coletados em neonatos com fatores de risco para sepse neonatal, podem ser utilizados como teste diagnóstico precoce da sepse neonatal.

**Metodologia:** Estudo tipo caso e controle englobado numa coorte. Foi coletado sangue de cordão umbilical de neonatos prematuros com ao menos um outro fator de risco para sepse neonatal. Os bebês foram acompanhados até sua alta para avaliar se desenvolveram sepse (segundo critérios do Consenso 2005) e a evolução do quadro séptico (óbito ou sobrevivência). Foram considerados controles os pacientes prematuros com fatores de risco que não desenvolveram sepse. Foram dosadas interleucinas 6 e 10 e marcadores de estresse oxidativo (TBARS e carbonil) e comparados casos e controles, bem como dentre os sépticos aqueles que evoluíram para óbito e não. Foram utilizados os testes ANOVA uma via, qui-quadrado e análise discriminante para diferença entre grupos, todos com nível de significância de 95%. A curva ROC foi utilizada para avaliar sensibilidade e especificidade dos testes e determinar pontos de corte para cada marcador.

**Resultados:** Foram englobados 40 casos e 80 controles. Os casos apresentaram médias de marcadores de estresse oxidativo e interleucinas 6 e 10 significativamente mais elevadas que os controles. A análise discriminante revelou que a diferença entre idades gestacionais de casos e controles não é significativa. Utilizando a curva ROC, os melhores pontos de corte para IL6, IL10, TBARS e carbonil são respectivamente 74,5 pg/ml, 77,5 pg/ml, 6,15 nM/mg proteínas e 1,37 nM/mg proteínas. IL6 e TBARS apresentaram áreas sob a curva ROC semelhantes. A interleucina 6 foi significativamente mais elevada em sépticos que evoluíram para óbito que nos sobreviventes.

**Conclusão:** Em neonatos com fatores de risco para sepse neonatal precoce, as dosagens de IL6, IL10, TBARS e carbonil em sangue de cordão umbilical podem prever ao nascimento desenvolvimento de sepse nas primeiras 72 horas de vida. O nível de IL6 tem valor prognóstico nos pacientes sépticos.

**Palavras-chave:** sepse neonatal, fatores de risco

## ABSTRACT

**Background:** Neonatal sepsis is a frequent and serious threat to survival during early stages of life in neonatal intensive care units. Despite the evolution in the therapeutic of sepsis and the development of supportive care of high risk neonates, neonatal age remains the period of higher levels of mortality in childhood. Clinical diagnosis of sepsis in newborn infants is difficult, because symptoms and signs are non-specific and there are no diagnostic tools to differentiate correctly sepsis from other neonatal conditions.

**Objective:** To determine if oxidative stress markers and interleukin 6 (IL6) and interleukin 10 (IL10) in cord blood can be used as early diagnostic tool in neonatal sepsis

**Methods:** Case-control study. It was collected blood from umbilical cord of premature neonates with at least one other risk factor for neonatal sepsis. Babies were followed until discharge to evaluate if they developed sepsis (using 2005 consensus criteria) and outcome of septic episode (death or survive). Were controls those neonates with risk factors that do not developed sepsis. It were performed dosage of IL6 and IL10 and oxidative stress (TBARS and carbonyl) markers and compared to controls, as so among septic babies those whom died and not. The statistical tests were one-way ANOVA, chi-square and discriminant analysis, all with significance level of 95%. Receiver operated characteristic (ROC) curve was used to evaluate sensitivity and specificity of test and to determine cut-off point of each marker.

**Results:** There were 40 cases and 80 controls. Cases presented means of oxidative stress and IL6 and IL10 more elevated than controls ( $p < 0,01$ ). Discriminant analysis revealed that differences among gestational ages of cases and controls is not significative. Using ROC curve, the better threshold levels to IL6, IL10 TBARS e carbonyl are respectively 74,5 pg/ml, 77,5 pg/ml, 6,15 nM/mg protein and 1,37 nM/mg protein. IL6 e TBARS presented similar areas under ROC curve. IL6 was more elevated in septic neonates who died.

**Conclusion:** In neonates with risk factors to early-onset neonatal sepsis, dosage of IL6, IL10, TBARS and carbonyl in cord blood can predict at born the development of sepsis in first 72 hours of life, before the beginning of symptoms. IL6 level have prognostic value in septic neonates.

**Key-words:** neonatal sepsis, risk factors



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

IL6 – Interleucina 6

IL10 – Interleucina 10

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UTIN – Unidade de terapia intensiva neonatal

RN- recém-nascido

EGB – Estreptococo do grupo B

PCR – proteína - C – reativa

TNF – fator de necrose tumoral

LPS – lipopolissacáride

ERO – espécies reativas de oxigênio

NFκB – fator nuclear κB

## 1 INTRODUÇÃO

Sepse descreve uma síndrome clínica complexa resultante de uma resposta agressiva do hospedeiro a um agente infeccioso. Na faixa pediátrica continua sendo uma importante causa de óbito, particularmente no período neonatal, faixa etária na qual ainda não se fizeram sentir as medidas para redução da mortalidade infantil como em outras idades (Rodriguez, Garcia e Castellon,2003).

A sepse neonatal precoce é ocasionada por microorganismos de origem materna, usualmente com manifestações até 72 horas de vida. Um dos mais importantes patógenos envolvidos é o Estreptococo do grupo B (*Streptococcus agalactie*), além de outros patógenos presentes no trato uro-genital materno, como a *Lysteria monocitogenes* e a *Escherichia coli*. Recém-nascidos que permanecem internados em UTIN, tornam-se colonizados pelas bactérias prevalentes na unidade, caracterizando o que se convencionou chamar de sepse tardia (Velaphi et all, 2003; Stoll et all, 2002).

A importância do EGB como agente etiológico da sepse neonatal precoce é tanta que motivou o desenvolvimento de estratégias de quimioprofilaxia, objetivando a redução da infecção neonatal pela referida bactéria. O EGB tem como principal reservatório humano os adultos, na sua maioria assintomáticos. No caso da gestante colonizada, o principal problema é a transmissão do EGB para o concepto, o que ocorre predominantemente durante o trabalho de parto. Um pequeno número de fetos pode ser infectado intra-uterinamente, ocasionando

pneumonia e em alguns casos perda fetal em decorrência da gravidade da infecção (Vechio et all, 2004; Oddie, 2002).

A sepse neonatal, em particular a de origem precoce, pode acometer qualquer RN, entretanto alguns fatores de risco podem estar associados, destacando-se o baixo peso ao nascer, a prematuridade, a ruptura de membranas amnióticas mais de 18 horas antes do nascimento, febre durante o trabalho de parto e corioamnionite (Benitz e Druzin, 1999). Entretanto, o fator mais importante é a colonização materna pelo EGB, suficiente para determinar a necessidade de descolonização quando detectada no pré-natal, como seria o adequado. A implementação de estratégias de quimioprofilaxia materna em vários países reduziu as taxas de infecção pelo EGB no período neonatal (Velaphi et all, 2003).

Países que já instituíram rotineiramente a quimioprofilaxia contra o EGB estão vendo uma mudança nos patógenos envolvidos na sepse neonatal precoce, particularmente um aumento dos casos de infecção pela *Escherichia coli* resistente à ampicilina e pelo Estreptococo do grupo A (Miyari, Protic e Belko, 2004).

Apesar da baixa incidência em países desenvolvidos, chegando no máximo a 5 casos por 1000 nascidos vivos, a mortalidade pode alcançar taxas de 50%. Soma-se à alta letalidade o fato de acometer muitas vezes bebês a termo ou próximos ao termo, nos quais as complicações associadas à prematuridade praticamente inexistem (Benitz e Druzin, 1999). Com a instituição da antibioticoprofilaxia, nos Estados Unidos houve uma redução da incidência de 3 para 0,4 a cada 1000 nascidos vivos (Velaphi et all, 2003). Estudos realizados no Brasil encontraram incidência variável entre 1 e 1,4 para 1000 nascidos vivos (Calil et all, 2000; Miura e Martin, 2001), taxa inferior à encontrada nos EUA antes

da profilaxia, porém bastante superior aos números pós-advento da profilaxia ( Stoll et all, 2002; Polin, 2003). Na Índia a incidência alcança taxa de 20,7 para cada 1000 nascidos vivos, com letalidade de 19,4% (Chacko e Sohi, 2005).

### **1.1 Diagnóstico da sepse neonatal**

Descartar um quadro infeccioso é o objetivo primordial quando se depara com neonatos que apresentem sinais e sintomas inespecíficos, ou fatores de risco maternos para sepse neonatal. Habitualmente , quando da suspeita clínica de sepse, são solicitados vários testes diagnósticos, iniciando-se pelo hemograma e contagem de plaquetas, proteínas de fase aguda e mais recentemente dosagem de interleucinas. O teste considerado padrão ouro é a hemocultura, cujo resultado pode não ser disponível até sete dias após sua coleta, dependendo da técnica laboratorial utilizada. Nos melhores centros a positividade chega a 50%, devido tanto a diferenças nos meios de cultura quanto à quantidade de sangue coletado, o que se torna um problema principalmente em prematuros (Ng, 2004). Os antibióticos são iniciados quando houver forte suspeita e suspensos quando os exames laboratoriais e o quadro clínico permitirem. Nesse ponto vale ressaltar que num bebê sintomático, a antibioticoterapia é mantida a despeito dos exames laboratoriais. Inversamente, a ausência de sintomas num bebê com fatores de risco para sepse acaba por remeter à necessidade de exames para descartar a presença de infecção (Escobar, 1999; Escobar et all, 2000; Bizarro et all, 2005).

O neonato pode apresentar sinais e sintomas sugestivos de sepse em várias situações que nada têm a ver com infecção, como a hipotermia, estresse ambiental e cardiopatias congênitas. Ao se focar as atenções apenas para a

população de prematuros, as incertezas se tornam ainda maiores e as conseqüências de um retardo de diagnóstico são ainda mais catastróficas (Chacko e Sohi, 2005; Bizarro et al, 2005). Estudo realizado em Ribeirão Preto evidenciou tal realidade numa amostra de 261 neonatos com diagnóstico inicial de desconforto respiratório e cujas mães não receberam antibióticos profiláticos antes do nascimento dos bebês. Observou que 94% deles eram prematuros, que em 38,7% apresentavam sinais de infecção presumida e em 11,9% confirmada através de hemocultura, sendo gram positivos os agentes mais freqüentes (Mussi-Pinhata et al, 2004).

Segundo o Consenso de Sepsis, sua confirmação ocorre quando da presença de processo infeccioso comprovado por cultura (Bone, Sprung, Sibbald, 1992).

Em 2001 foi realizada uma conferência para se estabelecer critérios diagnósticos para sepsis em pediatria que acabou por confirmar os já estabelecidos no consenso anterior (Goldstein, Giroir e Randolph, 2005).

Vários estudos vêm sendo realizados para tentar estabelecer que teste ou combinação de testes poderia diagnosticar precoce e corretamente os quadros de sepsis neonatal. E ainda mais, naqueles neonatos com fatores de risco maternos mas sem sinais clínicos de infecção, que marcadores seriam considerados indispensáveis para dar início à antibioticoterapia (Ng, 2004; Gerdes, 1991).

A utilização do hemograma completo para diagnosticar sepsis já é estabelecida na literatura como sendo um dos primeiros testes laboratoriais solicitados, principalmente por seu baixo custo e facilidade técnica. A somatória de contagem de células brancas no sangue com medidas seriadas de PCR parece dar uma boa idéia de quais bebês poderiam ser considerados sépticos. Entretanto,

a PCR não se elevará até que se passem 12 a 48 horas após o início do processo infeccioso, elevação esta induzida principalmente pela IL6. Ainda no hemograma, a relação entre neutrófilos imaturos e maduros, denominado índice neutrofílico, é sensível mas pouco específico e com alta variabilidade entre observadores (Manroe et al, 1979; Griffin et al, 2003).

Atualmente a utilização de marcadores inflamatórios vem auxiliando no diagnóstico precoce da sepse neonatal. O TNF, apesar de útil, pois se eleva sempre nos neonatos sépticos, tem uma meia-vida muito curta e um início de produção extremamente precoce, muitas vezes quando ainda não se tem a suspeita clínica (Kilpatrick e Harris, 1998). Após a ação do TNF inicia-se a elevação da Interleucina-1- $\beta$  (IL1) e Interleucina-6 (IL6). Juntos, TNF, IL1 e IL6 induzem a liberação de proteínas de fase aguda, particularmente a PCR, e a IL6 também atua inibindo a liberação de TNF e IL1, num mecanismo de *feedback* negativo que impede, juntamente com as interleucinas antiinflamatórias, a perpetuação da resposta imuno-inflamatória (Girardini et al, 1993).

Neonatos sépticos já apresentam níveis elevados de interleucinas no sangue de cordão, mas não de PCR, provavelmente por ser um marcador mais tardio, dependendo de uma contaminação fetal num tempo maior antes do nascimento (Krueger et al, 2001). Essa observação seria útil no diagnóstico de sepse em neonatos com fatores de risco para tal, demandando a coleta do sangue de cordão. A detecção no plasma materno de níveis elevados de IL6 pode ser capaz de sugerir complicações infecciosas neonatais em gestantes com ruptura prematura de membranas (Lewis et al, 2001). Entretanto, nos casos em que não se identificam fatores de risco, a coleta acaba sendo retardada para quando se suspeita de infecção.

Na suspeita de sepse, a utilização de uma combinação de PCR e dosagem de IL6 parece ser o melhor marcador diagnóstico, principalmente se analisados marcadores em separado (Bontet all, 1993; Bont et all, 1994). Dos marcadores inflamatórios, IL1 e IL6 são os mais difundidos e refletem uma maior capacidade neonatal de expressão de mediadores pró-inflamatórios de primeira e segunda linha, com menor expressão de Interleucina-12 e Interleucina-8 (Berner, Welter e Brandi, 2001; Reyes et all, 2003). A IL6 é mais específica e eleva-se em neonatos sépticos, enquanto a IL1 eleva-se também em quadros febris não infecciosos no período neonatal (Dollner, Vatten e Austgulen, 2001).

## **1.2 Interleucinas no diagnóstico da sepse neonatal**

A ativação do sistema imune por microorganismos leva à liberação de uma série de mediadores. Os denominados de primeira linha são TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6, todos com ação pró-inflamatória, com intuito de combater o agente infeccioso e recrutar mais células de defesa para o local da agressão (Kilpatrick, Harris, 1998).

O TNF $\alpha$  é quimiotático para monócitos e neutrófilos, induzindo fagocitose, aderência dessas células ao endotélio e geração de radicais livres de oxigênio (RLO). Na parede endotelial ele é responsável por aumentar a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão (Kilpatrick, Harris, 1998). O TNF $\alpha$  também estimulará a liberação de IL8 e outras citocinas quimiotáticas, que ampliarão a resposta inflamatória. O LPS é um dos maiores indutores de produção de TNF $\alpha$ , razão pela qual tal citocina vem sendo constantemente aventada como um dos mais importantes mediadores do choque séptico. Aparentemente essa resposta precoce de instabilidade hemodinâmica é devida à excessiva e precoce

liberação de TNF $\alpha$ , o qual é liberado minutos após a exposição ao antígeno, porém seus níveis séricos podem tornar-se indetectáveis após 3 a 4 horas do início do processo infeccioso. O TNF $\alpha$  também é responsável pela liberação de IL10, uma citocina com ação antiinflamatória (Bont, Martens, Raan et al, 1994).

A IL1 $\beta$  foi descrita inicialmente na patogênese da febre. Presente principalmente em monócitos, macrófagos e células dendríticas, praticamente todos os microorganismos e seus produtos podem induzir sua liberação. Também considerada citocina pró-inflamatória de liberação precoce, atua em sinergismo com o TNF $\alpha$ , deflagrando a resposta inflamatória. Os níveis de IL1 $\beta$  começam a diminuir 4 a 8 horas após o insulto infeccioso (Cannon, Tompkins, Gelfand et al, 1990).

Atuando sinergicamente, TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  estimulam a liberação de IL6, a qual se dá principalmente pelos macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Uma de suas ações seria a indução da diferenciação dos linfócitos B em anticorpos específicos, além de atuar de maneira semelhante ao TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , aumentando a proliferação de timócitos (Reyes, Muñoz, Reyes et al, 2003). A IL6 estimula a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos após agressão, além de ser a única citocina capaz de induzir a regeneração hepática após lesão (Giardini, Berner, Grau, 1990).

Há alguns anos vêm-se tentando utilizar as citocinas como marcadores precoces de sepse neonatal, e IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL6 estão sendo considerados candidatos promissores. Chama a atenção entretanto que, quando já existirem sinais clínicos de infecção tais citocinas não parecem ser mais úteis que a PCR. Mais ainda, a IL6 parece elevar-se até de 2 a 4 dias antes do aparecimento dos



sintomas, entretanto seus níveis caem após 24 horas do estabelecimento da sepse (Bhartiya, Kapadia, sanghvi et all, 2000; Buck, Budunshi, Barckmann,1994).

### **1.3 Estresse oxidativo e sepse neonatal**

A resposta inflamatória determina a liberação de radicais livres de oxigênio, os quais mantêm um círculo vicioso de lesão-inflamação-ativação de fatores nucleares. Nesse ponto, muito se tem estudado a respeito do estresse oxidativo na sepse. A sepse gera um estado de desequilíbrio entre a produção de oxidantes e anti-oxidantes, gerando um excesso de radicais livres de oxigênio. Essas moléculas têm a função de destruir o agente agressor, entretanto não são específicas e acabam por determinar lesão também no hospedeiro (Macdonald, Webster 2003) .

O neonato apresenta níveis basais de marcadores de estresse oxidativo mais elevados, em parte pela transição da vida intra-uterina, na qual existem baixos níveis de oxigênio, para a extra-uterina, o que determina um aumento na quantidade de oxigênio liberado aos tecidos. Esse estado pró-oxidante pode determinar estresse oxidativo nos neonatos, particularmente importante nos prematuros que acumulam deficiência de surfactante, baixos níveis de anti-oxidantes e baixa capacidade de indução das enzimas anti-oxidantes (Saugstad, 1996). Tal fato independe do modo de nascimento, se normal ou cirúrgico, entretanto aparentemente o trabalho de parto parece elevar os níveis dos marcadores de estresse oxidativo (Fogel, Kupfermenc, Lichtenberg 2005) .

O dano oxidativo neonatal tem sido relacionado á retinopatia da prematuridade, displasia broncopulmonar, persistência do canal arterial,

enterocolite necrosante e leucomalácia periventricular, todas patologias estreitamente associadas à prematuridade (Saugstad, 2005).

Os estudos realizados enfocam doenças crônicas ou complicações da prematuridade. É plausível questionar se os valores elevados de estresse oxidativo são causa ou conseqüência do dano tecidual. O dano hepático pode estar associado à sepse neonatal e alguns autores têm associado esse dano a radicais livres liberados nos quadros sépticos (Romeo, Eatan, Quant et all, 1999). Estudos em adultos têm demonstrado que a disfunção orgânica está associada à hipóxia citopática, mediada por radicais livres de oxigênio lesando a mitocôndria (Fink, 2002).

Sabe-se que o dano orgânico secundário ao choque séptico está associado à liberação de radicais livres de oxigênio. Mais ainda, o estado *redox* celular influencia a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) que iniciará o processo imunoinflamatório observado na sepse, com liberação de interleucinas e amplificação da resposta do hospedeiro (Batra, Kumar, Kapoor, Ray, 2000). Na sepse neonatal tais modificações também ocorrem, com aumento da atividade da xantina-oxidase, superóxido- dismutase e glutathiona peroxidase, denotando aumento das defesas anti-oxidantes, sem entretanto serem efetivas para prevenir dano celular, já que também se elevam os níveis de malondialdeído (Kapoor, Basu, Das, Bhatia, 2006).

O estudo do estresse oxidativo no período neonatal e da utilização de anti-oxidantes ainda está em fases iniciais. O maior problema reside na função dos radicais livres como reguladores da expressão gênica. Algumas linhagens celulares têm seu crescimento e diferenciação estimulados por baixas concentrações de peróxido de hidrogênio e superóxido, como células pulmonares,

cerebrais, intestinais e retinianas. Entretanto, as altas concentrações ocorridas na sepse podem determinar dano celular (Jankov, Negus, Tanswell, 2001).

A resposta inflamatória gerada na sepse é mediada por fatores de transcrição nuclear, destacando-se o NFκB. A ativação desse fator pode ocorrer via reconhecimento de patógeno pelos receptores *Toll-like* na membrana celular ou por alterações no estado *redox* celular. Tais flutuações no estado *redox* teriam a capacidade de deflagrar uma resposta inflamatória no hospedeiro, via ativação de fatores de transcrição nuclear. Nesse ponto, então, se tem uma situação na qual a resposta determina liberação de radicais livres que continuará ativando fatores nucleares e amplificará a resposta inflamatória (Vistos, Rocha Fuente, 2004). No período neonatal já existe um estado pró-oxidante natural, o que facilitaria toda essa resposta inflamatória frente a um estímulo, provavelmente amplificando ainda mais a resposta do hospedeiro e determinando uma maior gravidade nos quadros infecciosos.

Estudos a respeito do estado antioxidante na sepse neonatal vêm mostrando resultados semelhantes aos realizados em adultos. Aparentemente, os quadros de sepse determinam elevação de espécies reativas de oxigênio e de enzimas antioxidantes, sem ocorrer entretanto um equilíbrio, o que determina danos principalmente às membranas lipídicas (Batra, Kumar, Kapoor, Ray, 2000). O papel desse desequilíbrio ainda é obscuro no período neonatal, mas parece estar associado a um pior prognóstico e ao desenvolvimento de disfunção de múltiplos órgãos em pacientes adultos (Zhang, Slutsky, Vincent, 2000).

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar a validade da utilização de marcadores diagnósticos na sepse neonatal:

- Determinar a importância e aplicabilidade de marcadores de estresse oxidativo como preditores de sepse neonatal, antes do aparecimento dos sintomas, utilizando sangue de cordão umbilical.
- Determinar a aplicabilidade da dosagem de Interleucina 6 e Interleucina 10 em sangue de cordão umbilical para diagnóstico precoce de sepse neonatal
- Determinar a existência de relação entre os níveis de marcadores de estresse oxidativo, TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), carbonilação protéica e Interleucinas 6 e 10 e a evolução do quadro séptico
- Determinar a existência de relação entre níveis de interleucinas 6 e 10 no sangue de cordão com marcadores de estresse oxidativo .

**PARTE II**  
**RESULTADOS**

CAPÍTULO 1:

***Umbilical cord oxidative damage parameters as indicators of early neonatal sepsis development.***

***Umbilical cord oxidative damage parameters as indicators of early neonatal sepsis development***

Ana Carolina Labor Cancelier<sup>1</sup>, M.D., Adalisa Reinke<sup>1</sup>, M.D.,  
José Cláudio Fonseca Moreira<sup>2</sup>, PhD, Felipe Dal-Pizzol<sup>1</sup>, M.D, PhD.

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

<sup>2</sup> Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Address for reprints:** Felipe Dal Pizzol. Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil. Avenida Universitária, 1105, 88006-000. phone: 55 48 4312641, fax: 55 48 431 2750, e-mail:piz@unesc.net

This work was supported by grants from UNESC and CNPq

**Key Words:** neonatal sepsis, oxidative stress, free radicals, oxidative damage

**Abstract**

*Objective:* oxidative stress occurs in animal models, infants and adults with sepsis, but the relation of oxidative stress and neonatal sepsis is not determined. The present study was undertaken to correlate oxidative damage parameters in umbilical cord blood with early neonatal sepsis.

*Design:* prospective case-control study.

*Setting:* tertiary care academic medical center

*Subjects:* neonates with the diagnosis of early neonatal sepsis and matched control.

*Interventions:* none

*Measurements and Main Results:* oxidative damage, assessed by the thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and the protein carbonyl assays, in the umbilical cord blood were significantly higher in cases when compared to controls. TBARS levels were better marker of early neonatal sepsis when compared to protein carbonyls. Choosing 7.8 nM/mg protein as a cut-off concentration of TBARS in umbilical cord blood resulted in sensitivity 85%, specificity 90%, positive predictive value 80%, and negative predictive value 95%. In addition, umbilical cord TBARS levels correlated significantly to SNAPE score, but could not predict outcome in septic neonates.

*Conclusions:* TBARS and protein carbonyls determined from the umbilical cord blood provide an accurate indication to the development of early neonatal sepsis and offer the opportunity for prompt and aggressive diagnostic and therapeutic intervention.

**Introduction**

Neonatal sepsis is a frequent and serious threat to survival during early stages of life. Despite the use of potent antibiotics and the development of supportive care, it remains an important cause of morbidity and mortality, mainly in prematures and low birth-weight neonates.<sup>1</sup>

Clinical diagnosis of sepsis in newborn infants is difficult, because symptoms and signs are non-specific. Many neonatal conditions can present similar clinical manifestations, as example congenital heart diseases, hypothermia, hypoglycemia

and others metabolic conditions. To differentiate these conditions, laboratorial tests are necessary, but there is no one with 100% specificity and sensitivity, and search has continued for a reliable test.<sup>2,3</sup> The gold standard test is hemoculture, but the results are available only after 48 to 72 hours.<sup>4</sup>

The measurements of Interleukin-1, Interleukin-6 and Interleukin-8 have excellent results, and can be made at born using cord-blood, but still confined to research laboratories in part for their high prices. Immediate determination of cord blood levels of Il-6 e Il-8 can predict neonatal early-onset infection, with a high level of sensitivity and specificity.<sup>5,6,7</sup>

During sepsis, there is an increased production of free radicals, that culminates in cellular and tissular damage. These high levels of oxidative stress can be observed in early stages of sepsis, in many cases acting as stimulant factor to interleukin production. Neonates have increased production of reactive oxygen species in sepsis, however the pattern of antioxidants enzymes are not so efficient to protect from celular damage.<sup>8,9</sup>

The objective of this study was to investigate wether measurement of oxidative stress in umbilical cord blood of newborns at risk for develop neonatal sepsis allows a sensitive and specific diagnosis of this condition.

### ***Patients and methods***

From 2005 July to December, cord blood was collected from 580 consecutively delivered neonates at Nossa Senhora da Conceição Maternity, after a mother assigned informed consent. Using a dry glass tube, samples were collected immediately after delivery by squeezing the umbilical cord. After centrifugation, the serum was stored at -70°C until assayed. From total sample, 120 newborns were at risk for early-onset sepsis. Among these newborns, 40 were clinically suspected to suffer from infection and were investigated with measurements of C-Reactive protein (CRP) and white blood cells. Controls were the remaining 80 newborns with risk factors for neonatal sepsis but that did not developed sepsis.

Risk factors for early-onset neonatal sepsis<sup>10,11</sup>: were included in study patients with at least one risk factor to sepsis, described next: gestational age less than 37 weeks, premature membrane rupture more than 18 hours before delivery, maternal colonization with GBS, intrapartum fever with axillary temperature more than 37,5 °C or presence of chorioamnionitis

Diagnostic criteria for neonatal sepsis: presence of at least one of the signs above with altered white blood cells and measurement of CRP, according to diagnostic criteria from pediatric sepsis consensus conference.<sup>12</sup> The presence of positive hemoculture was called proven sepsis and the absence of presumed sepsis. Signs of suspected sepsis were: feeding intolerance, lethargy, thermal instability, apnea, elevated heart rate, respiratory distress, capillary refill more than 2 seconds or bleeding evidences

Measurement of oxidative stress: As markers of oxidative damage we determined the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls in umbilical cord blood. TBARS was measured during an acid-heating reaction as previously described<sup>13</sup>. Briefly, the samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid 10% and 1 mL of thiobarbituric acid 0.67% and then heated in a boiling water bath for 15 mins. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm using 1,1,3,3- tetramethoxypropane as an external standard. Results are expressed as malondialdehyde equivalents per milligram of protein (Lowry assay). Protein carbonyls were determined based on the reaction with



dinitrophenylhydrazine as previously described<sup>14</sup>. Briefly, proteins were precipitated, dissolved in dinitrophenylhydrazine and the absorbance read at 370 nm. Values are expressed as nM/mg protein.

Further on, were collected the Apgar score at one and five minutes, maternal age, maternal application of beclometason and mode of delivery from all sample. At the moment of sepsis diagnosis, laboratorial tests used to establish diagnosis were collected and analyzed. Also from septic neonates whom stayed at neonatal intensive care unit, the prognostic score SNAP-PE II was collected.

Data are expressed as mean + standard deviation for variables with normal distribution. Differences between groups were analyzed using independent t-test or chi-square depending on the variable characteristic. Multivariate analyses were performed to control for potential confounding factors. Pearson's correlation test was used to study associations between oxidative parameters levels and other variables. Differences with *p* values below 0.01 were considered significant.

## **Results**

The study included 120 newborns, 40 cases and 80 controls. Both groups were similar in respect to Apgar score in the first minute, mode of delivery, maternal and gestational age, maternal corticotherapy and gender (Table 1). However, birth weight was significantly lower in septic newborns when compared to controls (Table 1). In addition the presence of premature membrane rupture was significantly higher in cases than controls (Table 1). There was positive hemoculture in 30% of the cases. The most prevalent microorganisms isolated were *Streptococcus sp* and *Escherichia coli*.

TBARS and protein carbonyls levels were significantly higher in cases when compared to controls (Table 1). These results were confirmed after multivariate analysis comparing gestational age, birth weight and premature membrane rupture.

It seemed that TBARS levels was a better marker of neonatal sepsis development when compared to protein carbonyls when analyzing ROC curves. The area under the ROC curve was 0.931 to TBARS and 0.809 to protein carbonyls. Choosing 7.8 nM/mg protein as a cut-off concentration of TBARS in umbilical cord blood resulted in sensitivity 85%, specificity 90%, positive predictive value 80%, and negative predictive value 95%. The association of TBARS levels to birth weight less than 1500 g enlarge the area under the curve to 0,965, and to a cut-off point of 7.05 nM/mg protein we determined a sensitivity of 88%, specificity of 92%, positive predictive value of 94% and negative predictive value of 91%. When using the presence of premature membrane rupture the area under the ROC curve enlarge to 0.96. In this setting, and using a cut-off point of 7.7 nM/mg protein to umbilical cord TBARS we determined 82% of sensitivity, 97% of specificity, positive predictive value of 91% and negative predictive value of 88%. The association of TBARS levels to gestational age less than 30 weeks enlarge the area under the curve to 0,962, and to a cut-off point of 6.1 nM/mg protein we determined a sensitivity of 100%, specificity of 92%, positive predictive value of 94% and negative predictive value of 100%. These results were similar when we analyzed only patients with positive cultures (data not shown).

Since blood oxidative damage parameters in umbilical cord could predict early neonatal development we thought that these parameters could predict outcome in

septic neonates. SNAPPE-PE score, leukocyte counts and serum glucose collected after sepsis diagnosis could predict outcome in septic neonates (data not shown).

Umbilical cord TBARS levels, but not protein carbonyls, significantly correlated to SNAP-PE score ( $p=0.01$ ), but none of the determined oxidative damage parameters could predict outcome in septic neonates (data not shown).

### **Discussion**

Oxidative stress is a physiologic event in the fetal-to-neonatal transition, but was implicated in many pathological processes in neonates. Increased oxidative stress has been incriminated in many diseases of prematurity, as retinopathy, respiratory distress syndrome and chronic lung disease<sup>15</sup>. Instead of these, the association of oxidative stress with neonatal sepsis, specifically as an early diagnostic marker was not determined.

Neonatal sepsis is still an important problem for neonatologists, mainly secondary to the difficult diagnosis. In our study, we determined an early marker of neonatal sepsis, even before the symptoms appear. The pathophysiology of sepsis involves the production of oxygen free radicals responsible for many events including the attack to the microorganism, activation of the immune systems and progression to multiple organ failure<sup>16</sup>. Neonates could be less prone to oxidative stress than adult, probably secondary to their high levels of bilirubin and lower content of oxidizable fatty acids<sup>17</sup>. In contrast, premature babies had lower levels of antioxidants defenses, owing to their immaturity and the lower passage of some nutrients that act as antioxidants, as alpha-tocopherol. The transfer through the placenta of some antioxidants substances, which takes place during the final stage or gestation, is not completed in the premature neonate<sup>18</sup>. The link between neonatal sepsis and oxidative stress is not clear, but in adults and infant oxidative stress seemed to be one of the mediators of organ injury<sup>15</sup>. We demonstrated that oxidative damage parameters could predict the development of early neonatal sepsis suggesting a role to oxidative stress in neonatal sepsis development, and to the best of our knowledge this is the first demonstration of the importance of oxidative damage parameters in the early diagnosis of neonatal sepsis.

The association of at least one risk factor (in our case premature membrane rupture, the most prevalent after prematurity), increase de value of the TBARS levels in cord blood for diagnosis of neonatal sepsis.

Some limitations of our study should be done. First, the control group was significantly different from cases regarding birth weight and the occurrence of premature membrane rupture. It is extremely difficult match case and controls when studying neonatal sepsis, but the multivariate analyses could diminish this bias.

Second, oxidative damage parameters utilized in this study were not the "state-of-the art". It is well known that spectrophotometric assays to TBARS, and to a less stand to protein carbonyls, is not specific to lipid damage when compared to HPLC-based methods. Instead of this, the employed assays are highly sensitive to oxidative damage thus to the main objectives of this work we felt that these techniques are appropriate.

In conclusion, collection of blood from umbilical cord for measurement of oxidative stress parameters in neonates at risk for neonatal sepsis is a simple technique, without adversely affecting neonates. TBARS and protein carbonyls concentrations provide an accurate indication immediately after delivery as to whether a neonate will develop early sepsis and offer the opportunity for prompt and aggressive

diagnostic and therapeutic intervention, and these suggested that oxidative damage could be involved in the development of early onset neonatal sepsis.

### **References**

1. Weber MAR, Candiani CL, Garcia JLA, Castellón PG, Arriaga FS. Morbidity and mortality from neonatal sepsis in a tertiary care-level hospital. *Salud Publ Mex* 2003; 45: 90-95.
2. Pinhata MM, Nobre RA, Martinez FE, Jorge SM, Ferlin MLS, Gonçalves AL. Early-onset bacterial infection in Brazilian neonates with respiratory distress: a hospital-based study. *J Trop Pediatr* 2004; 50: 6-11.
3. Yadav AK, Wilson CG, Prasad PL, Menon PK. Polymerase chain reaction in rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Indian Pediatr* 2005; 42: 681-685.
4. Kumar Y, Qunibi M, Neal TJ, Yoxall CW. Time to positivity of neonatal blood cultures. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 2001;85;182-186
5. Dollner H, Vatten L, Austgulen R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *J Clin Epidem* 2001; 54:1251-1257.
6. Dollner H, Vatten L, Linnebo I, Zanussi GF, Laerdal A, Austgulen R. Inflammatory mediators in umbilical plasma from neonates who developed early-onset sepsis. *Biol Neonate* 2001; 80:41-47.
7. Krueger M, Nauck MS, Sang S, Hentschel R, Wielnd H, Berner R. Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. *Biol Neonate* 2001; 80: 118-123.
8. Batra S, Kumar R, Kapoor AK, Ray G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann Trop Pediatr* 2000; 20: 27-33
9. Kapoor K, Basu S, Bhatia BD. Lipid peroxidation and antioxidants in neonatal septicemia. *J Trop Pediatr* 2006; 2006; 0: fml013v1
10. Oddie S, Embleton ND. Risk factors for early-onset neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study. *BMJ* 2002; 323
11. Benitz WE, Gould JB, Druzin ML. Risk factors for early-onset group-B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. *Pediatrics* 1999; 103:
12. Goldstein B, Giroir B, Randolph A all. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6(1): 3-8.
13. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421.
14. Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464.
15. Saugstad, O. D. Oxidative stress in the newborn - a 30-year perspective. *Biol Neonate* 2005; 88:228-236.
16. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med.* 2005; 33:S498-501.
17. Wiedemann M, Kontush A, Finckh B, Hellwege H, Kohlschutter A. Neonatal blood plasma is less susceptible to oxidation than adult plasma owing to its higher content of bilirubin and lower content of oxidizable fatty acids. *Pediatric Res* 2003; 53:843- 849.
18. Huertas JR, Palomino N, Carrasco R, Quiles J, Ramirez-Tortosa MC, Ochoa J, Cassinello M, Battino M, Robles R, Mataix J. Lipid peroxidation and antioxidants in newborns. *Mol Aspects Med.* 1997; 18: S229-232.

Table 1. Major clinical characteristics and umbilical cord blood oxidative damage parameters.

	<b>Cases (N=40)</b> <i>value</i>	<b>Controls (N= 80)</b>	<b>P</b>
Birth weight (grams)	1657 ± 647	2063 ± 492	0.001
Gestational age (weeks)	31.25 ± 4.2	33.23 ± 4.3	0.02
Apgar score at 1 minute	7.93 ± 1.3	7.36 ± 1.9	0.105
Normal delivery	18 (45%)	37(46.2%)	1.0
Maternal age (years)	26.8 ± 5.2	26.13 ± 6.03	0,53
Premature membrane rupture rupture	34 (85%)	31 (38.7%)	<0.001
Maternal Corticotherapy	21 (52.5%)	29 (36.2%)	0.11
Male	22 (55%)	34 (42.5%)	0.24
TBARS (nM/mg protein)	10.01 ± 2.9	4.2± 2.5	<0.001
Protein carbonyls (nmMmg protein)	2.4 ± 1.2	1.14 ± 0.49	<0.001

CAPÍTULO 2:

***Interleukin-6, Interleukin-10 in cord blood as diagnostic markers of early-onset neonatal sepsis.***

***Interleukin-6, Interleukin-10 in cord blood as diagnostic markers of early-onset neonatal sepsis.***

Abstract: Objective: Neonatal sepsis is a frequent threat to survival in neonatal intensive care unit. Early-onset sepsis is linked to known risk factors, identifiable at born. A diagnostic marker that could be able to predict neonatal sepsis before the beginning of symptoms would be the ideal one. This study aims to detect if IL6 and IL10 can be used as early diagnostic markers in neonates with identifiable risk factors for neonatal sepsis.

Methods: We follow 580 neonates born from 2005 March to August from whom were collected umbilical cord blood and stored after centrifugation at  $-70^{\circ}$ . From this sample, 120 were chosen because they were premature and at high risk for neonatal sepsis. Those who do not develop sepsis were controls. We performed dosage of IL6 and IL10 and compare cases and controls and in septic neonates, those who died and not. We use one-way ANOVA, chi-square and discriminant analysis, with significance level of 95%. The receiver operated characteristic (ROC) curve was used to determine the accuracy of tests.

Results: IL6 e IL10 were more elevated in septic neonates ( $p < 0,01$ ). IL6 had prognostic value ( $p = 0,043$ ). For neonatal sepsis diagnosis in risk neonates, the cut-off point of IL6 and IL10 were respectively 74,5pg/ml and 77,5pg/ml. IL6 presented the higher area under ROC curve (0,983). Oxidative stress parameters had similar results in distinguish septic from non-septic neonates (area under ROC curve 0,945).

Conclusion: in neonates with identifiable risk factors at born, the dosage of IL6 e IL 10 in cord blood can predict neonatal sepsis before the beginning of symptoms.

Key-words: neonatal sepsis, early diagnosis, interleukins

## INTRODUCTION

The early symptoms of early-neonatal sepsis are non-specific, and the outcome is considered to be worst in babies in whom antibiotics are started late. However, as microbiological culture results and antimicrobial susceptibility data are not available until at least 48 hours, early identification of sepsis is a major diagnostic problem in the early neonatal period (1,2). Thus, an early and accurate identification of sepsis in the newborn is necessary to the adequate treatment of these patients.

Septic newborns have high levels of interleukins in cord blood, but not of C-reactive protein, probably because its elevation is a later event in sepsis development (3). Elevated maternal levels of interleukin-6 (IL6) are associated to neonatal infectious complications in the setting of premature membrane rupture (3,4).

Several cytokines were studied in the diagnostic and prognosis of adult sepsis, including tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), IL6 and interleukin 10 (IL10) (5). TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  stimulate the release of IL6, especially from macrophage, fibroblast and endothelial cells (4,6). IL10 is an anti-inflammatory cytokine, acting in the resolution of the inflammatory response in several inflammatory conditions (6). In addition, is well-known that during the inflammatory response oxidative damage occurs, and this seemed to be relevant to sepsis development (7).

This study objects to determine value of the in the cord blood to the diagnosis of□determination of IL6, IL10, IL1 early-onset neonatal sepsis in risk neonates. In addition, we compared the value of these cytokines to oxidative parameters previously described by our group (submitted data).

## METHODS

From 2005 March to August, cord blood was collected from 580 consecutively delivered neonates at Nossa Senhora da Conceição Maternity. Using a glass tube, samples were collected immediately after delivery by squeezing the umbilical cord. After centrifugation, the serum was stored at -70C until assayed. From the total sample, 120 newborns were premature and had at least one other risk factor for early-onset neonatal sepsis, thus being included in the study.

### *Risk factors for early-onset neonatal sepsis*

Were included in study patients with at least one risk factor to sepsis: premature membrane rupture more than 18 hours before delivery, maternal colonization with GBS, intrapartum fever with axillary's temperature more than 37,5, presence of chorioamnionitis(8).

Diagnostic criteria for neonatal sepsis were considered the presence of at least one of the clinical signs above with altered white blood cells and measurement of CRP.(9) Clinical manifestations of sepsis are listed: feeding intolerance, lethargy, thermal instability, apnea, elevated heart rate, respiratory distress, capillary refill more than 2 seconds, bleeding evidences. 40 newborns fulfilled these criteria and were clinically included in the sepsis group. Controls



were the remaining 80 newborns with risk factors for neonatal sepsis but that did not developed sepsis. The presence of positive hemoculture was called proven sepsis and the absence presumed sepsis.

#### *Inflammatory markers in cord blood*

As markers of oxidative damage we determined the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls in umbilical cord blood. TBARS was measured during an acid-heating reaction as previously described (10). Briefly, the samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid 10% and 1 mL of thiobarbituric acid 0.67% and then heated in a boiling water bath for 15 mins. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. Results are expressed as malondialdehyde equivalents per milligram of protein (Lowry assay). Protein carbonyls were determined based on the reaction with dinitrophenylhydrazine as previously described (11) . Briefly, proteins were precipitated, dissolved in dinitrophenylhydrazine and the absorbance read at 370 nm. Values are expressed as nM/mg protein.

Commercial (Quantikine, ELISA kits were used for the detection of IL6, IL10 and IL1 R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK). The detection limit of the assays was 6.0 pg/ml (IL6), 31.5 pg/ml (IL10) and 12 pg/ml

Demographic and clinical characteristics of the study groups were compared by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, Mann-Whitney U test, discriminate analysis and  $\chi^2$  test, as appropriate, and a two-sided significance level of 0,05 or less was considered statistically significant. The accuracy of each inflammatory and oxidative stress mediator in distinguishing infected neonates from controls was examined separately by receiver operator characteristic (ROC) curves.

## RESULTS

Were included 120 newborns in the study, 40 cases of neonatal sepsis and 80 controls (Table 1).

IL6, IL10 levels and oxidative stress parameters were presented in table 2. When measured in the cord blood, all were increased in cases compared to controls. IL6 had the largest area under the ROC curve (0.983), interleukin 10 and TBARS had equivalent areas (0.945) and carbonyl had the smaller area (0.807) (Figure1). IL6 had a sensitivity of 100% and a specificity of 76% (threshold level of 74.5 pg/ml), IL10 had a sensitivity of 97% and a specificity of 62% (threshold level of 77.5 pg/ml), TBARS had a sensitivity of 97% and a specificity of 82% (threshold level of 6.15 nM/mg protein) and carbonyl had a sensitivity of 76% and a specificity of 88% (threshold level of 1.37 nM/mg protein) to the diagnosis of early neonatal sepsis. Associating IL6 and IL10 to the diagnosis of early neonatal sepsis increased the area under the ROC curve to 0.960, but this was not true to the association between other analyzed variables. When we analyzed the subgroups of premature rupture of membranes, IL10 area under the ROC curve was 1.0 and to threshold level of 109,5 pg/ml had 100% of sensitivity and 100% of specificity to the diagnosis of early neonatal sepsis. Between all analyzed markers, IL6 blood cord levels could predict mortality from sepsis. Septic neonates whom died from sepsis presented higher levels of IL6 when compared to survivors (224.6 vs 171.3 pg/ml,  $p= 0,043$ ).

Hemoculture was positive in 10 patients. The most prevalent pathogen was *Streptococcus* sp. Analyzing only positive hemocultures, the significance between cases and controls maintains in IL6 and TBARS.

## DISCUSSION

In this study we analyzed the significance of cord blood levels of IL6 (a proinflammatory cytokine), IL10 (an anti-inflammatory cytokine) and oxidative stress markers as predictors early neonatal sepsis in neonates with risk factors for this situation. We found that neonates with early-onset sepsis presented, before the onset of symptoms, higher levels of inflammatory and oxidative stress markers in cord blood.

IL6 is one of the most studied cytokines to the diagnosis of sepsis (3,4,12), and we here replicate these results. The isolated use of IL6 seemed to be superior to the early diagnosis of neonatal sepsis when compared to the other analyzed parameters. In addition, we for the first time demonstrated that cord blood IL6 was related to outcome in early neonatal sepsis.

Premature rupture of membranes was the risk factor to early neonatal sepsis more prevalent in our study. Maternal levels of IL6 are elevated when infectious complications occurred in the neonatal period in the setting of premature rupture of membranes (13), but IL6 crosses poorly the placenta (14). Thus the elevated levels observed in septic neonates were probably due to the infant inflammatory response (14). Newborns, even the premature, had regulatory mechanisms related to the control of inflammatory response. Elevated levels of IL10 and IL6 indicate infectious disease in neonates, and IL10 remains elevated until 48 hours after the beginning of the sepsis (6), but we demonstrated for the first time a role to IL10 in the early diagnosis of neonatal sepsis mainly in premature rupture of membranes subgroup. The role of IL10 was determined in experimental models of neonatal sepsis. Neutralization of IL10 with specific

antibodies had no effect on mortality, but the administration of recombinant IL10 resulted in improved survival. (15,16). In our study there were no differences in IL10 blood cord levels between survivors and no-survivors.

Our findings showed that cord blood IL6, IL10 and oxidative stress markers were significantly higher in infants with neonatal sepsis than in control subjects. To our knowledge, there have been few studies to evaluate oxidative markers in neonatal sepsis. In our point of view, in neonates with recognizable risk factors to neonatal sepsis, especially PROM, the dosage in umbilical cord of these markers can distinguish those neonates whom will develop sepsis in the first 72 hours after birth.

#### REFERENCES

1. Rodriguez WMA, Garcia JLA, Castrellon PG, Arriaga FS. Morbidity and mortality from neonatal sepsis in a tertiary care-level hospital. *Salud Publica Mex* 2003;45:90-95.
2. Kumar Y, Qunibi M, Neal TJ, Yoxall CW. Time to positivity of neonatal blood cultures. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2001; 85: 182-186
3. Krueger M, Nauck MS, Sang S, Hentschel R, Wieland H, Berner R. Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. *Biol Neonate* 2001; 80:118-123.
4. Dollner H, Vatten L, Linnebo I, Zanussi GF, Laerdal A, Austgulen R. Inflammatory mediators in umbilical plasma from neonates who developed early-onset sepsis. *Biol Neonate* 2001; 80:41-47
5. Berner R, Welter P, Brandis M. Cytokine expression of cord and adult blood mononuclear cells in response to *Streptococcus agalactiae*. *Ped Res* 2001; 51(3): 304-309.
6. Kilpatrick L, Harris MC. Cytokines and the inflammatory response. In: Polin RA, Fox WW. *Fetal and Neonatal physiology*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998. P 1967-1979.

7. Batra S, Kumar R, Kapor AK, Ray G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann Trop Paediatr* 2000; 20:27-33.
8. Oddie S, END. Risk factors for early onset neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study. *BMJ* 2002; 325: 303-312.
9. Goldstein B, G. B., Randolph A .International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6(1): 2-8.
10. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421.
11. Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464.
12. Reyes SC, Muñoz GF, Reyes D, González G, Dominguez C, Domenech E. Role of cytokines and C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2003; 92: 221-227.
13. Lewis DF, Barrileaux PS, Wang Y, Adair D, Baier J, Kruger T. Detection of interleukin-6 in maternal plasma predicts neonatal and infectious complications in preterm premature rupture of membranes. *Am J perinatol* 2001; 18(7): 387-391.
14. Chiesa C, Signore F, Assuma M, Buffone E, Tramontozzi P, Osborn JF, Pacifico L. Serial measurements of C-reactive protein and Interleukin-6 in the immediate postnatal period: reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. *Clinical Chemistry* 2001; 47(6): 1016-1022.
15. Nicoletti F, Mancuso G, Ciliberti FA, Beninati C, Carbone M, Franco S, Cusumano V. Endotoxin-induced lethality in neonatal mice is counteracted by interleukin-10 and exacerbated by anti IL10. *Clin Diagn Laborat Immunology* 1997; 4(5): 607-610.
16. Latifi S, O'Riordan MA, Levine AD. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun* 2002; 70(8): 4441-4446.

Table 1. Characteristics of the study population.

	Cases	Controls	Valor p
Sex, (Male/Female)	22/18	34/46	0,136
Gestational age (mean weeks)	31,4	33,6	0,380
PROM (yes/no)	34/6	31/49	0,000
Mode of delivery (vaginal/cesarean)	18/22	37/43	0,527
Antenatal antibiotics (yes/no)	8/32	25/55	0,139
Previous neonatal sepsis (yes/no)	2/38	4/76	0,648

Table 2. Interleukin 6 and 10 and oxidative stress parameters in cases and controls

	Cases	Controls	p value
Interleukin 6(pg/ml)	184,6 (±72,7)	58,92 (±19)	<0,01
Interleukin 10 (pg/ml)	171,4 (±59,3)	79,9 (±17,9)	<0,01
MDA Equivalent (nM/mg protein)	10,1 (±2,8)	4,3 (±2,5)	<0,01
Carbonyl (nM/mg protein)	2,4 (±1,6)	1,1 (±0,5)	<0,01

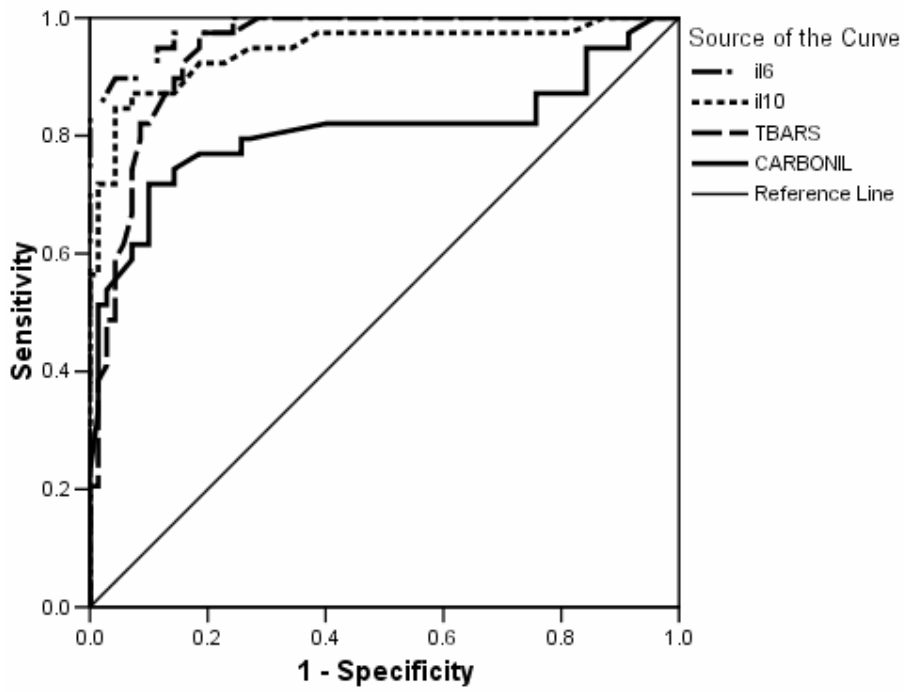


Figure1. ROC curve illustrating the accuracy of each mediator in distinguish neonates with and without sepsis.



## PARTE III

## 1 DISCUSSÃO

A busca por um marcador ideal, de alta sensibilidade e especificidade é um desafio em várias doenças estudadas pela Medicina. A sepse neonatal precoce, por desenvolver-se logo após o nascimento e estar associada a fatores de risco identificáveis na sala de parto, pode ser suspeitada e investigada antes mesmo do início das manifestações clínicas no recém-nascido. Essa característica do período neonatal difere dos quadros infecciosos em outras faixas etárias e mesmo da sepse neonatal tardia, quando os fatores de risco, mesmo identificáveis, não são suficientes para determinarem triagem diária para sepse. O diagnóstico precoce e correto da sepse neonatal vem sendo almejado pelos neonatologistas há anos. Quando se pensa em uma entidade mórbida que tem taxas de letalidade tão altas quanto 70% e sabe-se que a precocidade da instauração de um tratamento eficaz pode modificar esse desfecho, consegue-se ter uma idéia da importância do tema atualmente (Weber, Candiani, Garcia et al, 2003). Tal importância torna-se ainda maior quando se analisa os dados de mortalidade do Brasil e do mundo e se constata que a faixa etária neonatal precoce (até 7 dias) é a que teve menor decréscimo na mortalidade nos últimos anos (Araújo, Bozzetti, Tanaka, 2000).

As manifestações clínicas de sepse neonatal podem estar presentes já ao nascimento ou iniciarem-se nos primeiros dias de vida, habitualmente nas primeiras 72 horas(Dollner,2001). A utilização de exames laboratoriais para a complementação diagnóstica nessas situações é amplamente utilizada, não existindo um consenso a respeito de qual exame seria alterado mais

precocemente, ou de qual combinação de exames poderia ser mais útil no diagnóstico da sepse neonatal.

Como clinicamente quase nenhuma manifestação pode ser considerada exclusiva da sepse, a utilização de exames complementares é obrigatória. A investigação inicial abrange a solicitação do hemograma e leucograma, VHS e PCR. Habitualmente, a solicitação de exames complementares está obviamente atrelada a alterações clínicas que sugiram quadro de sepse. Alguns autores postulam que, em neonatos de risco para desenvolverem sepse, particularmente os prematuros e aqueles com história de ruptura prematura de membranas amnióticas, a solicitação de exames laboratoriais deve anteceder ao quadro clínico, como uma forma de triagem, antes mesmo do aparecimento das manifestações clínicas (Chiesa, Signore Assuma et al, 2001). A ausência de crescimento bacteriano em hemocultura, incubada por 36 horas, no paciente assintomático é suficiente para descartar um quadro de sepse, o que confere a esse exame um excelente valor preditivo positivo (Janjindamai, Phetpisal, 2006). Entretanto, aguardar esse tempo num paciente com sinais clínicos pode ser catastrófico, razão pela qual atualmente quando se depara com um quadro clinicamente sugestivo de sepse e exames laboratoriais compatíveis, inicia-se antibioticoterapia.

Já se vem estudando marcadores precoces de sepse neonatal há alguns anos, e a utilização das interleucinas em sangue de cordão parece promissor. Níveis elevados de IL6 e IL8 em sangue de cordão podem, com um alto índice de confiança, confirmar ou descartar sepse precoce, particularmente em prematuros (Krueger, Nauck, Sang et al, 2001). Já se questiona a dosagem de IL6 em plasma de mães com ruptura prematura de membranas como um bom preditor de

complicações infecciosas no concepto (Lewis, Barrileaux, Wang et al, 2001). Os níveis de TNF e IL1 também se elevam já no sangue de cordão umbilical, sugerindo que a resposta inflamatória ao agente infeccioso inicia-se intra-útero, determinando, dependendo de sua intensidade, manifestações clínicas mais ou menos precoces (Dollner, Vatten, Linnebo et al, 2001). A IL6 é a mais estudada nesse sentido e dos marcadores utilizados foi o que apresentou uma melhor relação sensibilidade e especificidade. Mais ainda, apresentou boa relação prognóstica nos casos de sepse.

O tipo de parto pode influenciar o nível de interleucinas, particularmente as pró-inflamatórias. Apesar da influência da IL6, entre outras citocinas pró-inflamatórias, na contração uterina durante o trabalho de parto (Pushner et al, 2005), este estudo não revelou diferenças nos níveis de IL6 entre neonatos nascidos de parto cesáreo ou vaginal.

Recém-nascidos, mesmo prematuros, apresentam mecanismo regulatório de citocinas pró e anti-inflamatórias funcionantes. Níveis elevados de IL10 e de IL6 indicam quadro infeccioso no neonato e a IL10 permanece elevada por 48 horas após o início do quadro infeccioso. A IL6 por sua vez eleva-se precocemente e se mantém em níveis mais elevados por até 4 dias nos quadros sépticos (Ng, Li, Wong, 2003).

No estudo, a dosagem de IL10 em neonatos com história de ruptura prematura de membranas mostrou-se bastante eficaz, chegando a 100% de especificidade e sensibilidade. Nesses pacientes, adotando-se um ponto de corte de 109,5 para IL10 tem-se a possibilidade de detectar sepse antes do início dos sintomas.

Houve correlação entre os níveis de IL6 e IL10 e de marcadores de estresse oxidativo, demonstrando uma resposta imune neonatal ao patógeno, mesmo antes do início dos sintomas. O papel da IL 10 foi bem esclarecido em estudos experimentais. Ratos que receberam anti-IL10 tiveram pior prognóstico em quadros de sepse por EGB (Nicoletti, Mancuso, Ciliberti, 1997; Latifi, O’Riordan, Levine, 2002). Estudos com LPS, indicam que a elevação da IL10 em uma fase precoce pode reduzir a resposta inflamatória e melhorar o prognóstico nos sépticos, entretanto uma elevação mais tardia pode determinar uma resposta inversa e a imunodepressão poderia piorar o prognóstico desses pacientes (Latifi, O’Riordan, Levine, 2002).

O presente estudo não mostrou diferença entre sobreviventes e não sobreviventes com relação à IL10, mas sim com relação à IL6. Mais que um maior potencial anti-inflamatório, uma resposta de citocinas inflamatórias mais exacerbada parece ter determinado um pior prognóstico.

A análise separada de casos e controles quanto a faixas de idades gestacionais não mostrou significância estatística. A idade gestacional abaixo de 37 semanas é considerada fator de risco para sepse precoce, entretanto o risco não parece ser tanto maior quanto menor a idade gestacional. Essa relação ocorre na sepse neonatal de início tardio, por estar relacionada à sepse nosocomial e a procedimentos invasivos e colonização por bactérias resistentes ( Lorry, Sánchez ,Siegel et all, 2002).

O estudo do equilíbrio oxidativo no neonato iniciou-se com as patologias crônicas, particularmente as relacionadas à prematuridade, destacando-se a retinopatia da prematuridade, a displasia broncopulmonar, a leucomalácia periventricular e a enterocolite necrosante (Saugstad, 1996; Collard, Holley,

Quinn,2004; Dani, Bertini, Pezzatti, 2004; Haynes, Baud, Volpe, 2005; Saugstad 2005). Mas, recentemente, os radicais livres vêm sendo estudados em doenças agudas, particularmente a sepse neonatal. Durante a sepse ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que pode culminar com dano tecidual (Batra, Kumar, Seema et all, 2000). Estudos em animais comprovam a maior letalidade da sepse quando ocorre aumento de estresse oxidativo (Andrade, Ritter, Dal-Pizzol, 2004). O principal alvo das EROs são as membranas lipídicas e os ácidos nucléicos (Macdonald,Weber, 2003). Para equilibrar tal produção, o organismo lança mão de mecanismos anti-oxidantes, no sentido de neutralizar ou minimizar os danos decorrentes das EROs (Huertas, Palomino, Carrasco et all, 1997).

Comprovadamente, durante os quadros de sepse neonatal há um aumento da produção de EROs e um evidente desequilíbrio entre pró e anti-oxidantes (Batra, Kumar, Seema et all, 2000). Esse fato abre a discussão para uma possível utilização de terapia anti-oxidante na sepse neonatal, o que já vem sendo pesquisado com o uso da melatonina na sepse como agente antioxidante (Gitto, Karbownik, Reitere t all, 2001 ).

Este estudo revela que os marcadores de estresse oxidativo, através da dosagem de equivalente MDA e carbonilação protéica já se mostram elevados no momento do nascimento, independente inclusive da suspeita diagnóstica ou manifestações clínicas. Os valores dos marcadores de dano a lipídios elevaram-se muito mais que de proteínas em sangue de cordão umbilical. Entretanto, ao contrário do que era de se esperar, não houve relação prognóstica com os níveis dos marcadores.

A elevação dos marcadores de dano a lipídios sabidamente ocorre na sepse neonatal (Kapoor, Basu, 2006), entretanto não há estudos relatando a utilização dos marcadores de estresse oxidativo como marcadores diagnósticos de sepse neonatal. Outro fato importante a ser levantado é que os neonatos sépticos apresentavam ao menos um fator de risco para sepse precoce, sendo a prematuridade e a ruptura prematura de membranas os mais encontrados.

Houve relação entre os níveis de estresse oxidativo e interleucinas. A resposta inflamatória a um quadro séptico inicia-se com o objetivo de localizar e destruir o agente agressor. Portanto, as manifestações clínicas decorrentes dessa invasão dependerão do tempo de exposição ao patógeno e da resposta do hospedeiro. A coleta de sangue foi realizada imediatamente após o nascimento, período no qual, na grande maioria dos casos, ainda não havia sinais clínicos, entretanto a resposta inflamatória já estava iniciada. Chama atenção que, apesar da precocidade da coleta, já haviam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, denotando uma resposta adequada ao agente agressor. E o fato que ainda não havia sido relatado na literatura, houve relação direta entre o nível de IL6 em sangue de cordão e mortalidade por sepse neonatal precoce ( $p = 0,045$ ). Nesse caso, entende-se que é a resposta inflamatória elevada e não a sua tentativa de bloqueio que determinou maior mortalidade. Esses pacientes não tiveram níveis mais elevados de IL10, apesar de haver ocorrido correlação entre os níveis das duas interleucinas ( $p < 0,01$ ).

Já é consenso a utilização de profilaxia antibiótica em gestantes com fatores de risco para sepse neonatal pelo EGB (Benitz, 2002; Benitz, Gould, Druzin 1999; Oddie, Embleton, 2002). Segundo o CDC, a presença de pelo menos um dos fatores de risco para sepse neonatal, sendo a presença de colonização

pelo EGB o mais importante, é suficiente para que seja realizada a quimioprofilaxia com penicilina ao menos 4 horas antes do nascimento (Scharg, Gorwitz, Fultz-Butts, et al, 2002). Tal conduta é rotina no serviço onde foi realizada a coleta dos dados, limitando-se a alguns profissionais que a fazem. Alguns trabalhos realizados no Brasil não colocam o EGB como o agente mais importante na sepse (Skolowski, bertschinger, barcelos et al, 1983; Smânia, Benchetrit, Smânia, 1986), razão pela qual a quimioprofilaxia contra esse agente talvez não seja considerada importante.

Entretanto, as taxas de sepse neonatal precoce no Brasil alcançam níveis semelhantes aos de países antes da instituição da quimioprofilaxia, sugerindo que talvez o EGB tenha importância também no Brasil como agente etiológico e que as dificuldades técnicas na realização de culturas para sua identificação é que seriam o problema (Miura, Martini, 2004).

Esses dados abrem a possibilidade de se ter um marcador precoce, possível de ser realizado ao nascimento do neonato de risco para sepse, e que tenha a capacidade de determinar com alto grau de confiabilidade a presença de sepse e até mesmo a probabilidade do seu desenvolvimento, antes mesmo do início das manifestações clínicas.



## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade M, Ritter C, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *J Surg Res* 125 (1): 68-72, 2004.
- Araújo B, Bozzetti MC, Tanaka ACA. Mortalidade neonatal precoce no município de Caxias do Sul: um estudo de coorte. *J.Pediatr (Rio J)* 76(3): 200-206, 2000
- Batra S, Kumar R, Kapor AK, Ray G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann Trop Paediatr* 20:27-33,2000.
- Benitz WE. Perinatal treatment to prevent early onset group B streptococcal sepsis. *Semin neonatal* 2002 7: 301-314, 2002.
- Benitz WE, G. J., Druzin ML. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. *Pediatrics* 103(6): 77-90,1999.
- Bhatiya D, Kapadia C, Sanghvi K, Singh H, Kalkar R, Merchant R. Preliminary studies on IL-6 levels in healthy and septic indian neonates. *Indian Pediatrics*; 37: 1361-1367,2000.
- Bizzarro, M., Raskind, C,Baltimore, RS, Gallagher, G.Seventy-Five Years of Neonatal Sepsis at Yale: 1928-2003.*Pediatrics* 116(3): 595-602,2005.
- Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ: Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 20:724–726,1992.
- Bont ES, Martens A, Raan J, Samson G, Fetter WP, Okken A, Leij LH, Kimpen JL. Diagnostic value og plama levels of tumour necrosis alpha and interleukin-6 in newborns with sepsis. *Acta Paediatr*; 83:696-699, 1994.

- Buck C, Bunduschu J, bartmann P, Pohlandt F, Gallati H. Interleukin-6: A Sensitive Parameter for the Early Diagnosis of Neonatal Bacterial Infection. *Pediatrics* 93(1): 54-58, 1999.
- Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, Vander Meer JWM, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B, Wilmore DW, Wolff SM, Dinarello CA. Circulating interleukin-1 and TNF in septic shock and Experimental endotoxina fever. *J Infect Dis* 161: 79-85,1990.
- Chiesa C, Signore F, Assuma M, Buffone E, tramontozzi P, Osborn JF, Pacifico L. Serial measurement of C-reactive protein and IL6 in the immediate postnatal period: reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. *Clinical Chemistry* 47(6): 1016-1022,2001.
- Collard KJ, G. S., Holley JE, Quinn MW. Pulmonary antioxidant concentrations and oxidative damage in ventilated premature babies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89: F412-F416, 2004.
- Conti P, R. M., Fiore S, Cancelli A, Angeletti PU, Dinarello CO. Recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor in synergy to release thromboxane, 6-KETO-PGF1 and PGE2 by human neutrophils. *Scand J Rheumatol Suppl* 75: 318-324, 1998.
- Dani C, M. E., Bertini G, Pezzati M, Rosseti M, Buonocore G, Paffeti P, Rubaltelli FF. Effect of blood transfusions on oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89: F408-F411, 2004.
- Dollner H, Vatten L, Linnebo I, Zanussi GF, Laerdal A, Austgulen R. Inflammatory mediators in umbilical plasma from neonates who develop early-onset sepsis. *Biol Neonate* 80:41-47, 2001.

- Elias JA, I. V. IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol* 145: 161-166, 1990.
- Felmet, K., Hall MW, Clark RSB, Jaffe R, Carcillo JA .Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol* 174: 3765-3772, 2005.
- Fink MP. Bench-to-bedside review: cytopathic hypoxia. *Crit Care* 6(6): 491-499. 2002.
- Fogel I, P. I., Kupferminc MJ, Lichtenberg D, Fainaru O. Oxidative stress in the fetal circulation does not depend on mode of delivery. *Am J Obstet Gynecol* 193: 241-246, 2005.
- Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New Engl J Med* 340(6): 448-454, 1999.
- Girardin EP, Berner ME, Grau GE, Suter S, Lacourt G, Paunier L. Serum tumor necrosis factor binding proteins (soluble TNF receptor forms) with possible roles in inflammation and malignancy. *Eur Cytokine Netw* 4: 169-180, 1993.
- Gitto E, Karbownik M, reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G, Barberi I. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res* 50: 756-760, 2001.
- Goldstein B, G. B., Randolph A .International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 6(1): 2-8, 2005.
- Griffin, M., O'shea, TM, Bissonette, E A, Harrel, FE, Lake, DE, Moorman, JR Abnormal Heart Rate Characteristics Preceding Neonatal Sepsis and Sepsis-Like Illness. *Pediatr Res* 53(6): 920-926, 2003.

- Hanada T, YA. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth factor Reviews* 13: 413-421,2002.
- Haynes, R., Baud O, Li, J, Volpe JJ, Folkerth RD. Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain Pathol* 15: 225-233,2005.
- Huertas JR, Palomino N, Carrasco R, Quiles J, Tortosa MCR, Ochoa J, Cassinello M, Battino M, Robles R, Mataix J. Lipid peroxidation and antioxidants in newborns 18(suppl): 229-232, 1997.
- Janjindamai W, Phetpisal S.(2006) Time to positivity of blood culture in newborn infants. *Southeast asian J Trop med Public Health* 37(91): 171-176.
- Jankov RP, Negus A, Tanswell AK. Antioxidants therapy in the newborn: some words of caution. *Ped Res* 50(6): 681-687,2001.
- Kapoor K, Basu S, Das K, Bhatia D. Lipid peroxidation and antioxidants in neonatal septicemia. *J Trop Pediatr – advance access* ,2006.
- Kilpatrick L, Harris MC. Cytokines and the inflammatory response. In: Polin RA, Fox WW. *Fetal and Neonatal physiology*. Philadelphia: WB Saunders Company,1998. P 1967-1979, 1998.
- Kovatchev B, Farhy LS, Cao H, Griffin MP, Lake DE, Moorman JR Sample Asymmetry Analysis of Heart Rate Characteristics with Application to Neonatal Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Pediatr Res* 54(6): 892-898, 2003.
- Krueger M, Nauck MS, Sang S, Hentschel R, Wieland H, Berner R.. *Biol Neonate* 80: 118-123,2001.
- Latifi S, O’Riordan MA, Levine AD. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun* 70(8): 4441-4446, 2002

- Lewis DF, Barrileaux PS, Wang Y, Adair CD, baier J, Kruger T. Detection of interleukin-6 in maternal plasma predicts neonatal and infectious complications in preterm premature rupture of membranes. *Am J Perinatol* 18(7): 387-391, 2001.
- Lorry GR, Sánchez PJ, Siegel J, Levine G, Saiman L, Jarvis WR .Evaluation and Treatment of Neonates With Suspected Late-Onset Sepsis: A Survey of neonatologists' Practices. *Pediatrics* 110;42- 48 2002.
- Luis U, K. T.The 'citokine profile': a code for sepsis.*Trends in Molecular Medicine* 11(2), 2005.
- Macdonald J, G. H., Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth* 90(2): 221-232, 2003.
- Miura E Martini MC. Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 43(5): 243-246, 2001.
- Miyairi I, B. D., Protic J, Belko J .Neonatal invasive group a streptococcal disease: case report and review of the literature. *Pediatr infect Dis J* 23(2): 161-165, 2004.
- Mussi-Pinhata M, N. R., Martinez FE, Jorge SM, Ferlin MLS, Gonçalves .Early-onset bacterial infection in Brazilian neonates with respiratory distress: a hospital-based study. *J Trop Pediatr* 50: 6-11, 2004.
- Ng PC, Li K, Wong RPO. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88: F209-F213, 2003.
- Ng, PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 89(3): F229-235, 2004.

- Nicoletti F, Mancuso G, Ciliberti FA, Beninati C, Carbone M, Franco S, Cusumano V. Endotoxin-induced lethality in neonatal mice is counteracted by interleukin-10 and exacerbated by anti IL10. *Clin Diagn Laborat Immunology* 4(5): 607-610,1997
- Oddie S, Embleton N. Risk factors for early onset neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study. *BMJ* 325: 303-312, 2002.
- Puchner MA, protonariou E, Boutsikou T, Makralis E, Sarandakou A, Creatsas G. The influence of mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early Hum. Dev* 81(4): 387,392, 2005.
- Reyes SC, Muñoz GF, Reyes D, González G, Dominguez C, Domenech E. Role of cytokines (interleukin-1,6,8, tumour necrosis factor and soluble receptor of interleukin-2) and C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis. *Acta paediatr* 92: 221-227, 2003.
- Rodriguez-Weber MA, L.-C. C., Arredondo-Garcia JL, Gutiérrez-castrellón P, Sánchez-Arriaga F. Morbidity and mortality from neonatal sepsis in a tertiary care-level hospital. *Salud Publica Mex* 45: 90-95, 2003.
- Romeo C, Eaton S, Quant PA, Spitz L, Pierro A. Neonatal oxidative liver metabolism: effects of hydrogen peroxide, a putative mediator of septic damage. *J Pediatr Surg* 34(7): 1107-1111,1999.
- Saugstad, O. Mechanisms of injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatrica* 85(1): 1-4, 1996.
- Saugstad, O. D. Oxidative stress in the newborn - a 30-year perspective. *Biol Neonate* 88: 228-236, 2005.
- Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep*

51(RR-11):1-22, 2002.

Skolowski E, Bertschinger B, Barcelos S.H., Procianoy RS. Colonização materna e do recém-nascido por estreptococo do grupo B de Lancefield. Rev. HCPA Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gr. Sul, 3: 107-108, 1983.

Smânia JÁ, Benchetrit LC, Smânia EFA, Fracallanza SEL. Isolamento do estreptococos do grupo B, de gestantes e neonatos, em Florianópolis, Santa Catarina. Rev. Bras. Anal. Clín., 18: 103-108, 1986.

Stoll BJ, Hansen R., Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AL, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. Changes in Pathogens Causing Early-Onset Sepsis in Very-Low-Birth-Weight Infants. N Engl J Med 347(4): 240-247, 2002.

Strassheim DJ, Abraham E. Sepsis: current concepts in intracellular signaling. The Internat J Biochem Cell Biol 34: 1527-1533, 2002.

Tsukahara H, J. M., Ohta N, Sato S, Tamura S, Hiraoka M, Maeda M, Mayumi M. Oxidative stress in neonates: evaluation using specific biomarkers. Life Sciences 75: 933-938, 2004.

Velaphi S, S. J., Wendel GD, Cushion N, Eid WM, Sánchez PJ. Early-onset group B streptococcal infection after a combined maternal and neonatal group B streptococcal chemoprophylaxis strategy. Pediatrics 111: 541-547, 2003

Vistot MV, Rocha M, Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. Intern Immunopharm 4: 327-347, 2004.

Wankowicz Z M P, Issekutz A. Synergy between tumour necrosis factor alfa and interleukin-1 in the induction of polymorphonuclear leukocyte migration during inflammation. J Leukoc Biol 43: 349-353, 1998.

We B. Perinatal treatment to prevent early onset group B streptococcal sepsis.

Semin Neonatol 7: 301-314, 2002.

Weber MAR, Candiani CL, Garcia JLA, Castrellón PG . Morbidity and mortality from neonatal sepsis in a tertiary care-level hospital. Salud Publica de mexico, 45(2): 90-95, 2003.

Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. Intensive Care Med 26: 474-476, 2000.



**ANEXOS**

ANEXO 1 : TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

## TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Estamos realizando um trabalho de pesquisa sobre infecções no recém-nascido. Para isto, gostaríamos de contar com a sua colaboração durante alguns minutos para responder a um questionário e de seu consentimento para a coleta de sangue do cordão umbilical de seu bebê após o nascimento. Serão feitas perguntas sobre diferentes aspectos de sua gestação e saúde, como presença de infecções urinárias, se realizou ou não pré-natal, se teve outros filhos, entre outras perguntas. A coleta de sangue não implicará em punção no seu bebê, pois será coletada do cordão umbilical após sua ligadura.

Gostaríamos de deixar claro que esta pesquisa é independente de seu tratamento, parto ou atenção ao seu bebê. Asseguramos que todas as informações prestadas pela senhora são sigilosas e serão utilizadas somente para esta pesquisa. Se você tiver alguma pergunta a fazer antes de decidir, sinta-se a vontade para fazê-la.

Pesquisadora: Ana Carolina Lobor Cancelier

Telefone: 6317000

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2005.

Nome \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ entrevistado:

Assinatura: \_\_\_\_\_

ANEXO 2 : PLANILHA DE COLETA DE DADOS

Nº:
IDADE DA MÃE
IDADE GESTACIONAL
SEXO DO BEBÊ ( ) MASCULINO ( ) FEMININO
TIPO DE PARTO ( ) VAGINAL ( ) CESÁREO
PESO DE NASCIMENTO:
APGAR DE 1 E 5 MINUTOS
TEMPO DE ROTURA DE MEMBRANAS > 18 HORAS SIM( ) NÃO ( )
INFECÇÃO MATERNA ( ) SIM ( ) NÃO
USO DE CORTICÓIDE MATERNO
USO DE ANTIBIÓTICO ANTES DO PARTO ( ) SIM ( ) NÃO QUAL?
HISTÓRIA ANTERIOR DE NEONATO COM SEPSE SIM( ) NÃO ( )
DESENVOLVEU SEPSE NEONATAL SIM( ) NÃO ( )

### EXAMES LABORATORIAIS

EXAME	NASCIMENTO	D0	D1
Ht			
Hb			
Leucócitos			
I.neutrofílico			
Bastões			
Segmentados			
Plaquetas			
PCR			
Lactato			
pH			
pCO2			
pO2			
HCO3			
BE			
Sat.O2			
VHS			
TGO			
TGP			
Uréia			
Creatinina			
TAP			
TTPA			
Glicemia			
IL-1			
IL-6			
TNF			
TBARS			
Carbonil			

**OUTRAS PRODUÇÕES NO PERÍODO**



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)