

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**ALAIDE DA SILVA PITOMBEIRA**

**ESTUDO SOBRE SEPSE NEONATAL: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS  
HEMATOLÓGICOS E DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM RECÉM-  
NASCIDOS SÉPTICOS E NÃO-SÉPTICOS**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2006**

ALAIDE DA SILVA PITOMBEIRA

**ESTUDO SOBRE SEPSE NEONATAL: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS  
HEMATOLÓGICOS E DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM RECÉM-  
NASCIDOS SÉPTICOS E NÃO-SÉPTICOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Mestrado em Patologia Clínica do Departamento de Patologia Clínica e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu

**Co-orientador:** Prof. Dr. José Ájax Nogueira Queiroz

**Fortaleza - Ceará**

**2006**

P76e Pitombeira, Alaíde da Silva.

Estudo sobre sepse neonatal: Avaliação dos parâmetros hematológicos e de subpopulações linfocitárias em recém-nascidos sépticos e não-sépticos / Alaíde da Silva Pitombeira – Fortaleza, 2006.

77 fs.il.

Orientadores: Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu; Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Departamento de Patologia e Medicina Legal

1. Recém-nascido-sepse. 2. Neonato. 3. Recém-nascido-população linfocitárias. I. Título

CDD 618.9201

ALAIDE DA SILVA PITOMBEIRA

**ESTUDO SOBRE SEPSE NEONATAL: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS  
HEMATOLÓGICOS E DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM RECÉM-  
NASCIDOS SÉPTICOS E NÃO-SÉPTICOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Patologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Patologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paola Frassinetti Torres da Costa  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selma Lessa de Castro  
Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS)

---

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas  
Universidade Federal do Ceará

↪ Ao Prof. Dr. **Mário Rigatto**, *in memoriam* um exemplo de vida dedicada à pesquisa e ao ensino da medicina.

↪ Aos meus pais, Manoel (*in memoriam*) e Beatriz, nos seus 95 anos, por sua grande coragem de lutar nos tempos mais adversos e sua invejável lucidez no discernimento das resoluções.

↪ Ao Guilherme, esposo, companheiro e amigo, que relevou os momentos subtraídos de nossa convivência.

↪ Ao Marconi e Mariana, meus filhos, que com carinho e compreensão puderam me entender.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

✎ A DEUS, Nosso Senhor, que permaneceu comigo nos desânimos e dificuldades desde o início até a conclusão desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof Talapala Govindaswamy Naidu, professor da Disciplina de Imunologia, por seu alto nível profissional e de valor humano, agradeço o apoio moral e estímulo científico contínuo, norteando os objetivos e orientando de como alcança-los; por estar sempre disponível em dividir seu limitado tempo que se torna longo por seu espírito de ajuda e acreditar na capacidade individual de cada mestrando que o procura.

À prof. Dra. Maria Helena Pitombeira, por sua paciência em refazer dados e dispor de modo harmônico os parágrafos desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Ájax Nogueira Queiroz, o meu agradecimento pelo seu apoio, estímulo e orientação na execução deste trabalho.

Agradecimento à Banca Examinadora: Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas (Universidade Federal do Ceará), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paola Franssinetti Torres Ferreira da Costa (UNIFOR) e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selma Lessa de Castro (Hospital Infantil Albert Sabin).

À prof. Dra Silvia Magalhães, por seu apoio e exemplo de dedicação aos trabalhos científicos.

À Prof. Rosa Maria Salani Mota, do Departamento de Matemática e Estatística da UFC, pela análise estatística dos dados dessa pesquisa e as enriquecedoras discussões.

Aos Farmacêuticos e técnicos do Laboratório do Hospital Infantil Albert Sabin, especialmente a Luzanira, por sua compreensão em guardar mais uma amostra de sangue para a execução dos exames.

Aos pacientes do CTI (Centro de Tratamento Intensivo) do HIAS e Recém-nascidos do Hospital Angeline, sem os quais não teria sido possível realizar o estudo, com o qual espero contribuir para a compreensão e melhoria no atendimento desses seres tão frágeis fisicamente e muito fortes pela iluminação de Deus.

Aos colegas do Curso de Mestrado, pelos exemplos de companheirismo e estímulos mútuos, exercitados ao longo do curso de pós-graduação.

Aos colegas do Ministério da Saúde em especial ao Fernando Leite e ao Vinícius Holanda que estavam sempre disponíveis para a correção das tabelas desse trabalho.



## RESUMO

A sepse neonatal é uma das mais importantes causas de óbito de recém-nascidos (RNs) internados nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTI). Deste modo, torna-se relevante a identificação de fatores prognósticos no acompanhamento e avaliação desses pacientes. O objetivo deste estudo é determinar os valores hematológicos e as sub-populações dos linfócitos dos RNs sépticos, procurando identificar aqueles parâmetros que correlacionem com a incidência e evolução da sepse no RN. A população analisada foi constituída por 21 RNs sépticos admitidos na CTI do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) e um grupo controle de 10 RNs saudáveis do Centro Obstétrico do Hospital Geral e Maternidade Angeline (HGMA). Foram avaliados nos RNs dos dois grupos (casos e controles), as contagens de hemácias, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, contagens total e diferencial de leucócitos, e contagens absolutas e relativas dos linfócitos T e B; além dos valores de PCR nos RNs sépticos. Adicionalmente, foram avaliados os linfócitos nulos (NK), células B, TCD4+ e TCD8+, pelo método de imunofenotipagem, utilizando-se os marcadores CD56, CD19, (CD3+CD4) e (CD3+CD8) respectivamente. Os resultados foram expressos em variação e média  $\pm$  DP, e avaliados pelo teste T, ao nível de significância de  $p = 0,05$ . Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes, entre RNs sépticos e não sépticos, quanto aos valores de hemácias, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, linfócitos totais, e células T, B, T CD4+ e TCD8+. A contagem de leucócitos totais se mostrou elevada em RNs sépticos,  $18.080 \pm 9.210/\text{mm}^3$ , contra  $12.040 \pm 3.980/\mu\text{L}$  nos controles (valores médios significativamente diferentes,  $p = 0.0166$ ), devido, principalmente, ao aumento de neutrófilos circulantes. Os valores de PCR dos RNs que foram ao óbito estavam elevados, em comparação aos valores dos sépticos que responderam ao tratamento (sépticos que foram a óbito:  $38,00 \pm 13,15$  mg/L; sépticos que responderam ao tratamento:  $13,00 \pm 8,83$  mg/L – **a diferença entre as médias altamente significativa ( $p < 0,041$ )**). Os linfócitos NK apresentaram uma diminuição significativa no grupo de RNs sépticos ( $80 \pm 80/\mu\text{L}$ ; v  $250 \pm 220/\mu\text{L}$  dos controles;  $p = 0,0041$ ). Dos sépticos, o valor médio dos casos que responderam ao tratamento foi de  $32 \pm 20,00/\mu\text{L}$ ; contra  $120 \pm 80,90/\mu\text{L}$  para sépticos que foram a óbito. Ambos os valores se situam abaixo do valor para o grupo controle, porém a diferença entre as

médias desses dois subgrupos de sépticos é significativa ( $p = 0,0124$ ). Esses dados mostram que os NK dos sépticos apresentam valores significativamente abaixo dos controles, independente da resposta desses ao tratamento. Porém, o real significado da oscilação dos valores de NK entre os sépticos que responderam ao tratamento e os que foram a óbito, não pôde ser avaliado devido aos pequenos números de RNs que compuseram esses grupos de estudo. Investigações com maior número de casos de sepse podem melhor definir a possível relação da célula NK com a evolução e o óbito do recém-nascido com sepse.

**Palavras-chave:** Sepse neonatal; sub-populações linfocitárias; células NK

## ABSTRACT

### **Studies on sepsis in the newborn: evaluation of the hematological parameters and immunophenotypy of lymphocytes in septic and non-septics.**

Neonatal sepsis is one of the most important cause of death of the newborn admitted to the Intensive Care Units; hence, the identification of the prognostic factors of this disease becomes very relevant in the follow up and evaluation of the patients. The aim of this study was to evaluate the hematological parameters and the lymphocyte subpopulations of the newborn with sepsis; in order to identify those parameters that may correlate with the onset of this neonatal disease. Twenty one newborns admitted to the ICU of the Albert Sabin Children's Hospital, and a group of 10 healthy newborns from the Obstetric Center of the Angeline General and Maternity Hospital, were studied. In the two groups, red cells, hematocrit, hemoglobin, platelets, total and differential leukocytes, absolute and relative T and B cells; as also the blood PCR values in the septic newborn, were determined. In addition, NK, B, TCD4+ and TCD8+ cell numbers were evaluated by immunophenotyping, using their respective markers CD56, CD19, (CD3 + CD4) and (CD3 + CD8). The data were expressed as variation and mean  $\pm$  SD, and analyzed by Student's T test, at the significance level of  $p = 0.05$ . Significant differences were not observed between septic and non-septic newborn, in the mean values of the parameters: red cells, hematocrit, hemoglobin, platelets, total lymphocytes, and T, B, T CD4+, TCD8+ lymphocytes. Total leukocyte counts were elevated in septic newborns ( $18.080 \pm 9.210/\mu\text{L}$  in septic patients, against  $12.040 \pm 3.980/\mu\text{L}$  in controls; the difference between the means significant,  $p = 0.0166$ ); due, principally, to increase of circulating polymorphic neutrophils. PCR levels were elevated in newborns with fatal sepsis; as compared to those of septic newborns who responded to treatment (fatal sepsis:  $38,00 \pm 13,15$  mg/L; non-fatal sepsis:  $13,00 \pm 8,83$  mg/L – the difference between the means highly significant,  $p < 0,01$ ). The NK cells were highly significantly reduced in septic newborns ( $80 \pm 80/\mu\text{L}$ ;  $v$   $250 \pm 220/\mu\text{L}$  dos controles;  $p = 0,0041$ ). Of the septic cases, the mean NK values for those who responded to treatment was  $32 \pm 20/\mu\text{L}$ ; against  $120 \pm 80,90/\mu\text{L}$  for those with fatal sepsis. Both these values were below that of the control group; but

the difference between the means of the two subgroups of the septic newborns was significant ( $p = 0,0124$ ). These results suggest that NK cells were reduced significantly in septic newborns; irrespective of their response to treatment, or not. However, the true significance of the oscillation of NK cell numbers in neonatal sepsis could not be evaluated in this study, because of the small numbers of septic newborns available for the subgroups under study. Investigations with much larger number of cases of septic newborns could better define the real role of NK cells in sepsis and its evolution to fatality.

**Key words:** Neonatal sepsis; lymphocyte subpopulations; NK cells

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Citômetro de fluxo.....	40
<b>Figura 2</b>	Citômetro de fluxo – detalhes 1.....	40
<b>Figura 3</b>	Citômetro de fluxo – Unidade de Análises.....	40
<b>Figura 4</b>	Subpopulações linfocitárias – Valores (%).....	41
<b>Figura 5</b>	Populações celulares – FS x SS.....	41
<b>Figura 6</b>	LT (FITC) x LB (PE) – LFL1 x LFL2.....	41
<b>Figura 7</b>	Subpopulações de LT – CD3 (FITC) x CD4 (PE).....	42
<b>Figura 8</b>	Percentagem de LT – CD3 (FITC).....	42
<b>Figura 9</b>	CD4 / CD8.....	42
<b>Figura 10</b>	LT / LB.....	43
<b>Figura 11</b>	LinfócitosT e B.....	43

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Distribuição percentual dos RNs sépticos de acordo com a idade (N = 21).....	45
<b>Gráfico 2</b>	Distribuição percentual dos RNs sépticos, de acordo com o sexo (N = 21).....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Distribuição dos recém-nascidos (casos e controles) de acordo com a idade.....	45
<b>Tabela 2:</b>	Distribuição dos recém-nascidos (casos e controles) de acordo com o sexo.....	46
<b>Tabela 3:</b>	Distribuição dos valores da série vermelha e plaquetas (casos e controles).....	47
<b>Tabela 4:</b>	Distribuição dos valores da série vermelha e das plaquetas dos pacientes, de acordo com a evolução (óbito e alta).....	48
<b>Tabela 5:</b>	Distribuição diferencial dos neutrófilos e índice neutrofílico (casos e controles).....	50
<b>Tabela 6:</b>	Distribuição dos leucócitos totais, linfócitos totais e subpopulações (casos e controles).....	52
<b>Tabela 7:</b>	Distribuição diferencial dos neutrófilos e índice neutrofílico dos pacientes de acordo com a evolução (óbito e alta).....	53
<b>Tabela 8:</b>	Distribuição dos leucócitos totais, linfócitos totais e subpopulações dos pacientes de acordo com a evolução (óbito e alta).....	55
<b>Tabela 9:</b>	Distribuição dos valores de PCR em RNs sépticos de acordo com a evolução.....	56

## LISTA DE SIGLAS

° C:	graus centígrados
≤:	menor ou igual a
≥:	maior ou igual a
μl:	microlitro
BPI:	bactericidal permeability increasing protein
Bpm:	batimentos por minuto
C9:	complemento nove
CO <sub>2</sub> :	dióxido de carbono
CTI:	Centro de Tratamento Intensivo
D0:	dia zero
EDTA	ethylenediamine tetracetic acid
FIGO:	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
G-CSF:	fator estimulador de colônias granulócitos
GM-CSF:	fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
HIAS:	Hospital Infantil Albert Sabin
HIV:	vírus da imunodeficiência humana
HSS:	sistema de escore hematológico
I/M:	neutrófilos imaturos/ maduros
I/T:	neutrófilos imaturos/ total de neutrófilos
IFN:	interferon
Ig:	imunoglobulina
IL:	interleucina
lrpm:	incursão respiratória por minuto
LFA-1:	antígeno de função leucocitária
LT CD4+:	linfócitos T helper
MIP:	proteína inflamatória do macrófago
NK:	natural killer
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PCR:	proteína C reativa
PE:	ficoeritrina
PHA:	fitohemaglutinina



PMNs:	polimorfonucleares
RN:	recém-nascido
RNPT:	recém-nascido pré-termo
RN's:	recém-nascidos
RNT:	recém-nascido à termo
s:	segundos
SC:	sistema complemento
TGF- $\beta$ :	fator transformador de crescimento beta
TNF:	fator de necrose tumoral
UTI:	Unidade de Tratamento Intensivo
VHS:	velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 Considerações Gerais.....	19
1.2 Mecanismos de defesa inespecíficos e específicos.....	22
1.3 Diagnóstico clínico e laboratorial.....	26
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
3.1 Estudo da População - Casuística.....	34
3.1.1 Casos.....	34
3.1.2 Controle.....	35
3.2 Análise laboratorial.....	37
3.3 Análise estatística.....	43
3.4 Considerações éticas.....	44
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Recém-Nascidos Sépticos e Controles.....	45
4.2 Parâmetros Hematológicos.....	47
4.2.1 Série Vermelha e Plaquetas.....	47
4.2.2 Série Branca.....	49
4.3 PCR.....	56
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>76</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

A infecção neonatal é uma das principais causas de morbi-mortalidade do recém nascido (RN) (KLEIN e MARCY, 1995).

A sepsé bacteriana ocorre em 1% dos RNs a termo (RNT) (SIEGEL; McCRACKEN, 1981), sendo 50 vezes mais comum no RN de extremo baixo peso ao nascer, ou seja, RN com menos de 800g (KUSTER, 1983). Quarenta por cento das mortes nos primeiros três dias de vida e 45% das mortes após duas semanas de vida, são relacionadas à infecção (STOLL; GORDON; KORONES, 1996). São fatores de risco a prematuridade, a baixa idade no início da infecção, a presença de meningite e a qualidade dos cuidados de suporte (SIEGEL, 1985).

A incidência de sepsé neonatal varia de 30% em RN de muito baixo peso ao nascer, 0,4% em RN pré-termo (RNPT) e 0,1% em RN a termo, ocorrendo maior morbidade e mortalidade, especialmente nos pré-termos, devida à imaturidade da granulopoese e à limitada capacidade na proliferação das células progenitoras, que caracterizam o sistema imune imaturo dos RNs (PARRAVICINI et al., 2002; MOHAN; BROCKLEHURST, 2003).

A proteção do RN contra as infecções inicia-se na vida intra-uterina. O líquido amniótico representa uma barreira muito eficiente, em virtude da presença de vários fatores de defesa, que incluem betalissina, peroxidase, transferrina, imunoglobulinas e lisozima, e a concentração desses fatores aumenta com a progressão da gestação. (CARNEIRO-SAMPAIO; GRUMACH, 1991).

O feto tem capacidade de produzir imunoglobulina (IgM), precocemente, se estimulado por antígenos, a partir da oitava semana (YODER; POLIN, 1997). Entretanto, por falta de estimulação antigênica e pela deficiência na colaboração dos linfócitos T helper (LT CD4<sup>+</sup>) com os linfócitos B na produção de anticorpos, a anticorpopogênese é baixa ao nascimento (YODER; POLIN, 1997). No baço e nos linfonodos, os centros germinativos, com seus plasmócitos, só se tornam evidentes após a oitava semana de vida pós-natal. Na presença de infecções intra-uterinas,

observa-se no feto o desenvolvimento de centros germinativos com a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, que passam a produzir e excretar os anticorpos (BALLOW et al, 1986).

A habilidade em montar respostas mediadas por anticorpos ou células para antígenos específicos é adquirida seqüencialmente, durante o curso do desenvolvimento do sistema imune embrionário. O transporte de IgG através da placenta é detectado a partir da oitava semana de gestação. A IgG fetal é quase exclusivamente de origem materna, embora o feto inicie a sua própria síntese a partir da 30ª semana de vida intra-uterina. A concentração de IgG igual ou superior à materna é adquirida após 34 semanas de gestação. A partir daí, aumenta significativamente, e, ao nascimento, o nível de IgG excede o materno em 5-10%. Os recém-nascidos pré-termo (RNPT) apresentam, ao nascimento, níveis de IgG inferiores aos RN a termo (VILELA, 2001). Dentre as quatro subclasses de IgG, a IgG1 e a IgG3 apresentam eficiente transferência placentária, ao contrário da IgG2 e IgG4, que, mesmo ao nascimento a termo, se apresentam em concentrações mais baixas em relação ao nível materno (COSTA-CARVALHO et al., 1988). A transferência de anticorpos IgG da mãe para o feto representa a aquisição passiva da imunidade humoral materna, a qual se acentua à medida que a gestação se aproxima do termo, sendo predominante no último trimestre. Assim, os recém-nascidos pré-termo (RNPT) apresentam, ao nascimento, níveis de IgG inferiores aos dos RNs a termo (BALLOW et al., 1986).

Além da prematuridade, outras condições associadas à redução do transporte de anticorpos da classe IgG através da placenta são: baixo peso ao nascimento, gemelaridade, hipergamaglobulinemia materna, infecção placentária por malária, infecção materna pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e níveis elevados de anticorpos contra a mesma especificidade antigênica (De MORAES-PINTO; IAZZETTI; FARHAT, 2001).

A vulnerabilidade às infecções no período neonatal é decorrente, dentre outros fatores, da imaturidade estrutural da pele e das mucosas, do sistema imunológico que apresenta deficiências na síntese de anticorpos e de componentes do sistema do complemento (SC), na função opsonizante e na capacidade fagocitária (YODER; POLIN, 1997).

Neutrófilos de RN a termo e pré-termo têm atividade fagocítica normal

sob condições fisiológicas (SALGUEIRO; COSTA; COSTA-VAZ, 2000). Em testes *in vitro*, essas células expressam reduzida quantidade do receptor CR3 (CD11b/CD18) do complemento, o que contribui para a diminuição da atividade quimiotática dos polimorfonucleares (PMNs) em comparação com os PMNs de adultos. Adicionalmente, a fagocitose de patógenos bacterianos *in vivo* pelos PMNs do RN também está reduzida pela diminuição de opsoninas circulantes (MILLER, 1979).

A colonização do recém-nascido a termo (RNT) sadio pode, geralmente, ser documentada no 2º ou 3º dia de vida. O nariz e o umbigo, com frequência, tornam-se colonizados com *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus α-hemolítico*, e o trato gastrointestinal com *E. coli*, *Lactobacillus* e anaeróbios (DONOWITZ, 1989). Goldman, Leclair e Macone (1978), mostraram que a colonização em neonatos, criticamente enfermos, é diferente das crianças saudáveis. A colonização inicial pode se dar por *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* ou *Citrobacter* em substituição a *E. coli*. Segundo Harpin e Rutter (1983), a pele e as mucosas do RN têm mostrado serem mais permeáveis a antígenos exógenos do que em lactentes.

O feto e o neonato são particularmente vulneráveis a danos causados diretamente por mecanismos imunológicos, ou infligidos por agentes infecciosos devido a relativa imaturidade e inexperiência do sistema imune neonatal (PATOLE; VIJAYAKUMAR; JOG, 2002). Segundo Varas et al. (2000), as diferenças na competência imunológica entre neonato e adulto envolvem tanto a imunidade inata quanto a adquirida.

O elemento central da resposta imune inata à infecção bacteriana é o neutrófilo, uma célula que contém grânulos citoplasmáticos repletos de proteínas anti-bacterianas e peptídeos (LEVI et al., 1999). Entretanto esse mecanismo de defesa mostrou-se deficiente no neonato. A competência quimiotática e a capacidade bactericida do neutrófilo é mais reduzida quando a criança é submetida ao estresse (SHIGEOKA; CHARETTE; WYMAN, 1981). Os granulócitos neonatais demonstram anormalidades na migração e fagocitose de microorganismos, mas revelam mecanismo intracelular de morte bacteriana normal (YODER; POLIN, 1997).

Levi et al. (1999) consideraram que a atividade dos neutrófilos no adulto contra bactérias Gram-negativas dependia, em grau significativo, da presença de

grânulos primários (azurófilos) que contêm proteína bactericida que aumenta a permeabilidade (bactericidal/permeability-increasing protein - BPI), a qual se liga com alta afinidade ao polissacarídeo bacteriano e efetua a destruição das bactérias Gram-negativas. Esses autores avaliaram o conteúdo intracelular e extracelular da BPI nos neutrófilos do sangue periférico de 22 adultos e no sangue do cordão de 21 RNs, e observaram que as células dos RNs continham 3 a 4 vezes menos BPI por célula do que as células do adulto. A relativa deficiência da BPI neutrofílica dos neonatos não foi atribuída à desgranulação do estoque intracelular da proteína, relacionada ao estresse peri-natal. Estes dados sugerem que os neutrófilos de RNs são seletivamente deficientes em atividade contra bactérias Gram-negativas, o que contribui para o aumento da incidência de sepse por essas bactérias.

.Segundo PARRAVICINI et al. (2002), a desregulação da expressão e produção de citocinas hematopoéticas no neonato contribui para deficiências qualitativas e quantitativas da atividade das células progenitoras mieloides e, conseqüentemente, no decréscimo da eficácia e na função do neutrófilo maduro efetor. Estas condições contribuem, em grande parte, para o aumento da incidência e mortalidade associada com a sepse neonatal.

## **1.2 Mecanismos de Defesa Inespecíficos e Específicos**

O sistema imunológico atua através dos mecanismos de defesa inespecíficos (imunidade inata) e específicos (imunidade adaptativa). A divisão é mais didática do que funcional, uma vez que o conjunto age, sinergicamente, na maioria das vezes.

**Mecanismos imunes inespecíficos:** O sistema imune inato representa a imunidade não específica, presente desde o nascimento, que não requer repetidas exposições aos patógenos, sendo incapaz de diferenciar entre o próprio e o não próprio. Apesar de sua não especificidade, apresenta um importante papel no controle da imunidade adaptativa, através da regulação de moléculas co-estimuladoras e citocinas efetoras. A imunidade inata inclui: moléculas /receptores de reconhecimento padrão, peptídios antimicrobianos, o sistema complemento, mediadores inflamatórios, e produção de citocinas por células imune

(UTHAISANGSOOK et al., 2002).

A imunidade inata do RN apresenta peculiaridades tanto nos componentes celulares como nos humorais da resposta inflamatória (BELLANTI et al., 1994). A resposta inflamatória é desempenhada primariamente pelos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), monócitos e macrófagos, exercendo a fagocitose, sendo este primeiro mecanismo capaz de eliminar microorganismos invasores. Os PMNs desempenham as funções de quimiotaxia, fagocitose e atividade microbicida. Em processos inflamatórios, células imaturas da medula óssea podem ser rapidamente recrutadas para a circulação. A reserva medular de PMNs (metamielócitos, bastonetes e segmentados) é considerada pequena, em relação ao peso, nos RNs a termo e nos RNs pré-termo, em comparação com a do adulto (ERDMAN et al., 1982). Segundo Cairo (1989), a reserva medular no RN é de duas vezes o número de neutrófilos circulantes, enquanto no adulto é de 14 vezes. Assim, RNs são menos capacitados para aumentar a concentração de neutrófilos circulantes em resposta a diferentes estímulos. (MOHAN; BROCKLEHURST, 2003).

A geração e regulação dos PMN depende da atividade equilibrada dos fatores reguladores positivos [interleucina-3 (IL-3), IL-5, fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF)], e negativos [interferons (IFN), fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), proteínas inflamatória do macrófago 1- $\alpha$  (MP-1 $\alpha$ ), prostaglandinas, lactoferrina e outras proteínas ligadas ao ferro] (SALGUEIRO; COSTA; COSTA-VAZ, 2000).

A síntese dos componentes do sistema complemento (SC), se inicia na vida intra-uterina e aumenta com o progredir da gestação, conseqüentemente, os seus níveis são relativamente baixos nos prematuros. Somente pequenas concentrações das proteínas do SC materno são transportadas para o feto (EDWARDS, 1986). No RN a mais importante deficiência no SC é marcada pelo decréscimo da atividade de opsonização, tanto na via clássica quanto na via alternativa (FARMAN; STIEHM, 1969). Hogasen et al. (2000) avaliaram os fatores de ativação do SC em 72 RN sadios, e em dez RN com rotura prematura e prolongada de membranas amnióticas, porém sem sepse. Os autores observaram que a concentração do C9 mostrou uma correlação positiva com a idade gestacional, e ficou em 10,8% mais baixo do valor normal do adulto.

A **célula *natural killer*** (NK), um dos componentes da imunidade inata, é derivada de um precursor medular e representa cerca de 15% dos linfócitos do sangue periférico. As NK foram inicialmente definidas pela sua capacidade de lisar, *in vitro*, linhagens celulares de certos tumores e células infectadas por vírus. Essa atividade dos linfócitos nulos é considerada inespecífica, por eles não possuírem receptores específicos para antígenos dos tecidos alvos. Eles participam da imunidade inata contra as infecções intracelulares e células neoplásicas, e migram do sangue aos tecidos infectados em resposta a citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) (JOHN, 2000). As células NK possuem duas funções efetoras: morte celular e secreção de citocinas. Estudos pioneiros sugerem fortemente que o papel fisiológico primário das células NK é determinar uma defesa inicial contra microorganismos patogênicos nos primeiros cinco dias de vida, período em que o sistema imune começa a interagir com os antígenos estranhos ao organismo (TRINCHIERI, 1989; YOKOYAMA, 1995). A célula NK pode destruir a célula alvo através de mecanismo necrótico ou apoptótico (GARDINER; REEN, 1998). Dominguez et al., (1998), verificaram, mediante ensaio não-radioativo, que a função da célula NK do cordão umbilical pode estar suprimida, ou essas células são funcionalmente imaturas. Esses autores demonstraram que as NK do cordão se tornam funcionais quando estimuladas com citocinas usadas para ativar células de adulto (IL-2, IL-12 e IL-15). Seus dados sugeriram existência no sangue do cordão umbilical de células, não identificadas, que suprimiam a função dos NK e que havia nítida diferença nas células NK do sangue periférico de adultos e do cordão umbilical.

Ribeiro-do-Couto et al. (2003) realizaram a caracterização ultraestrutural das interações célula alvo-efetor, revelando que as células NK neonatais são mais fortemente ativadas em contatos com células K562, do que com células NK do adulto. Além disso, a capacidade neonatal de estabelecer contato, em particular contatos extensos, é significativamente reduzida quando comparada com a NK do sangue do adulto. Entretanto, nenhuma significativa diferença foi encontrada, seja na condição de ativação seja no nível de expressão do LFA-1 na superfície da célula. Em virtude dos extensos contatos serem cruciais para a efetiva formação da sinapse imunológica, esses dados sugerem que uma sinalização limitada, ou uma sinalização positiva não firme pode ocorrer nas células NK neonatais, restringindo a



capacidade de lise mediada por essas células. As células NK são as maiores produtoras de citocinas durante a sepse bacteriana, mas seu preciso papel não é completamente compreendido. Scott et al. (2003) realizaram estudo investigando o efeito da depleção da célula NK com e sem ativação prévia sobre a função do macrófago e a eliminação bacteriana em uma infecção. Os autores concluíram que a ativação das NK melhorava a resolução bacteriana através do aprimoramento funcional do macrófago, dessa forma ajudando na resolução de um subsequente desafio bacteriano. Macrófagos são menos capazes de eliminar as bactérias quando as células NK estão depletadas e sem ativação. Portanto as células NK são importantes na eliminação de bactérias, através de interações com os macrófagos.

**Mecanismos imunes específicos:** a maturação dos componentes da resposta imune específica (Linfócitos T e B) se inicia no feto entre a 8<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> semanas de gestação. A diferenciação das células envolvidas nestes mecanismos ocorre através da via linfopoética, com os linfócitos T, como células efetoras da imunidade celular, e com os linfócitos B que se diferenciarão em plasmócitos para a produção de anticorpos, constituindo-se os principais elementos da imunidade humoral (BELLANTI; PUNG, ZELIGS, 1994).

A contagem de linfócitos B no sangue periférico apresenta um pico em torno da sexta semana de vida, é alta durante o primeiro ano, porém a capacidade da criança para gerar as imunoglobulinas IgG e IgA somente amadurece durante a primeira década da vida (VRIES et al., 2000).

Em torno da oitava semana de vida intra-uterina, células primordiais provenientes da medula óssea migram em direção ao timo onde sofrem intensa proliferação, maturação e seleção, transformando-se em linfócitos T. Estes, ao saírem do timo, vão colonizar os órgãos linfóides secundários, sendo posteriormente encontrados no sangue periférico. O número absoluto de linfócitos e a contagem de linfócitos T no sangue periférico dos RN são maiores do que no adulto (VRIES et al., 2000).

No sangue periférico, cerca de 65% dos linfócitos T totais (CD3<sup>+</sup>), expressam fenótipo CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e são denominados de auxiliares/indutores; outros são portadores de moléculas CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> são os supressores/citotóxicos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1994). Pequena porcentagem dos linfócitos circulantes, por

não expressarem nem os marcadores do linfócito T nem dos linfócitos  $\beta$  na sua superfície, são denominados de Células Nulas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1994).

No feto e no RN, as funções das células T são diminuídas, quando comparada ao adulto, incluindo a citotoxicidade mediada pela célula T nas infecções virais, a sensibilidade cutânea e o estímulo para a diferenciação das células B (LEWIS; WILSON, 1995). Entretanto, os linfócitos T fetais, a partir da 12<sup>a</sup> semana de gestação, se mostram capazes de responder, *in vitro*, ao estímulo mitogênico e blastogênico da fitohemaglutinina (PHA) (STIEHM, 1996). A maturidade da resposta celular no RN é comprovada pelo sucesso da vacinação neonatal contra a tuberculose e a varíola, bem como pela competência de rejeição de transplantes alogênicos de pele (COMMANS-BITTER et al., 1997).

### 1.3 Diagnóstico Clínico e Laboratorial da Sepses

O diagnóstico precoce da sepses em recém-nascidos é difícil em virtude dos primeiros sinais clínicos serem mínimos e inespecíficos e não haver um indicador laboratorial precoce e definitivo, razão pela qual a observação clínica é, muitas vezes, o único recurso disponível (BONADIO; HENNES; SMITH, 1993).

As manifestações clínicas mais freqüentes na sepses em RNs a termo são: instabilidade térmica (hipotermia  $< 36,5^{\circ}\text{C}$  ou hipertermia  $> 37,5^{\circ}\text{C}$ ), apnéia, dificuldade respiratória (taquipnéia, gemência, retrações esternais e subcostais, batimentos de asas do nariz), cianose, bradicardia, letargia, irritabilidade, hipotonia, convulsão, icterícia (particularmente aumento da fração direta), distúrbios gastrointestinais (vômitos, diarreia, distensão abdominal, resíduo gástrico, recusa alimentar), palidez cutânea, hipotensão, enchimento capilar lento, hepatomegalia, escleredema, e sinais de sangramento com quadro clínico sugestivo de coagulação intravascular disseminada. O RN prematuro, porém, freqüentemente desenvolve sepses sem sinais típicos (JURGES; HENDERSON, 1996).

O diagnóstico de certeza da sepses neonatal requer a hemocultura positiva (FANAROFF; MARTIN, 1997). Entretanto, as culturas de líquidos biológicos e de secreções do organismo apresentam uma baixa incidência de resultados

positivos (KLEIN; MARCY,1990; HAMMERBERG et al., 1992). Apesar da baixa sensibilidade, a hemocultura positiva ainda é considerada o teste mais fidedigno para o diagnóstico definitivo da sepse.

Na ausência de culturas positivas, alguns autores sistematizaram os dados clínicos e laboratoriais, estabelecendo critérios para o diagnóstico positivo para sepse: apnéia, taquipnéia, bradicardia, enchimento capilar lento, hipotensão, distensão abdominal, hepatomegalia, instabilidade térmica. Os parâmetros laboratoriais incluem: PCR  $\geq$  6mg/L neutropenia (neutrófilos  $<$ 1.500/uL), e a relação neutrófilos imaturos/total  $\geq$  0,2 nas primeiras 72 horas de vida (MANROE et al.,1979; TOLLNER, 1982; MESSER et al., 1996; PANERO et al., 1997).

A contagem total de leucócitos no sangue tem sido de uso limitado no diagnóstico de infecção neonatal, em virtude da grande variação e da sobreposição de valores em crianças normais e com infecção neonatal. O uso da contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico tem melhorado a sensibilidade de diagnóstico no *screening* para a doença infecciosa neonatal. No entanto, resultados falso-positivos e falso-negativos são freqüentes nos primeiros três dias de vida (WEITZMAN, 1975).

A interpretação dos perfis hematológicos pode ser dificultada quando a leucopenia e a neutropenia ocorrem no neonato em associação com severa hipertensão arterial materna (OSKI; STOCKMAN, 1982; ENGLE; ROSENFELD, 1984).

Anwer e Mustafa (2000), avaliaram 15 RNs com clínica sugestiva de sepse. Cinco testes foram usados para um rápido diagnóstico: contagem total de leucócitos e absoluta de neutrófilos, relação neutrófilos imaturos/total, contagem de plaquetas e PCR. A proteína C reativa e a contagem absoluta de neutrófilos tinham uma sensibilidade de 60% com uma especificidade de 50%. A contagem de leucócitos apresentou uma especificidade de 93% mas a sensibilidade de 14%.Os autores concluíram que nenhum teste usado isoladamente era confiável, mas quando em combinação estes cinco testes ajudariam o diagnóstico de sepse dentro de poucas horas.

Gonzalez et al. (2003), determinaram os marcadores precoces da sepse de início tardio em RNs prematuros, com prévia hemocultura positiva. Os sinais

mais comuns foram dessaturação, aumento do resíduo gástrico, e a relação I/T > 0,16 diferenciando entre infecções Gram-positiva, Gram-negativa e fúngica.

Caksen et al. (2003) avaliaram 20 RN com sepse, classificados de acordo com os critérios de Tollner (1982) e Rodwell; Leslie; Tudehope (1988). A contagem de leucócitos, proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e interleucina-6 (IL-6) também foram avaliados em todos os neonatos. Foi encontrada uma correlação positiva entre o sistema de escore, os níveis de PCR e TNF-alfa, nenhuma correlação com IL-6.

**O índice neutrofílico I/T** (neutrófilos imaturos/total}, em RN saudáveis, atinge sua proporção máxima de 0,16 nas primeiras 24h de vida e declina gradualmente, estabilizando-se a 0,12 do quinto aos 28 dias de vida. São considerados sugestivos de infecção os valores  $\geq 0,2$ . A contagem absoluta de neutrófilos e o índice neutrofílico são dados úteis na avaliação do neonato com suspeita de sepse (MANROE et al., 1979).

A **neutropenia** (contagem absoluta de neutrófilos  $< 1.500/uL$ ) não associada à infecção é frequentemente observada no RN em casos de asfixia severa ao nascer (Apgar  $< 5$  aos cinco minutos de vida), extrema prematuridade, retardo do crescimento intra-uterino, ou após uma gravidez complicada por pré-eclampsia (KOENING; CHRISTENSEN, 1989, 1991). Segundo Manroe et al. (1979), a neutropenia, é o sinal preditivo positivo mais exato de infecção do neonato. Os neonatos sépticos e neutropênicos têm mais alta mortalidade, do que os RNs sépticos mas não neutropênicos (MOHAN; BROCKLEHURST, 2003).

A **neutrofilia** (contagem absoluta de neutrófilos  $> 5.400/uL$ ) é observada no RN em circunstâncias como febre materna, trabalho de parto prolongado, síndrome de aspiração de mecônio, pneumotórax, convulsão, choro prolongado e hipoglicemia assintomática ( $< 30mg/dL$ ) (MANROE et al., 1979; POWELL, 1995).

O total de neutrófilos no sangue do cordão de crianças nascidas por parto vaginal ou por cesárea após prévio trabalho de parto (12 a 14 horas) é duas vezes maior, em relação às crianças que nasceram por cesárea sem trabalho de parto (POWELL, 1995).

Num estudo prospectivo, Rodwell et al. (1988) avaliaram os achados hematológicos, como teste de *screening* para a sepse no primeiro mês de vida.

Com os dados obtidos foi elaborada uma estratégia diagnóstica usando sete pontos em um sistema de escore.

### Escore hematológico (RODWELL et al., 1988)

CRITÉRIO	ANORMALIDADE	ESCORE
Relação neutrófilos imaturos/neutrófilos totais*	Aumento	1
Total de PMNs*	Neutrofilia ou neutropenia	1
Relação neutrófilos imaturos/maduros	$\geq 0,3$	1
Contagem de neutrófilos imaturos*	Aumento	1
Total de leucócitos	Leucopenia ou leucocitose (<5.000/uL ou $\geq 25.000, 30.000$ e 21.000/uL ao nascer, com 12-24h e após 2 dias, respectivamente)	1
Alterações degenerativas dos neutrófilos**	$\geq 3 +$ para vacuolização, granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle	1
Contagem de plaquetas	<150.000/uL	1

\*Valores normais são definidos pela referência de Manroe et al. (1979).

\*\*Quantificação na escala de zero a quatro de acordo com a classificação de Zipursky et al.(1976).

Rodwell et al. (1988), concluíram que as características hematológicas presentes nas crianças que faleceram com sepse incluíam leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, e alterações degenerativas  $\geq 3 +$  nos polimorfonucleares. Somente a neutropenia foi significativamente associada com o prognóstico.

Em novo estudo, Rodwell et al. (1993) expressaram que o escore hematológico ou a relação I/T em conjunto com os dados clínicos são valiosos na identificação precoce de sepse em RNs neutropênicos, e podem ser utilizados no

desenvolvimento da estratégia para o manejo precoce dessas crianças. Acrescentam ainda que a combinação da contagem de neutrófilos ( $\leq 500/uL$ ) e o escore ( $\geq 3$ ) implica em pior prognóstico.

Ghosh, Mittal, Jaganathan (2001) avaliaram a utilidade do sistema de escore hematológico (HSS) de Rodwell et al. (1988) e concluíram que a relação I/T anormal seguida por uma relação neutrófilos imaturos/ maduros (I/M) anormal foram os indicadores mais sensíveis para identificação de crianças com sepse. Esses dois critérios, associados com trombocitopenia ( $<150.000/uL$ ), tem um alto valor preditivo negativo (acima de 94%). O estudo também mostrou que o escore mais elevado aumenta a certeza da presença da sepse. Os autores concluíram que o HSS é simples, rápido, baixo custo efetivo e um instrumento facilmente disponível e útil para o diagnóstico precoce da sepse neonatal, podendo determinar uma decisão quanto ao início da antibioticoterapia.

A trombocitopenia é um problema hematológico comum encontrado no período neonatal, particularmente nos RNs doentes, prematuros e neonatos admitidos em unidades de tratamento intensivo. A contagem de plaquetas e o volume médio das mesmas no RN são semelhantes aos do adulto e das crianças ( $150.000$  a  $450.000/uL$  e  $7,5\mu$ , respectivamente). Valores entre  $100.000$  a  $150.000/uL$  necessitam seguimento nas avaliações. (LOKESHWAR et al. 2001) Aproximadamente 60% dos casos de trombocitopenia neonatal fazem parte do grupo de trombocitopenia idiopática, com as contagens de plaquetas variando de  $50.000$  a  $100.000/uL$ , as quais podem persistir por muitas semanas. Condições associadas com este grupo são, hipertensão pulmonar, fototerapia, neonatos pré-termo e insuficiência placentária (LOKESHWAR et al., 2001).

As plaquetas são afetadas no processo séptico. As endotoxinas parecem ter um efeito direto nas células do endotélio vascular, onde as plaquetas e outras células são encontradas aderidas ao endotélio danificado (McGRATH; STEWART, 1969; CORRIGAN, 1974). Estudos da função das plaquetas na sepse têm mostrado resultados conflitantes. A agregação de plaquetas circulantes parece estar reduzida, ainda que os receptores de plaquetas estejam presentes em quantidades normais. Na sepse elas são capazes de modular não somente suas próprias funções mas também das células que as rodeiam e não sofrem ação das citocinas ( $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6) produzidas nessas condições (VINCENT; YAGUSHI; PRADIER, 2002).

A proteína C-reativa (PCR), identificada em 1930, é considerada uma substância de fase aguda, sintetizada pelo fígado como parte da resposta inflamatória a uma infecção bacteriana e injúria tecidual, sendo um indicador precoce de condições inflamatórias infecciosas. Desde sua descoberta, tem sido estudada como um dos parâmetros de *screening* para inflamação, um marcador de doença ativa e como um auxiliar em diagnóstico (CLYNE; OLSHAKER, 1999). A PCR é produzida durante o desenvolvimento fetal, que se inicia entre a 8<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas de gestação, precedendo a produção de imunoglobulinas (SHINE et al., 1985).

A falta da correlação entre os níveis de PCR no sangue materno e os do cordão umbilical revela que não há uma transferência significativa de PCR através da placenta (POURCYROUS et al., 1991).

O nível de PCR eleva-se em infecção bacteriana e fúngica, em crianças além da idade neonatal, mas permanece baixa em infecção viral (PELTOLA; JAAKKOLA, 1988). A PCR é significativamente elevada no início da avaliação em 50% a 90% das crianças com infecção bacteriana sistêmica. Entretanto, crianças com início de infecção nas primeiras 12 horas de vida e crianças com infecção pelo estreptococo grupo B podem não ter um elevado valor de PCR (FANAROFF; MARTIN, 1997). A PCR se relaciona fortemente com as infecções bacterianas em neonatos, mas o seu aumento não é freqüentemente visto até 12 a 24 horas após o início da infecção neonatal, sendo menos útil como teste diagnóstico no estágio precoce da infecção (MATHERS; POHLAND, 1987; PELTOLA; JAAKKOLA, 1988). Pourcyrous et al. (1993) mostraram que a determinação seriada da PCR com intervalo de 12 horas após início dos sinais e sintomas da doença, aumenta a sensibilidade em detectar sepse.

Jaswal et al. (2003) avaliaram o nível de PCR no soro de 50 RNs com suspeita de sepse, com a finalidade de determinarem a duração do uso de antibiótico. Em 44% dos RNs o valor da PCR estava normal, sendo o antibiótico suspenso com 3 dias; em 8% dos RNs o nível da PCR retornou ao valor normal com o tratamento, e o antibiótico foi suspenso com 5 a 7 dias; porém, em 48% a terapia foi continuada por mais de 7 dias, pois os valores da PCR estavam altos ou elevavam-se persistentemente. O valor preditivo negativo da PCR sérica foi 100% determinante em decidir a duração da antibioticoterapia.

Manucha et al. (2002), avaliaram vários parâmetros hematológicos usados para formular o sistema de escore definido por Rodwell et al. (1988) e compararam com os resultados da PCR e concluíram que, sob suspeita de sepse, a PCR não tem nenhuma vantagem sobre o HSS, como um teste isolado ou em combinação.

Hengst (2003), considera que há boas evidências que validam o uso do nível quantitativo seriado de PCR, obtido 24 após o início de sinais e sintomas de infecção, com medidas seriadas a cada 12 a 24h, como a mais sensível e confiável das informações sobre a existência da sepse e que pode fornecer aos clínicos elementos para interromper o uso de antibiótico, limitando a exposição desnecessária à medicação.

A sepse é sempre um quadro grave, que exige uma atenção redobrada ao paciente. Em se tratando de neonatos, a elevada mortalidade dos sépticos leva os médicos neonatologistas a buscarem meios clínicos e/ou laboratoriais que lhes forneçam critérios prognósticos mais imediatos e precisos.



## 2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos específicos estudar dois grupos de recém-nascidos, sépticos e sadios, determinando:

1. Parâmetros hematológicos – hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos (total e diferencial);
2. As subpopulações linfocitárias T e B, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e NK;
3. Correlacionar os resultados obtidos entre os dois Grupos e na evolução da sepse para alta ou para óbito.

O objetivo geral é identificar parâmetros laboratoriais que auxiliem no diagnóstico, evolução e prognóstico da sepse neonatal.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Estudo da População - Casuística

Neste estudo caso-controle, a população analisada é constituída por recém-nascidos a termo (RNs), com sepse, internados no Centro de Tratamento Intensivo Neonatal (CTI) do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) (casos) e RNs saudáveis, nascidos no Centro Obstétrico do Hospital Geral e Maternidade Angeline (HGMA) (controles). Foram incluídos os nascidos de parto normal e abdominal e gravidez única.

A idade gestacional foi determinada através da data da última menstruação e/ou método de Capurro. Na vigência de discrepância, o método de Capurro prevaleceu (CAPURRO et al.,1978).

#### 3.1.1 Casos

Fizeram parte do estudo os pacientes que preencheram os critérios de identificação da sepse adotados pelo Centro de Tratamento Intensivo do HIAS, modificado a partir dos autores Tollner, 1982; Küster et al 1998 e Martius, 1999. Os critérios adotados são:

- **a suspeita clínica subjetiva de sepse** foi definida através da impressão de que o RN “não estava bem”, quando o mesmo apresentava hipoatividade, hipoperfusão, apnéia, desconforto respiratório; levando à suspeita de um quadro infeccioso (KÜSTER et al,1998).

- **a evidência clínica de sepse** foi objetivamente definida pela presença de, no mínimo, três dos oito critérios do escore de Tollner (1982) modificado, para o qual se incluem os seguintes grupos de sintomas:

1. Apnéia (duração > 20s), taquipnéia (> 60 irpm) ou radiografia do tórax revelando sinais da síndrome do desconforto respiratório;

2. Bradicardia (mais de cinco episódios /24h) ou taquicardia persistente (mais de 170 bpm);
3. Enchimento capilar lento (> de 3s) ou evidência clínica de má perfusão tissular
4. Hipotensão, com requerimento de reposição de volume ou terapia com drogas vasoativas.
5. Distensão abdominal;
6. Sinais neurológicos de irritabilidade ou letargia;
7. Hepatomegalia;
8. Instabilidade térmica (mais do que três temperaturas diferentes com variação superior a 0,5° C em 24 horas).

A data do diagnóstico clínico de sepse (D0) foi definida como aquele em que a suspeita clínica subjetiva foi levantada, ou o dia em que a evidência clínica objetiva de sepse foi primeiramente registrada.

Os parâmetros laboratoriais que indicam infecção no RN incluem:

- PCR  $\geq$  6mg/L
- Neutropenia ( contagem absoluta de neutrófilos  $<$ 1.500/uL) (MANROE et al., 1979)
- Relação entre neutrófilos imaturos e total de neutrófilos  $\geq$  0,2, nas primeiras 72 horas do nascimento (MANROE et al 1979).

Os RN com diagnóstico clínico de sepse internados no HIAS foram monitorados de acordo com critérios estabelecidos dentro de um protocolo de acompanhamento por nós elaborado (ANEXO.1), à partir do protocolo do Hospital, ampliado segundo os critérios de Tollner (1982). Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos diariamente no período de 1 a 10 dias após a admissão na CTI.

### **3.1.2 Controles**

Os controles foram recém-nascidos de mães com gravidez e parto sem complicações, na ausência de fatores obstétricos de risco e na ausência do uso

materno de antibiótico no período pré e intraparto. Os RN, considerados saudáveis, foram avaliados com relação ao peso ao nascer (2.550 a 3860g), a idade gestacional (37 a 40 semanas) e a nota do Apgar no 5º minuto de vida (8 a 10).

Foram considerados fatores obstétricos de risco (MARTIUS, 1999):

1. Febre materna intraparto - definida como uma temperatura axilar  $>38^{\circ}\text{C}$  na ocasião do nascimento ou nos últimos 3 dias pré ou pós parto.
2. Rotura prematura de membranas amnióticas (amniorrexe prematura) - definida como a rotura espontânea das membranas ovulares antes do início do trabalho de parto (contrações uterinas, colo uterino semi-apagado, formação da bolsa das águas e perda do tampão mucoso)
3. Corioamnionite clínica e/ou laboratorial - definida por um ou mais dos seguintes achados: febre materna (temperatura axilar  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ), taquicardia materna ou fetal ( $> 160$  bpm), hipertonia uterina, líquido amniótico purulento ou com odor fétido, leucócitos maternos  $> 15.000/\mu\text{L}$ , aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS) e da proteína C-reativa (PCR).
4. Parto pré-termo – é a interrupção da gravidez antes de 37 semanas completas (259 dias) (OMS-FIGO,1976).

Baseado nos critérios acima definidos, os pacientes foram, prospectivamente, classificados em **3 grupos**:

**1º Grupo:** RNs com sepse comprovada:

- **Hemocultura Positiva**

Evidência clínica objetiva de sepse, na presença de três ou mais critérios anteriormente definidos, somando-se a dois ou mais parâmetros laboratoriais indicativos de infecção.

**2º Grupo:** RNs com provável sepse

- **Hemocultura negativa**

- Três ou mais dos oitos sintomas de evidência clínica objetiva de sepse
- Dois ou mais parâmetros laboratoriais indicativos de infecção.

### **3º Grupo: RNs controle**

- Ausência de evidência clínica objetiva/subjetiva de sepse
- Ausência de parâmetros laboratoriais indicativos de infecção.

## **3.2 Análise Laboratorial**

As amostras de sangue foram obtidas por ocasião da coleta para o diagnóstico e acompanhamento da sepse, após consentimento informado das mães no centro obstétrico e CTI neonatal.

### ***Coleta de sangue em sala de parto dos RNs controles:***

As amostras de sangue dos RNs, na sala de parto, foram obtidas do cordão umbilical (5ml), distribuídas em frascos com anticoagulante EDTA, e encaminhado ao laboratório para realização do hemograma completo e imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias. A amostra para a realização da imunofenotipagem foi mantida à temperatura ambiente, processada e analisada dentro de 12 horas.

### ***Coleta de Sangue dos RNs com sepse no CTI:***

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa periférica, distribuídas em frascos com EDTA e encaminhadas ao laboratório para a realização do hemograma completo, PCR, hemocultura e imunofenotipagem. A amostra para a realização da imunofenotipagem foi mantida à temperatura ambiente, processada e analisada dentro de 12 horas.

#### **➤ Hemograma**

O hemograma foi realizado em contador automático (Cell Dyn 1700 - ABBOTT) e a contagem diferencial de leucócitos manualmente, em lâminas coradas pelo May-Grunwald-Giemsa e incluiu a morfologia dos granulócitos e a presença de alterações tóxico-degenerativas nos neutrófilos: caracterizadas pela presença de granulações tóxicas, corpúsculos de Döle e vacúolos no citoplasma dos neutrófilos.

### ➤ PCR

A determinação da PCR foi realizada em amostra de soro (1ml), usando-se partículas de látex revestidos com anticorpos monoclonais anti-PCR por aglutinação direta (Kit imuno-latex PCR). A presença de aglutinação tênue ou nítida indica resultado positivo e concentração  $\geq 6\text{mg/L}$ . A ausência de aglutinação implica em resultado negativo e concentração  $< 6\text{mg/L}$ .

### ➤ Hemocultura

A hemocultura foi realizada nos RNs com suspeita clínica ou evidência de sepse, por ocasião da admissão. Não foram realizadas punção lombar, urinocultura ou cultura de ponta de cateter, por não ser procedimento de rotina da unidade. As amostras de sangue para hemocultura foram coletadas antes do início da terapia antimicrobiana, mediante anti-sepsia rigorosa do local de punção, com álcool 70% e Polvidine®. Para a realização da hemocultura foi utilizado o meio Bactec Pedas Plus F®, que detecta o CO<sub>2</sub> produzido pelo metabolismo bacteriano através de fluorescência (KURLAT; STOLL; McGOWAN, 1989). A amostra de sangue coletada no frasco Bactec® pediátrico permaneceu em estufa a 37°C por cinco dias. Após este prazo, foram realizados os subcultivos em placa ágar-sangue e ágar-chocolate, com leitura após 24 horas (ALMON; PEZZLO, 1992).

### ➤ Imunofenotipagem

A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo (Fluorescence-Activated Cell Sorter – FACS), utilizando sangue total e anticorpos monoclonais (Cyto-Stat/Coulter Clone) para identificar as subpopulações de linfócitos: linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), linfócitos T (CD3<sup>+</sup>), linfócitos T helper (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>), linfócitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) e células *natural killer* – NK (CD56<sup>+</sup>).

## **Etapas**

1. Coleta de sangue em EDTA.

2. Em tubos colocar 100uL de sangue total e 10uL de anticorpos monoclonais, anti- CD3 (LT), anti-CD19 (LB), marcados respectivamente com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE). Procede-se do mesmo modo para a determinação dos linfócitos  $T_{aux}$  ( $CD4^+$ ) e linfócitos  $T_{citotóxico}$  ( $CD8^+$ ), usando-se anticorpos monoclonais anti- $CD4^+$  e anti- $CD8^+$  marcados respectivamente com FITC e PE. Para as células NK ( $CD56^+$ ) usa-se o anticorpo monoclonal anti- $CD56^+$  marcado com PE.

3. Incubar por 2 horas à temperatura ambiente e protegido da luz.

4. Colocar o tubo no sistema ImunoPrep onde os eritrócitos serão lisados pelo ácido fórmico. O pH será reajustado com um tampão de fosfato e o material conservado com paraformaldeído.

5. Colocar o tubo com o material no citômetro para análise.

6. A análise é realizada em 4 gráficos.

- 1º gráfico: representa os eixos de tamanho e granulosidade que nos possibilitam identificar e selecionar as população de linfócitos.
- 2º gráfico: representa os eixos de fluorescência verde (FITC) e fluorescência vermelha (PE).
- 3º gráfico: demonstra a quantidade de células com fluorescência verde (FITC).
- 4º gráfico: demonstra a quantidade de células com fluorescência vermelha (PE).

7. A **contagem relativa** de cada subgrupo de linfócitos foi expressa em percentagem da população total de linfócitos. Uma vez obtidas as percentagens de cada célula, para obtermos a concentração de células por uL aplicamos a seguinte formula: Contagem absoluta = contagem total de leucócitos (células/uL) x % de linfócitos x % células com coloração positiva.

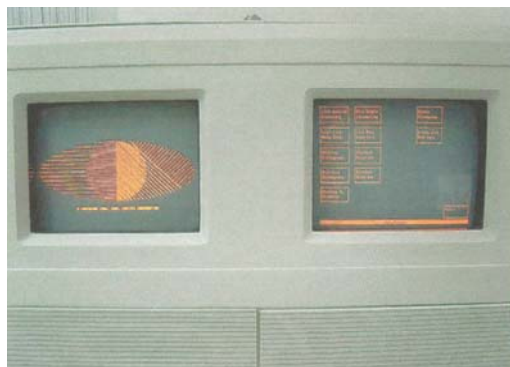
Tubo controle - Para definirmos os limites de positividade, 10  $\mu$ L de anticorpos marcados das mesmas classes dos anticorpos para linfócitos (IgG1 e IgG2) e sem especificidade são colocados no tubo controle.



**Figura 1:** Citômetro de fluxo



**Figura 2:** Citômetro de fluxo – detalhes 1



**Figura 3:** Citômetro de fluxo – Unidade de Análises



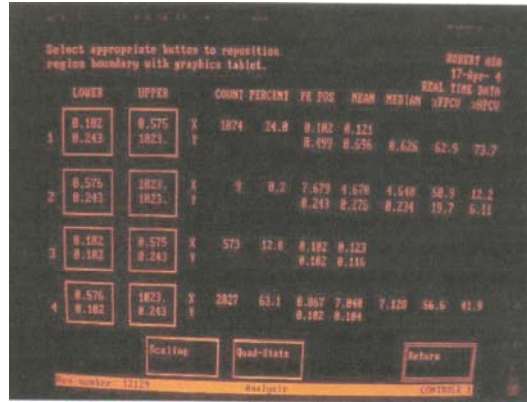


Figura 4: Subpopulações linfocitárias – valores (%)

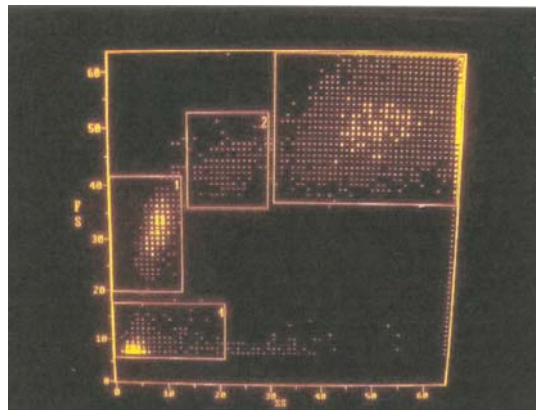


Figura 5: Populações celulares – FS x SS

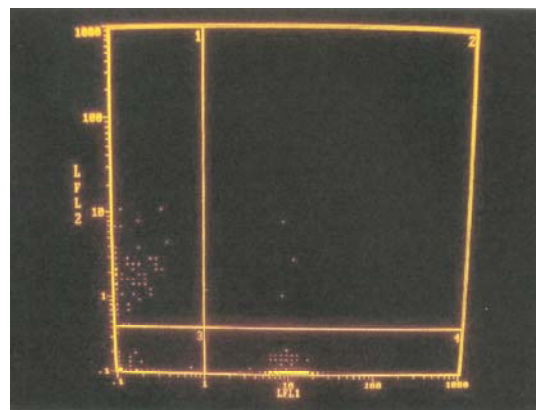
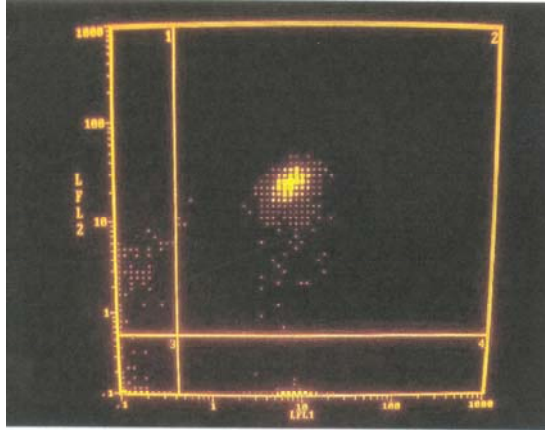
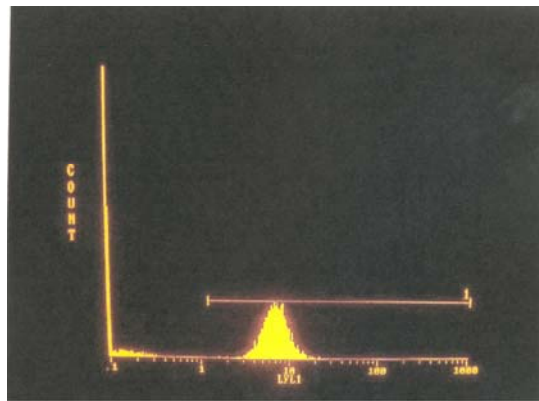


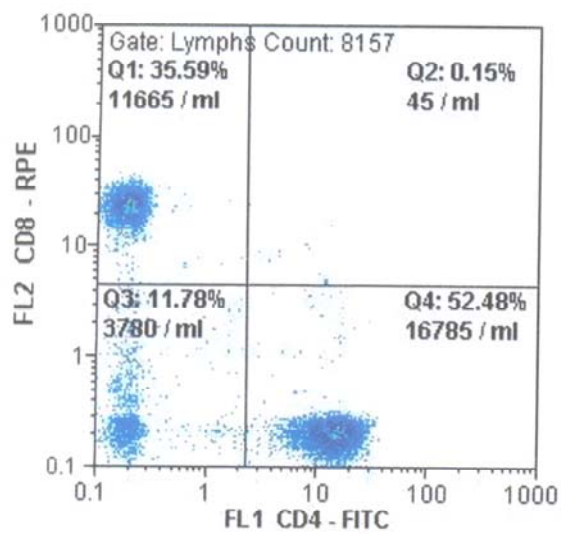
Figura 6: LT (FITC) x LB (PE) – LFL1 x LFL2



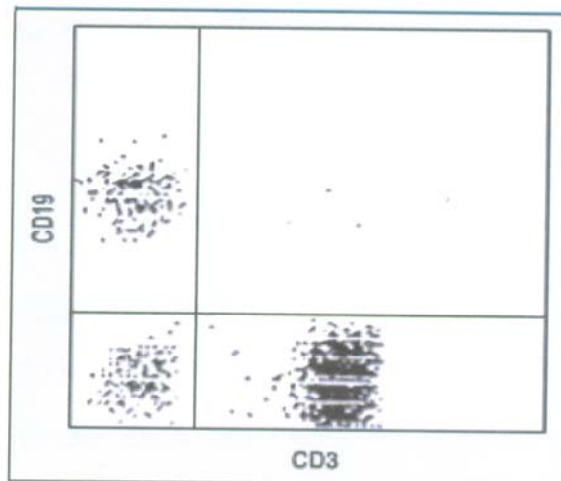
**Figura 7:** Subpopulações de LT – CD3 (FITC) x CD4 (PE)



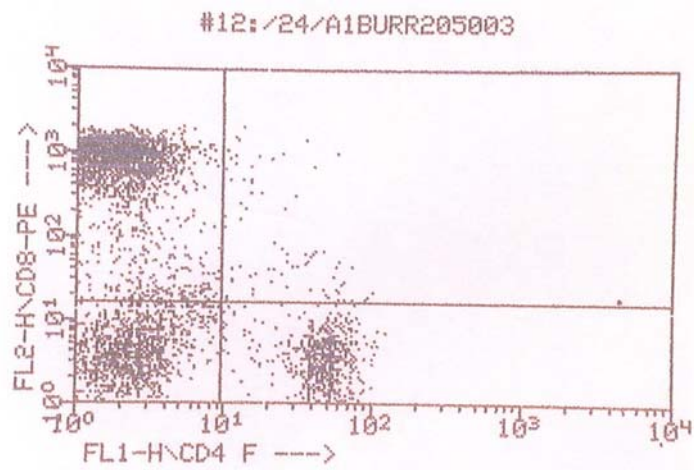
**Figura 8:** Percentagem de LT – CD3 (FITC )



**Figura 9:** CD4 / CD8



**Figura 10: LT / LB**



**Figura 11: Linfócitos T e B**

### 3.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média, e desvio padrão. Foram empregados os testes t de Student na comparação da igualdade das médias e de qui-quadrado; ao nível de significância mínima de  $p < 0,05$ .

### **3.4 Considerações Éticas**

Para coleta do material na Maternidade Angeline, foi obtida permissão da Direção Científica do Hospital e consentimento informado das mães dos neonatos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital Albert Sabin, na forma da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEPE), por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo seres humanos (Res.196/96 – Conselho Nacional de Saúde).

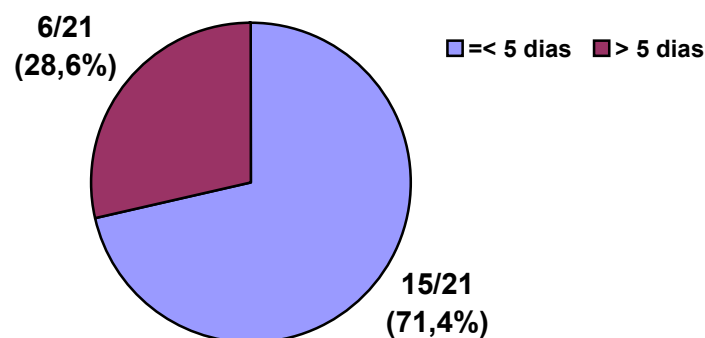
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Recém-Nascidos Sépticos e Controles

Foram examinados 21 recém-nascidos (CASOS) admitidos no Centro de Tratamento Intensivo (CTI) do Hospital Infantil Albert Sabin, procedentes da capital e do interior do estado, e 10 recém-nascidos (CONTROLES) da sala de parto do Hospital Geral e Maternidade Angeline, em Fortaleza. As distribuições dos 31 recém-nascidos, pela idade e pelo sexo; estão apresentadas nas tabelas 1 e 2; gráficos 1 e 2.

**Tabela 1:** Distribuição dos recém-nascidos (casos e controles) de acordo com a idade

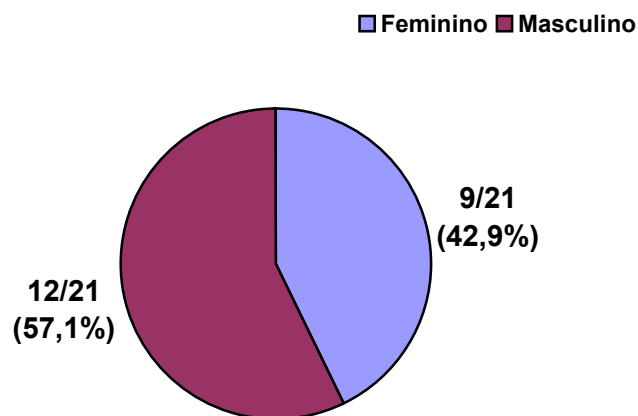
IDADE (DIAS)	CASOS	CONTROLES
0	8	10
1 a 10	8	-
11 a 20	5	-
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>10</b>



**Gráfico 1:** Distribuição percentual dos RNs sépticos de acordo com a idade (N = 21)

**Tabela 2:** Distribuição dos recém-nascidos (casos e controles) de acordo com o sexo

SEXO	CASOS	CONTROLES
	N	N
Masculino	9	5
Feminino	12	5
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>10</b>



**Gráfico 2:** Distribuição percentual dos RNs sépticos, de acordo com o sexo (N = 21)

Nos hospitais de origem, os 31 recém-nascidos incluídos no estudo foram classificados, de acordo com o protocolo clínico, em 3 categorias

1. Recém-nascidos com sepse comprovada – 7 pacientes;
2. Recém-nascidos com provável sepse - 14 pacientes;
3. Recém-nascidos sem sepse – 10

Para fins do presente estudo, os recém-nascidos com sepse comprovada e os com provável quadro de sepse foram conjuntamente constituídos no GRUPO SEPSE (total de 21). Os recém-nascidos sem evidência clínica objetiva e/ou subjetiva de sepse compuseram o GRUPO CONTROLE (total de 10).

## 4.2 Parâmetros Hematológicos

### 4.2.1 Série Vermelha e Plaquetas

O estudo da série vermelha nos **casos de sepse** mostrou que a contagem das hemácias variou de  $2,9 \times 10^6$  a  $6,0 \times 10^6/\mu\text{L}$  (média  $\pm$  DP de  $4,35 \pm 0,82 \times 10^6/\mu\text{L}$ ); os valores do hematócrito de 28 a 63% ( $42,64 \pm 9,16\%$ ) e a dosagem de hemoglobina de 9,5 a 20,1 g/dl ( $13,93 \pm 3,06$  g/dl). No **grupo controle**, os valores das hemácias se situaram entre  $3,6 \times 10^6$  a  $5,2 \times 10^6/\mu\text{L}$  ( $4,39 \pm 0,55 \times 10^6/\mu\text{L}$ ); os valores do hematócrito de 37 a 52% ( $45,13 \pm 5,60 \%$ ) e a dosagem de hemoglobina entre 11,30 a 17,40 g/dl ( $13,89 \pm 1,96$  g/dl) Não houve diferença estatística significativa entre os valores dos grupos sepse e controle (tabela 3).

A contagem de plaquetas variou de 23.000 a 599.000/ $\mu\text{L}$  ( $242.800 \pm 157.030/\mu\text{L}$ ) nos **casos**, e de 55.000 a 355.000/ $\mu\text{L}$  ( $220.040 \pm 91.690/\mu\text{L}$ ) nos **controles** sem diferença estatística significativa entre esses valores (tabela 3).

**Tabela 3:** Distribuição dos valores da série vermelha e plaquetas (casos e controles)

PARÂMETROS	RECÉM NASCIDOS		<i>p</i>
	Casos (n=21) Média $\pm$ DP	Controles (n=10) Média $\pm$ DP	
Hemácias [ $\times 10^6/\mu\text{L}$ ]	4,35 $\pm$ 0,82	4,39 $\pm$ 0,55	0,8947
Hematócrito [%]	42,64 $\pm$ 9,16	45,13 $\pm$ 5,60	0,4374
Hemoglobina [g/dl]	13,93 $\pm$ 3,06	13,89 $\pm$ 1,96	0,9678
Plaquetas [ $\times 10^3/\mu\text{L}$ ]	242,8 $\pm$ 157,03	220,04 $\pm$ 91,69	0,8162

\* Nível de significância  $\leq 0,05$

Para avaliação do grupo de neonatos sépticos foram analisados os valores da série vermelha e das plaquetas, nos RNs que evoluíram para óbito e nos que responderam ao tratamento (tabela 4).

**Tabela 4:** Distribuição dos valores da série vermelha e das plaquetas dos pacientes, de acordo com a evolução (óbito e alta)

PARÂMETROS	RECÉM NASCIDOS		p
	Óbito (N=11) Média ± DP	Alta (N=10) Média ± DP	
Hemácias [x10 <sup>6</sup> /uL]	4,41 ± 0,91	4,27 ± 0,75	0,7016
Hematócrito [%]	43,05 ± 9,11	42,19 ± 9,68	0,8353
Hemoglobina [g/dl]	13,92 ± 3,13	13,95 ± 3,16	0,9818
Plaquetas [uL]	201.500 ± 150.800	288.300 ± 158.500	0,2050

Teste qui-quadrado (X<sup>2</sup>): p ≤ 0,05

Os valores hematimétricos dos grupos **ALTA** e **ÓBITO**, estão apresentados na tabela 4. O **número de hemácias** das crianças do **grupo que respondeu ao tratamento** variou entre 3,0 a 6,0 x 10<sup>6</sup>/uL, com uma média de 4,27 ± 0,75 x 10<sup>6</sup>/uL. No grupo que **não respondeu ao tratamento**, os valores estavam entre 2,9 a 5,8 x 10<sup>6</sup>/uL, com valor médio de 4,41 ± 0,91 x 10<sup>6</sup>/uL. O **valor do hematócrito** no **primeiro grupo** variou de 29,1% a 63,1%, com média de 42,19 ± 9,68 %; enquanto no **segundo grupo** esses valores se situaram entre 28,5 a 55,9% (43,05 ± 9,11%). Pacientes que **receberam alta** apresentaram valores de **hemoglobina** de 9,70 a 20,10g/dl (média de 13, 95 ± 3,16g%), enquanto nos pacientes que **foram a óbito** os a variação desses valores foi de 9,5 a 17,9g/dl (13,92 ± 3,13g/dl). Em nenhuma desses parâmetros ocorreu diferença estatística significativa entre os dois grupos.

No **grupo de alta**, a contagem de **plaquetas** variou de 80.000 a 531.000/uL, com uma média de 288.300 ± 158.500/uL. Nos recém-nascidos que **foram a óbito**, esse parâmetro variou de 23.000 a 599.000/uL, com uma média de 201.500 ± 150.800/uL (tabela 4).



## 4.2.2 Série Branca

### ↳ Leucócitos Totais e Neutrófilos

O estudo da série branca mostrou que os **leucócitos** variaram de 5.600 a 35.100/uL ( $18.080 \pm 9.210/uL$ ) nos **casos** e de 4.200 a 17.400/uL ( $12.040 \pm 3.980/uL$ ) no **grupo controle**, com diferença significativa entre as médias ( $p=0,016$ ).

A contagem dos **neutrófilos totais das crianças com sepse** variou de 2.232 (25% dos leucócitos) a 23.680/mm<sup>3</sup>, com a média de  $10.620/uL \pm 6.449$ . Nos **controles**, a faixa de variação dos neutrófilos foi de 1.848 a 9.017/uL, com a média de  $6.275 \pm 2.299/uL$ . Classificados microscopicamente como imaturos (bastão) e maduros (segmentados), os neutrófilos imaturos **na sepse** variaram de 60 a 2.912/uL ( $883 \pm 643/uL$ ), o que correspondia de 1 a 14% dos neutrófilos da corrente sanguínea, e os neutrófilos segmentados (maduros) mostraram uma variação de 2.160 a 22.659/uL ( $9.737 \pm 5.937/uL$ ), correspondendo de 23 a 83% dos neutrófilos circulantes. No **grupo controle**, a contagem dos neutrófilos imaturos foi de 0 a 1.160/uL ( $320 \pm 338/uL$ ), o que responde por 0 a 8% dos neutrófilos circulantes. Os neutrófilos segmentados variaram de 1.554 a 8.509/uL ( $5.995 \pm 2.133/uL$ ) - 30 a 67% dos neutrófilos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das contagens de neutrófilos ( $p= 0,159$ ). (Tabela 5).

O **índice neutrofilico** - Razão dos neutrófilos imaturos sobre os segmentados, (tabela 5) nos **casos** os valores foram de 0,01 a 0,12 com média de  $0,05 \pm 0,03$  e nos controles essa variação foi de 0,0 a 0,16 com média de  $0,05 \pm 0,05$ . A diferença nos valores médios do índice neutrofilico não foi estatisticamente significativa ( $p= 0,983$ ).

**Tabela 5:** Distribuição diferencial dos neutrófilos e índice neutrofílico (casos e controles)

PARÂMETROS	GRUPO DE ESTUDO		p
	Casos (n = 21) Média ± DP	Controles (n = 10) Média ± DP	
Leucócitos (uL)	18.080 ± 9.210	12.040 ± 3.980	0,016*
Neutrófilo total (uL)	10.620 ± 6.449	6.275 ± 2.299	0,017*
Neutrófilo total (%)	58,71 ± 17,57	52,50 ± 11,07	0,316
Neutrófilos imaturo (uL)	883 ± 643	320 ± 338	0,135
Neutrófilo imaturo (%)	4,48 ± 3,74	2,9 ± 27	0,201
Neutrófilo segmentado (uL)	9.737 ± 5.937	5.955 ± 2.133	0,159
Neutrófilo segmentado (%)	54,24 ± 16,62	49,60 ± 10,47	0,427
Índice neutrofílico	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,05	0,983

Teste qui-quadrado ( $X^2$ ):  $p \leq 0,05$

\* Diferença significativa

### ↳ Linfócitos Totais e Subpopulações

Esses valores também encontram-se apresentados na tabela 6.

A contagem absoluta de linfócitos, nos **casos** apresentou uma variação de 900 a 19.072/uL ( $6.230 \pm 5.020$ /uL), os quais correspondem de 8% a 70% dos leucócitos circulantes; enquanto nos **controles** os linfócitos variaram de 2.100 a 10.962/uL ( $5.000 \pm 2.500$ /uL), representando 26% a 63%, sem diferença significativa nos valores médios dos dois grupos.

A análise imunofenotípica das subpopulações de linfócitos nas **crianças sépticas** mostrou que a contagem de linfócitos T ( $CD3^+$ ) variou de 527 a 14.973/uL, representando 45,7% a 97,8% dos linfócitos sanguíneos, com o valor médio de  $4.870 \pm 3.780$  /uL. No **grupo controle** a contagem linfocitária T variou de 1.478 (51,90%) a 7.805/uL (91,80%), com a média de  $3.560 \pm 1.860$ /uL.

A contagem de linfócitos B, nos **casos**, variou de 13 (0,7%) a 7.400/uL (38,8%), em valores absolutos e percentuais de linfócitos circulantes, com media de

1.000  $\pm$  1.630/uL, (13,70%). Nos **controles** esses valores foram de 0 a 1.594/uL (24,3%), com média de 700  $\pm$  580/uL.

As diferenças nos valores médios dos linfócitos T e dos linfócitos B dos recém-nascidos sépticos e controles não foram significantes.

Os linfócitos T helper (Th ou LT CD4<sup>+</sup>) nos **casos**, variaram de 344 a 10.608/uL, dos linfócitos T circulantes, com média de 3.470  $\pm$  2.760/uL (58,4%). No **grupo controle** a variação foi de 0 a 4.911/uL (65,2%), com a média de 1.670  $\pm$  1.640/uL (50,7%). A diferença entre os valores médios dos dois grupos mostrou tendência à significância ( $p=0,0518$ ).

Os linfócitos T citotóxico (LTc ou LT CD8<sup>+</sup>) das **crianças sépticas** variaram de 0 a 3.519/uL (32,1%), com o valor médio de 1.310  $\pm$  1.070 (22,6%). O **grupo controle** apresentou uma variação de 186 (12,7%) a 4.291/uL (47,1%), com média de 830  $\pm$  1.060 (22,0%) ( $p = 0,0830$ ).

A relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> nos **recém-nascidos sépticos** variou de 1,01 a 5,45, com o valor médio de 2,88  $\pm$  1,33. Nos **controles** essa relação se situou entre 1,27 a 3,86, com o valor médio de 2,42  $\pm$  0,88. A diferença nos valores médios da relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dos dois grupos não foi estatisticamente significativa ( $p=0,4008$ ).

A contagem das células NK nas **crianças sépticas** variou de 10 a 290/uL (0,2 a 2,7% dos linfócitos circulantes) com média de 80  $\pm$  80/uL (1,2%). Nos **controles**, essas células mostraram uma distribuição de 50 (1,9%) a 690/uL (11,6%), com média de 250  $\pm$  220/uL (4,5%). A diferença nos valores médios das células NK dos grupos séptico e controle foi estatisticamente significativa ( **$p = 0,0041$**  para valores absolutos e  **$p = 0,0001$**  para valores relativos).

**Tabela 6:** Distribuição dos leucócitos totais, linfócitos totais e subpopulações (casos e controles)

PARÂMETROS	GRUPO DE ESTUDO		p
	Casos (n = 21)	Controles (n = 10)	
	Média ± DP	Média ± DP	
Leucócitos (uL)	<b>18.080 ± 9.210</b>	<b>12.040 ± 3.980</b>	<b>0,016*</b>
Linfócitos totais (uL)	6.230 ± 5.020	5.000 ± 2.500	0,9663
Linfócitos totais (%)	34,57 ± 17,32	41,30 ± 10,36	0,1897
Linfócitos T [CD3 <sup>+</sup> ] (uL)	4.870 ± 3.780	3.560 ± 1.860	0,5262
Linfócitos T [CD3 <sup>+</sup> ] (%)	78,88 ± 14,17	71,45 ± 13,14	0,1736
Linfócitos B [CD19 <sup>+</sup> ] (uL)	1.000 ± 1.630	700 ± 580	0,9663
Linfócitos B [CD19 <sup>+</sup> ] (%)	13,70 ± 10,44	14,29 ± 7,36	0,8795
Linfócitos Helper [CD4 <sup>+</sup> ] (uL)	3.470 ± 2.760	1.670 ± 1.640	0,0518
Linfócitos Helper [CD4 <sup>+</sup> ] (%)	55,84 ± 13,00	50,70 ± 11,58	0,3617
Linfócitos Citotóxicos [CD8 <sup>+</sup> ] (uL)	1.310 ± 1.070	830 ± 1.060	0,0830
Linfócitos Citotóxicos [CD8 <sup>+</sup> ] (%)	22,05 ± 8,10	22,61 ± 6,52	0,6142
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	2,88 ± 1,33	2,42 ± 0,88	0,4008
NNatural Killer [CD56 <sup>+</sup> ] (uL)	<b>80 ± 80</b>	<b>250 ± 220</b>	<b>0,0041*</b>
Natural Killer [CD56 <sup>+</sup> ] (%)	<b>1,20 ± 0,79</b>	<b>4,46 ± 2,78</b>	<b>0,0001*</b>

Teste qui-quadrado ( $X^2$ ):  $p \leq 0,05$

\* Diferença significativa

Os valores dos leucócitos no grupo que **respondeu ao tratamento** se distribuíram entre 6.000 a 29.600/uL, com a média e DP de  $14.880 \pm 7.290$ /uL. No grupo que **foi a óbito** esses valores variaram de 5.600 a 35.100/uL ( $20.980 \pm 10.120$ /uL). A diferença entre as médias dos dois grupos não foi significativa ( $p = 0,13$ ).

Os **valores dos neutrófilos totais** nos recém-nascidos que **responderam ao tratamento** se situaram entre 2.232 a 23.680/uL (25 a 83% dos leucócitos circulantes), com média de  $8.680 \pm 6.379$ /uL (57% dos leucócitos) e nas crianças que **foram a óbito** a variação dos neutrófilos totais foi de 2.520 a 23.478/uL (33 a 86% dos leucócitos), com o valor médio de  $12.384 \pm 6.275$ /uL (60% dos leucócitos circulantes).

Com relação aos valores dos **neutrófilos imaturos** do grupo que **recebeu alta**, foi observada uma variação de 60 a 2.912/uL (1 a 14% dos neutrófilos totais), com uma média de  $888 \pm 1.098$ /uL ( $4,6\% \pm 4,4\%$ ), enquanto que **no grupo dos óbitos** os valores foram de 152 a 2.160/uL (2 a 12%), com a média de  $879 \pm 643$ /uL ( $4,3 \pm 3,1\%$ ). Os **neutrófilos segmentados dos pacientes de alta** variaram de 2.160 a 21.016/uL (23 a 82% dos neutrófilos circulantes), com uma média de  $7.792 \pm 5.425$ /uL (52,70% dos neutrófilos). Nos que **foram a óbito**, os valores foram de 2.352 a 22.659/uL (30 a 83% dos neutrófilos), com uma média de  $11.504 \pm 6.065$ /uL (55,6% dos neutrófilos). A comparação dos resultados dos leucócitos totais e neutrófilos entre os dois grupos (alta/óbito) não mostrou diferença estatisticamente significativa (tabela 7).

**Tabela 7:** Distribuição diferencial dos neutrófilos e índice neutrofilico dos pacientes de acordo com a evolução (óbito e alta)

PARÂMETROS	GRUPO DE ESTUDO		p
	Alta (n=10) Média ± DP	Óbito (n=11) Média ± DP	
Leucócitos (uL)	14.880 ± 7.290	20.980 ± 10.120	0,1329
Neutrófilo total (uL)	8.680 ± 6.379	12.384 ± 6.275	0,1960
Neutrófilo total (%)	57,3 ± 21,1	60,0 ± 14,5	0,7348
Neutrófilos imaturo (uL)	888 ± 1.098	879 ± 643	0,2908
Neutrófilo imaturo (%)	4,6 ± 4,4	4,3 ± 3,1	0,4102
Neutrófilo segmentado (uL)	7.792 ± 5.425	11.505 ± 6.065	0,174
Neutrófilo segmentado (%)	52,70 ± 19,6	55,6 ± 14,1	0,6967
Índice neutrofilico	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,04	0,7564

Teste qui-quadrado ( $X^2$ ):  $p \leq 0,05$

As comparações, quanto ao sexo ou faixa etária, das **crianças sépticas que responderam ao tratamento (ALTA)** e aquelas que **não responderam ao tratamento e evoluíram para óbito (ÓBITO)** não foram estatisticamente significante.

## ↳ Linfócitos nos RNs Sépticos

Os valores absolutos e percentuais dos **linfócitos totais** no grupo que **respondeu ao tratamento** mostraram variação de 900 a 13.090/uL (12 a 70% dos leucócitos totais), com uma média de  $5.070 \pm 3.550$ /uL (35%); enquanto no grupo que **não respondeu ao tratamento** a variação foi de 1.900 a 19.072/uL (8 a 64% dos leucócitos circulantes), com uma média de  $7.290 \pm 6.040$ /uL (33,64%).

Os **linfócitos T** das crianças que **responderam ao tratamento** variaram de 527 a 9.765/uL (58,50 a 74,60% dos linfócitos totais), com uma média de  $4.090 \pm 2.610$ /uL (81,13%). No grupo **sem resposta ao tratamento**, esses valores se situaram entre 868 e 14.973/uL (45,70 a 96,40% dos linfócitos totais), com uma média de  $5.590 \pm 4.620$ /uL (76,83%), sendo a diferença nos valores médios dos dois grupos não significativa ( $p = 0,6727$ ).

Os valores do **linfócito T Helper** (LT CD4<sup>+</sup>) das crianças que **receberam alta** apresentaram variação de 344 a 7.383/uL (38 a 56,4% dos linfócitos T), com o valor média de  $3.020 \pm 2.070$ /uL (58%). Nas que **foram a óbito** a variação foi de 570 a 10.608/uL (30 a 65,6%), com valor médio de  $3.890 \pm 3.320$  /uL (53% dos linfócitos T), sendo a diferença entre os valores médio dos dois grupos não significativa ( $p = 0,7782$ ).

Os **linfócitos T citotóxicos** (LT CD8<sup>+</sup>) do grupo que **recebeu alta** tiveram valores de 186 a 2.121/uL (20,7% a 16,2% dos linfócitos T), com média de  $1.010 \pm 619$ /uL (21%); e no grupo **dos óbitos** os valores variaram de 362 a 4.291/uL (12,7 a 22,5% dos linfócitos T totais), com a média de  $1.590 \pm 1.330$ /uL (22%). A diferença entre as médias dos grupos não era significativa ( $p = 0,3981$ ).

A relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> das crianças do **grupo de alta** variou de 1,01 a 5,45, com média de  $3,1 \pm 1,3$  e nos que **foram ao óbito**, essa relação foi de 1,40 a 5,34, com média de  $2,6 \pm 1,3$ . A diferença entre os valores médios não foi significativa ( $p = 0,4548$ ).

A distribuição dos valores de **linfócitos B** das crianças que **responderam ao tratamento** foi de 119 a 2.814/uL (2 a 34,1% dos linfócitos circulantes), com uma média de  $810 \pm 970$ /uL (15,06%); enquanto no grupo que **não respondeu ao**

**tratamento** os valores variaram de 13 a 7.400/uL (0,7 a 38,8% dos linfócitos totais) com uma média de  $1.170 \pm 2.100$ /uL (12,46%). A diferença nos valores médios dos dois grupos não foi significativa ( $p=0,5973$ ).

Os valores dos **linfócitos NK** nas crianças do grupo que **recebeu alta** variaram de 10 a 70/uL (0,70 a 1,9% dos linfócitos circulantes), com uma média de  $32 \pm 20$ /uL (0,73%). Em comparação, as crianças do grupo que **foi a óbito** tiveram valores de 10 a 290/uL (0,20 a 1,5%) com a média de  $120 \pm 89$ /uL (1,63%). Essa diferença foi estatisticamente significativa com  $p = 0,0124$  para valores absolutos e  $p = 0,0057$  para valores relativos (tabela 8).

**Tabela 8:** Distribuição dos leucócitos totais, linfócitos totais e subpopulações dos pacientes de acordo com a evolução (óbito e alta)

PARÂMETROS	GRUPO DE ESTUDO		p
	Óbito (n=11) Média ± DP	Alta (n=10) Média ± DP	
Leucócitos (μL)	20.980 ± 10.120	14.880 ± 7.290	0,1329
Linfócitos totais (μL)	7.290 ± 6.040	5.070 ± 3.550	0,4813
Linfócitos totais (%)	33,6 ± 15,7	35,6 ± 19,7	0,8028
Linfócitos T [ CD3 <sup>+</sup> ] (μL)	5.590 ± 4.620	4.090 ± 2.610	0,6727
Linfócitos T [ CD3 <sup>+</sup> ] (%)	76,8 ± 15,8	81,1 ± 12,5	0,5010
Linfócitos B [ CD19 <sup>+</sup> ] (μL)	1.170 ± 2.100	810 ± 970	0,5973
Linfócitos B [ CD19 <sup>+</sup> ] (%)	12,4 ± 10,5	15,0 ± 10,7	0,5824
Linfócitos Helper [CD4 <sup>+</sup> ] (μL)	3.890 ± 3.320	3.020 ± 2.070	0,7782
Linfócitos Helper [CD4 <sup>+</sup> ] (%)	53,7 ± 14,0	58,1 ± 12,0	0,4584
Linfócitos Citotóxicos [CD8 <sup>+</sup> ] (μL)	1.590 ± 1.330	1.010 ± 619	0,3981
Linfócitos Citotóxicos [CD8 <sup>+</sup> ] (%)	22,2 ± 6,1	21,86 ± 10,18	0,5261
CD4/CD8	2,6 ± 1,3	3,1 ± 1,3	0,4548
Natural Killer [CD56 <sup>+</sup> ] (μL)	<b>120 ± 89</b>	<b>32 ± 20</b>	<b>0,0124*</b>
Natural Killer [CD56 <sup>+</sup> ] (%)	<b>1,63 ± 0,7</b>	<b>0,73 ± 0,51</b>	<b>0,0057*</b>

Teste qui-quadrado ( $X^2$ ):  $p \leq 0,05$

\* Diferença significativa

### 4.3 PCR

A análise dos valores da PCR nos RNs sépticos mostrou que neonatos que **foram a óbito** apresentaram valores geralmente superiores aos que responderam ao tratamento. Os valores de PCR dos RNs do primeiro grupo se situaram entre 12 e 96 mg/L (valor médio:  $38,0 \pm 30,7$ mg/L), e os valores do segundo grupo variaram entre 6 a 24 mg/L (valor médio:  $13,00 \pm 8,8$  mg/L), com diferença estatisticamente significante  $p = 0,041$  (tabela 9).

**Tabela 9: Distribuição dos valores de PCR em RNs sépticos de acordo com a evolução**

RN		PCR (mg/L)	
SÉPTICOS	N	Média $\pm$ DP	Varição
Alta	6	$13,0 \pm 8,8$	6,0 – 24,0
Óbito	6	$38,0 \pm 30,7$	12,0 – 96,0

**P <0,041**

Nos RN que desenvolveram sepse por germe Gram-negativo (85,7%) a *Klebsiella pneumoniae* foi o agente identificado nas hemoculturas de 4 pacientes, sendo isolado também *E. coli* e *Corynebacterium*. O germe Gram-positivo isolado foi o *S. aureus*.

No grupo de RNs cuja hemocultura foi positiva (7 pacientes - 71,4%) 5 (cinco) foram a óbito, enquanto que no grupo de RN cuja hemocultura foi negativa (14 pacientes) esse percentual foi de 42,8% (6 pacientes). Essa diferença, no entanto, não alcançou significância estatística.



## 5 DISCUSSÃO

A sepse neonatal é um problema grave e de grande importância na neonatologia clínica. Nos países desenvolvidos, a incidência de sepse neonatal bacteriana é de 1 a 10 casos por 1.000 nascidos vivos (SIEGEL; McCracken, 1981; PLACZEK; WHITELAW, 1983; ST. GEME; POLIN, 1988; KLEIN; MARCY, 1990).

No Brasil os estudos sobre sepse neonatal são escassos. Em São Paulo, Sègre (1983), relatou a ocorrência de sepse em 36% das autópsias realizadas em recém-nascidos no ano de 1982, no Serviço de Neonatologia do Hospital de Servidor Público Estadual. Sidrim (1999), estudando recém-natos na Unidade de Terapia Intensiva da Maternidade Escola Assis Chateaubriand em Fortaleza-Ceará, referiu 37 (36,7%) pacientes com sepse entre os 455 admitidos na UTI no período de seis meses.

O reconhecimento de fatores prognósticos no manejo diário com RN sépticos é de extrema importância para os neonatologistas intensivistas, considerando a alta morbi-mortalidade nesse grupo.

No presente trabalho, no grupo de 21 crianças estudadas com sepse não foi demonstrada associação do quadro com **a idade e o sexo** do RN (**tabela 1**) (**tabela 2**), concordando com os achados de Stoll (1996).

No hemograma a análise da **série vermelha** não mostrou diferença de valores entre os dois grupos (casos e controles – hemácias – 4,35 e 4,39 x 10<sup>6</sup> /uL, hematócrito – 42,64 e 45,13% e hemoglobina – 13,93 e 13,89 g/dl respectivamente) (**tabela 3**). Portanto, a anemia não esteve presente, como fator agravante, nos casos em estudo. Os valores encontrados, em ambos os grupos, são semelhantes aos relatados por Teixeira (1987), em 50 RNs normais da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (hemácias – 4,7 x 10<sup>6</sup> /uL, hemoglobina – 14,0g/dl e hematócrito – 46%) e estão discretamente abaixo dos encontrados por Perkins (1993), para essa faixa etária (hemácias – 5,0 x 10<sup>6</sup> /uL, hemoglobina – 16,5g/dl e hematócrito – 51%). Segundo Oski e Naiman (1984), os valores hematológicos dos RNs, principalmente os relativos à série vermelha, são suscetíveis a variações dependentes do local da colheita do sangue, tratamento dos vasos umbilicais no momento do parto, tipo de

parto, idade gestacional e possíveis transfusões feto-maternas, materno-fetais e feto-fetais Esses valores também têm relação com as condições socio-econômicas e de altitude (MEJIA-DOMINGUEZ et al, 1985). Essas considerações podem justificar as diferenças nos valores da série vermelha encontradas na presente pesquisa, em comparação com os valores de Perkins (1993).

A **avaliação quantitativa das plaquetas** é considerada de grande importância em pacientes com sepse, sendo a trombocitopenia um achado hematológico precoce no RN séptico (CORRIGAN, 1974; ZIPURSKY et al. 1976; SQUIRE et al. 1979; SOLA; VECCHIO; RIMSZA, 2000). Zipursky et al. (1976) encontraram trombocitopenia em todos os seus pacientes com sepse comprovada, alguns deles atingindo cifras de 30.000/uL . Para Sola, Vecchio e Rimsza (2000) deve-se atentar para o valor numérico considerado para definir a trombocitopenia: se o limite é <100.000/uL a frequência desse achado é de 55 a 65% dos casos, porém se a contagem de plaquetas é <150.000/uL a alteração é vista em 80% dos neonatos.

Nos dois grupos aqui analisados, casos e controles, a contagem média das plaquetas se apresentou na faixa de normalidade (242.800/uL e 220.400/uL respectivamente) (**tabela 3**), com valores um pouco superiores aos encontrados no nosso meio por Teixeira (1987). Foi observada discreta diminuição nos RNs que foram a óbito (201.540/uL), mas sem expressão clínica. Quando analisamos os resultados das contagens de plaquetas, por paciente, registramos um dos RNs controle com 55.000/uL, um paciente do grupo séptico que respondeu ao tratamento com 80.000 plaquetas /uL e dois pacientes que foram a óbito com valores de 23.000 e 89.000/uL.

Para alguns autores, a evidência de diferentes graus de coagulação intravascular disseminada (CIVD) na sepse neonatal pode ser co-responsável pela trombocitopenia (CORRIGAN, 1974; ZIPURSKY et al. (1976), mas nesses casos a contagem das plaquetas é comumente menos de 20.000/uL (LOKESHWAR et al., 2001). Lokeshwar et al (2001), entre vários mecanismos para explicar a trombocitopenia no neonato séptico, consideram que o aumento do nível de trombopoetina (> 1000 pg/ml), em alguns desses pacientes, pode diminuir a massa de megacariócitos na medula, enquanto Tollner (1982) sugere que a trombocitopenia pode ser inespecífica e aparecer como sinal tardio nas crianças

sépticas. Na presente investigação, não foi constatado influência da trombocitopenia nos pacientes sépticos quanto a evolução para óbito ou alta. Assim, de um modo geral a alteração quantitativa das plaquetas não parece ser a responsável pela evolução pouco favorável de 47,6% dos nossos RNs.

A **contagem total e diferencial dos leucócitos**, associada aos achados clínicos e a outros dados laboratoriais, é importante na avaliação de um paciente séptico, adulto ou criança. Os valores normais dos leucócitos, nos recém nascidos saudáveis, apresentam diferenças entre os diversos autores, o que mostra a facilidade com que os números oscilam nessa faixa etária, em questão de dias, inclusive variando com o peso ao nascer (ALTMAN; DITTMER, 1961). Como faixa normal, Altman e Dittmer (1961) mostram uma variação de 5.000 a 21.000/uL, com média de 12.200/uL; Falcão e Callado (2001) referem de 6.000 a 17.500/uL.

O grupo controle, do presente estudo, mostrou uma contagem leucocitária variando de 4.200 a 17.400/uL, com média de 12.040/uL, (**tabela 5**), esse resultado é concordante com os autores citados. O grupo de RNs sépticos mostrou uma faixa de variação bem mais ampla, de 5.600 a 35.100/uL, com média de 18.080/uL, sendo a diferença entre as médias estatisticamente significantes ( $p = 0,0166$ ). A alteração quantitativa dos leucócitos mostra-se clinicamente mais importante quando constatamos leucocitose em 54,5% dos pacientes que foram a óbito (média de 20.980/uL), e em 40% dos que responderam ao tratamento (média de 14.880/uL). A diferença estatisticamente significativa constatada entre os valores médios de leucócitos totais dos RNs sépticos e controle, se deveu, principalmente aos valores significativamente elevados dos neutrófilos totais nos RNs sépticos.

Godula et al (1999), estudando RNs sépticos encontraram valores de leucócitos comparáveis aos do nosso grupo que respondeu ao tratamento. Squire et al (1979) consideram a leucopenia como o sinal prognóstico adverso mais importante na sepse neonatal e Tollner (1982) a descreve como o achado hematológico relevante no diagnóstico precoce dos RNs gravemente doentes. No presente estudo não foi constatada leucopenia nos casos sépticos, parecendo haver uma tendência ao pior prognóstico nas crianças com maior número de leucócitos.

A **contagem diferencial leucocitária** em recém nascidos e crianças normais mostra um predomínio de células mononucleares, principalmente de linfócitos, em relação aos granulócitos, essa relação vai se invertendo e em adultos

existe um predomínio de polimorfonucleares, principalmente de neutrófilos (FALCÃO; CALLADO, 2001). Segundo Akenzua et al. 1974; Zipursky et al. 1976; Manroe et al. 1979, a contagem absoluta de neutrófilos (bastonetes e segmentados) não é suficientemente útil como fator preditivo na sepse neonatal, sendo mais acurada a relação I/T (imaturos/neutrófilos maduros). No presente estudo os neutrófilos totais no grupo controle variaram de 1.848 a 9.017/uL com média de 6.275/uL, dado este concordante com os descritos por Manroe et al., (1979), enquanto no grupo de sépticos essa variação foi de 2.232 a 23.680/uL com média de 10.620/uL, diferença essa **estatisticamente significativa** ( $p = 0,017$ ). Quando analisamos os resultados entre os RNs sépticos que foram a óbito e os que responderam ao tratamento, verificamos que 7 dos 11 (64%) pacientes do primeiro grupo apresentaram neutrofilia, em comparação com apenas 2 dos 10 (20%) que responderam ao tratamento.

Na análise da resposta neutrofilica dos neonatos sépticos é importante avaliar a contagem dos neutrófilos imaturos, para cálculo do **índice neutrofilico (tabela 5)**. Nos casos os valores foram de 0,01 a 0,12 com média de 0,05 e nos controles essa variação foi de 0,0 a 0,16 com média de 0,05. Não houve significância estatística entre as médias do índice neutrofilico.

Para Manroe et al. (1979), o aumento do índice neutrofilico (I/T) constitui-se um fator preditivo em 52 a 82% dos neonatos sépticos e Lewin (1992), afirma que uma relação  $<0,2$  prediz ausência de sepse bacteriana.

É muito importante considerar, na avaliação dessa resposta, que os PMNs do neonato demonstram diminuição da quimiotaxia, opsonização, fagocitose, deformabilidade, bem como da resposta oxidativa nos processos de defesa por eles exercida (LEWIN, 1992).

Recém nascidos sépticos e granulocitopênicos têm pior prognóstico e risco de mortalidade em cerca de 90% dos casos, principalmente se o estoque de neutrófilos da medula óssea é depletado para  $<7\%$  do total de células nucleadas. Como esse estoque não pode ser facilmente avaliado, o estudo das formas imaturas no sangue periférico pode ser usado como um valor aproximado desse nível. Uma relação I/T  $>0,8$  se correlaciona com depleção do estoque medular de neutrófilos e gravidade do quadro (LEWIN, 1992).

Os resultados aqui analisados permitem definir que os recém-nascidos responderam à infecção bacteriana com leucocitose e neutrofilia às custas de PMNs maduros e sem aumento das formas imaturas. É possível considerar que houve uma boa resposta leucocitária, em parte responsável pelos 52,3% de neonatos sépticos que responderam ao tratamento.

A **contagem absoluta de linfócitos** no sangue periférico é mais elevada em neonatos e crianças, quando comparada com o adulto (BUSSEL et al., 1988; OSKY et al., 1993; COMMANS-BITTER et al., 1997; GODULA-STUGLIK et al., 1999; VRIES et al., 2000). De acordo com o “Newborn Services Guidelines and Protocols” os linfócitos totais de RNs normais variam de 2.000 a 11.000/uL, com média de 5.500/uL. Os valores encontrados, no presente trabalho, para o grupo controle (2.100 a 10.960/uL, média 5.000/uL) (**tabela 6**), estão de acordo com os acima referidos, bem como com os de Teixeira (1987), obtidos em 50 RNs normais da Maternidade Escola Assis Chateaubriand.

Os neonatos com sepse apresentaram uma variação mais ampla dos valores dos linfócitos (900 a 19.070/uL, média de 6.230/uL) quando comparados com os normais, mas sem diferença significativa ( $p = 0,9663$ ). Registramos também essa maior amplitude dos valores de linfócitos quando comparados com a faixa de variação encontrada em RNs sépticos estudados por Godula-Stuglik et al., (1999), que foi de 2.208 a 9.280/uL, media de 5.141/uL. Entretanto em valores médios dos nossos dados são concordantes com Godula-Stuglik et al. (1999). Sofatzis et al. (1996), encontraram linfócitos significativamente mais baixos nos neonatos sépticos do que nos saudáveis; os nossos dados não revelaram essa tendência.

Dentre os RNs do grupo que foi a óbito, 3 dos 11 (27%) apresentaram discreta linfocitose (13.338/uL, 16.170/uL e 19.072/uL), alteração encontrada em apenas um (10%) dos que responderam ao tratamento, e um único paciente apresentando linfopenia (**tabela 8**). Para Godula-Stuglik et al. (1999), a diminuição dos linfócitos explica a baixa eficácia da imunidade mediada por células nos neonatos, mesmo nos nascidos a termo. No presente estudo, os RNs sépticos que não responderam ao tratamento apresentaram contagem linfocitária bastante elevada (**tabela 8**), e entretanto este quadro não parece ter contribuído para o controle da infecção. É possível que outros fatores agravantes tenham influenciado na evolução da sepse nesses pacientes.

Os valores obtidos na análise **imunofenotípica dos linfócitos T** dos RNs sadios do presente estudo estão de acordo com os valores obtidos por Godula-Stuglik et al (1999). Comparando os valores dos controles com os obtidos em RNs sépticos, encontramos valores superiores, no segundo grupo, mas sem significância estatística (**tabela 6**). O mesmo comportamento verificou-se entre o nosso grupo de sépticos e os pacientes estudados por Godula-Stuglik et al. (1999) e Vries et al. (2000). Os valores elevados dos **linfócitos T** evidenciados no **grupo séptico** relacionam-se à elevação das subpopulações T CD4<sup>+</sup> (helper) com valores de 340 a 10.610/uL com média de 3.470/uL e CD8<sup>+</sup> (citotóxico) com valores de 190 a 4.290/uL e média de 1.310/uL com predomínio dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>. Esses dados são concordantes com os valores relatados pelos autores acima citados.

Nos pacientes **sépticos que foram a óbito** os linfócitos T (**tabela 8**), revelaram valores superiores aos dos sépticos que responderam ao tratamento, mas sem diferença estatística significativa.

O aumento dos linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) representa um passo essencial na eliminação de patógenos intracelulares, em virtude dos produtos gerados por estes linfócitos estimularem os macrófagos. Na sepse bacteriana por bactérias extracelulares a imunidade humoral é a principal resposta imune específica protetora. A resposta de célula T às bactérias extracelulares é dada pela células TCD4<sup>+</sup> em resposta a antígenos protéicos. O linfócito TCD4<sup>+</sup> secreta citocinas que estimulam a produção de anticorpos (IL-4, IL-5 e IL-6), induzem a anticorpopogênese, e que aumentam a atividade dos fagócitos (VILELA, 2001).

No presente estudo, a elevação dos linfócitos T nos **RNs que foram a óbito** sugere que esta célula não desempenhou papel protetor significativo.

Os valores dos **linfócitos B** avaliados em **RNs controle** demonstraram variação de 120 a 1.590/uL com média de 700/uL (**tabela 6**), que se encontram de acordo com os valores obtidos por Godula-Stuglik et al. (1999) e Erkeller-Yuksel et al. (1992). Nos **RNs sépticos** os valores de célula B apresentam-se mais elevados em relação ao nosso grupo controle, mas sem significância estatística. Godula-Stuglik et al (1999), encontraram os valores de B para os RNs sépticos em patamares inferiores aos observados nos pacientes sépticos da presente casuística. Weinschenk, Farina e Bianchi (2000), observaram que a expressão de CD19 estava elevada nos linfócitos de RNs doentes comparados com sadios e concluíram que a

elevação da expressão de CD19, bem como de CD33 e CD66 foi significativamente preditiva na sepse, em uma análise multivariável. Entretanto afirmam que a amostra estudada era reduzida para determinar um valor preditivo positivo. O desenvolvimento de anticorpos específicos é dependente da exposição dos linfócitos B ao antígeno, do auxílio do linfócito T CD4<sup>+</sup> e do grau de maturação dos linfócitos B. Na presente casuística a elevação dos valores do linfócito T CD4<sup>+</sup> e dos linfócitos B sugere uma acentuação da resposta imune frente a um quadro grave de sepse, porém, não foi possível estimar o valor preditivo desses dados para a sepse neonatal, devido ao reduzido número de pacientes avaliados.

A contagem de **células NK nos RNs controle** (variação de 50 a 690/uL com média de 250/uL) estão abaixo dos valores normais encontrados por outros autores (GODULA-STUGLIK et al, 1999; VRIES et al.,2000).

Quando analisamos os resultados nos **RNs sépticos**, os valores de células NK (variando de 10 a 290/uL, média de 80/uL) mostraram-se muito abaixo do valor médio observado no grupo controle, com diferença estatisticamente significativa entre as médias (**p = 0,0041**).

Do mesmo modo, Godula-Stuglik et al. (1999) encontraram baixos valores de NK nos RNs sépticos, entretanto em patamares superiores aos encontrados no grupo de RNs sépticos do presente trabalho.

Nos RNs sépticos que **foram a óbito**, as células NK variaram de 10 a 290/uL, com valor médio de 120/uL, e nos RNs que **responderam ao tratamento**, os valores de NK variaram de 10 a 70/uL, com valor médio de 32/uL, com diferença estatisticamente significativa (**p=0,0124**) (**tabela 8**).

A redução significativa das células NK nos RNs sépticos, em relação aos controles, sugere que a falta de atuação de defesa desta célula pode ter contribuído para sepse neonatal. Porém, a análise dos dados dos subgrupos - sépticos com óbito e sépticos que responderam ao tratamento - parece contradizer tal interpretação, haja vista que os sépticos que responderam ao tratamento revelaram número médio significativamente menor do que o observado para o subgrupo que foi a óbito. A contradição desses dados não pode ser esclarecida, devido ao pequeno número de pacientes que compõem os dois grupos.

O fato das NK serem evidenciadas em números superiores no sangue do cordão umbilical (controles) do que dias e semanas após o parto, até atingir valores significativamente menores em adulto, poderá sugerir que estas células sejam, possivelmente, mais importantes durante a vida intra-uterina do que após o nascimento (VRIES et al 2000).

O valor de **PCR** mostrou-se elevado (variação de 12 a 96mg/L) em todos os seis RNs sépticos que foram a óbito (**tabela 9**). Dos seis RNs que responderam ao tratamento três apresentaram o valor da PCR nos limites normais ( $\leq 6$ mg/L), e os outros três apresentavam valores que variaram de 12 a 24mg/L, sendo que o menor valor nesse grupo representa o dobro do valor considerado normal.

A PCR é um dos principais marcadores da resposta inflamatória aguda. A elevação sérica da PCR representa indiretamente a elevação das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF). Níveis séricos aumentados de PCR e IL-6 tem sido associados, fortemente, com a mortalidade em idosos saudáveis. O efeito da IL-6 na cascata da coagulação, através de sua ação nas plaquetas e na ativação do fibrinogênio, justifica sua importância como um dos possíveis agentes causais nos estados de hipercoagulabilidade sanguínea (FERNANDEZ-REAL, 2001). Os elevados valores de PCR evidenciados no presente estudo, confirmam uma acentuada resposta inflamatória durante o processo infeccioso nos RNs sépticos, principalmente nos que foram a óbito.

Segundo Mathers; Pohland, 1987; Peltola; Jakola, (1988), a PCR relaciona-se fortemente com as infecções bacterianas em neonatos, mas o seu aumento não é frequentemente observado até 12 a 24 horas após o início da infecção neonatal, sendo menos útil como teste diagnóstico no estágio precoce da infecção. Para Ballow et al.(1986), esta proteína age como opsonizadora de bactérias, parasitas e complexos imunes, por meio da ativação do sistema do complemento pela via clássica, podendo também modular o comportamento de células como o neutrófilo (regula a quimiotaxia), células NK (aumenta a citotoxicidade) e plaqueta (inibe sua agregação).

Os resultados das **hemoculturas** realizadas nos RNs doentes mostraram positividade em 75% dos casos, sendo todos infectados por bactérias extracelulares. É conhecido que as bactérias extracelulares induzem inflamação, que provoca lesão



tissular e produzem toxinas – endotoxinas e exotoxinas. As endotoxinas são potentes ativadoras da produção de citocinas pelos macrófagos, incluindo o TNF, a IL-1, a IL-6 e quimiocinas. A imunidade humoral é a principal resposta imune específica protetora contra as bactérias extracelulares, induzindo uma produção de IgG, T independente. Por outro lado, a principal resposta das células T às bactérias extracelulares é dada pelas células TCD4<sup>+</sup>. As células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células B, processam os antígenos protéicos bacterianos e os apresentam às células T. Os anticorpos e os linfócitos agem com diferentes mecanismos para eliminar as bactérias extracelulares. Observou-se que grande número de células T ativadas pode levar à produção descontrolada de citocinas, resultando em sérias manifestações clínico-patológicas, inclusive à Síndrome do Choque Tóxico (VILELA, 2001).

Acreditamos que todos esses mecanismos, de hiperprodução de citocinas, diminuição das NK e pouca estimulação dos macrófagos podem ser evocados na resposta dos neonatos sépticos que foram a óbito.

## 6 CONCLUSÕES

1. Recém-nascidos sépticos e RNs controles apresentaram valores médios, sem, diferença estatisticamente significantes, nos **parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, neutrófilos totais, neutrófilos imaturos e índice neutrofílico)**.
2. Os valores médios dos leucócitos totais dos RNs sépticos se mostrou significativamente mais elevado em relação ao grupo controle, ( $p= 0,016$ ) e se deveu, principalmente aos valores significativamente elevados dos neutrófilos totais ( $p= 0,017$ ).
3. Identificações imunofenotípicas das subpopulações de **linfócitos** mostraram valores médios semelhantes entre RNs sépticos e controles nos seguintes parâmetros: **linfócitos totais, células B, LT CD8<sup>+</sup>** e a relação **CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>**. Porém, **os valores médios de LT CD4<sup>+</sup> dos sépticos se mostrou significativamente mais elevado** do que o do grupo controle.
4. **O valor médio de NK (imunofenotipagem) dos sépticos se situou significativamente abaixo** do que o do grupo controle. Porém, **os sépticos que responderam ao tratamento apresentaram redução significativa no valor médio de NK**, em comparação aos sépticos que foram a óbito.
5. **O valor médio de PCR dos sépticos que foram a óbito foi maior** do que dos sépticos que responderam ao tratamento.
6. Os RNs que foram a óbito em relação aos que responderam ao tratamento apresentaram valores médios de acentuada leucocitose, neutrofilia às custas de segmentados e linfocitose.
7. A identificação imunofenotípica das subpopulações linfocitárias dos RNs que foram a óbito em relação aos que responderam ao tratamento, mostrou um predomínio de linfócitos T (CD3+) e linfócitos B(CD19+).

## 7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: WB Saunders, 1994. p. 417.
- AKENZUA, G. I.; HUI, Y. T.; MILNER, R.; ZIPURSKY, A. Neutrophil and band counts in the diagnosis of neonatal infections. **Pediatrics**, v. 54, p. 8-42, 1974.
- ALMON R.; PEZZO, M. Processing and interpretation of blood cultures. In: ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. v. 1, p. 7.
- ALTMAN, P. L.; DITTMER, D. S. **Blood and other body Fluids**. Washington, D.C: Federation American Societies Experimental Biology, 1961.
- ANWER, S. K.; MUSTAFA, S. Rapid identification of neonatal sepsis. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 50, n. 3, p. 94-98, 2000.
- BALLOW, M.;LYNN, C. K.; ROWE, J. C.; GOETZ, C.; DESBONNET, C. Development of the immune system in very low birth weight (less than 1500g) premature infants, concentrations of plasma immunoglobulins and patterns of infections. **Pediatr. Res.**, v.20, p. 899-904, 1986.
- BELLANTI, J. A.; PUNG, Y.; ZELIGS, B. J. The Newborn Infant-Immunology. In: AVERY, G. B.; FLETCHER, M. A.; MACDONALD, M. G., **Neonatology: pathophysiology and management of the newborn**. 4<sup>th</sup>.ed. Philadelphia, JB. Lippincott , 1994. p.1000-1028.
- BONADIO, W. A.; HENNES, H.;SMITH, D. Reability of observation variables in distinguishing infectious outcome of febrile young infants. **Pediatr. Inf. Dis. J.**, v.12, p.11-19, 1993.
- BUSSEL, J.B.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; LAGAMMA, E.F.; SHELLABARGER, M. Analysis of lymphocyte proliferative response subpopulations in very low birth weight infants and during the first 8 weeks of the life. **Pediatr. Res.** v. 23, p. 457-462, 1988.
- CAIRO, M. S. Neonatal neutrophil host defense. **Am. J. Dis. Child.**, v. 143 p. 40-46, 1989.
- CAKSEN, H.; KURTOGLU, S.; HALLAC, I. K.; USTUNBAS, H. B.; UZUM, K.; KILIC, H. The relationship between scoring systems and cytokine levels in neonatal sepsis. **Ann. Acad. Med. Singapore**, v. 32, n. 3, p. 418-420, 2003.
- CAPURRO, H; KONICHEZKY, S; FONSECA, D; CALDEYRO-BARCIA, R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. **J. Pediatr.**, v.93, n.1, p.120- 122, July 1978.

CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; GRUMACH, A. S. Peculiaridades da resposta imune do recém-nascido. In: DINIZ, E. M. A.; VAZ, F. A. C. (Ed.). **Infecções congênitas e perinatais**. São Paulo: Atheneu, 1991. p.1-14.

CLYNE, B., OLSHAKER, J.S., The C-reactive protein. **J. Emerg. Med.**, v. 17, n. 6, p.1019-25, 1999.

COMMANS-BITTER W.M., GROOT, R., VAN DEN BEEMD, R., NEIJENS, H.J., Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. **J. Pediatr.**, v.130, p.388-393, 1997.

CORRIGAN, J. J. Jr. Thrombocytopenia: a laboratory sign of septicemia in infants and children. **J. Pediatr.**, v. 85, p. 219, 1974.

COSTA-CARVALHO, B. T.; VIEIRA, H. M. S.; CARBONSRE, S. B.; RIBEIRO, M. A.; GRISARDI, N.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Níveis de imunoglobulinas y lisozimas en sangre de cordon umbilical en recién nacidos de diversas edades gestacionales. **Rev. Latinam. Perinatol.**, v. 9, p. 98-105, 1988.

De MORAES-PINTO, M. I; IAZZETTI, A. V; FARHAT, C. K. Transporte transplacentário de anticorpos: implicações na proteção do recém-nascido e em estratégias de imunização. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 19, p. 87-92, 2001.

DOMINGUEZ, E.; MADRIGAL, J. A.; LAYRISSE, Z.; COHEN, S. B. Fetal natural killer cell function is suppressed. **Immunology**, v. 94, n. 1, p. 109-114, 1998.

DONOWITZ, L. G.; HALEY, C. E.; GREGORY, W. W.; WENZEL, R. P. Neonatal intensive care unit bacteremia: emergence of gram-positive bacteria as major pathogens. **Am. J. Infect. Control**, v. 15, p. 141-147, 1989.

EDWARDS, S. E. Complement in neonatal infections: an overview. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 5, n.3 suppl., p. S168-S170, 1986.

ENGLE, W. D.;ROSENFELD, C. R. Neutropenia in high-risk neonates. **J. Pediatr.**, v. 105, p. 982-986, 1984.

ERDMAN, S. H.; CHRISTENSEN, R. D.; BRADLER, P. P.; ROTHSTEIN, G. Supply and release of storage neutrophil. **Biol. Neonate**, v. 41, p. 132-137, 1982.

ERKELLER-YUKSEL, F. M.; DENEYS, V.; YUKSEL, B. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. **J. Pediatr.**, v. 120, n. 2 pt. 1, p. 216-222, 1992.

FALCÃO, R. P.; CALLADO, R. T. Heterogeneidade das células do sangue. Órgãos hematopoéticos e linfopoéticos. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 3-13.

FANAROFF, A. A.; MARTIN, R. J. **Neonatal perinatal medicine: diseases of the fetus and infants**. 6<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1997. v. 1, p. 722-725.

FARMAN, M. L.; STIEHM, E. R. Impaired opsonic activity but normal phagocytosis in low birth weight infants. **N. Engl. J. Med.**, v. 281, p. 926-931, 1969.

FERNANDEZ-REAL, J. M.; VENDRELL, J.; RICHART, C.; RICART, W. Platelet count and Interleukin-6 polymorphism in healthy subjects. **BMC Med. Genet.**, v. 2, n. 1, p. 6, 2001.

GARDINER, C. M.; REEN, D. J. Differential cytokine regulation of natural killer cell-mediated necrotic and apoptotic cytotoxicity. **Immunology**, v. 93, n. 4, p. 511-517, 1998.

GHOSH, S.; MITTAL, M.; JAGANATHAN, G., Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematological scoring system. **Ind. J. Med. Sci.**, v. 55, n. 9, p. 495-500, 2001.

GODULA-STUGLIK, U.; MAZUR, B.; MIKUSZ, G.; TORBUS, T.; TOMANEK, L. Lymphocyte subpopulations full-term septic neonates. **Pediatr. Int.**, v. 41, p. 500-505, 1999.

GOLDMANN, D. A.; LECLAIR, J.; MACONE, A. Bacterial colonization of neonates admitted to an intensive care environment. **J. Pediatr.**, v. 93, p.288-293, 1978.

GONZALEZ, B. E.; MERCADO, C. K.; JOHNSON, L.; BRODSKY, N. L.; BHANDARI, V. Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. **J. Perinat. Med.**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2003.

HAMMERBERG, O.; BIALKOWSKA-HOBRANSKA, H.; GREGSON, D.; POTTERS, H.; GOUPAUL, D.; REID, D., Comparison of blood cultures with corresponding venipuncture site cultures of specimens from hospitalized premature neonates. **J. Pediatr.**, v. 120, p.120-124, 1992.

HARPIN, V. A.; RUTTER, N. Barrier properties of the newborn infant's skin. **J. Pediatr.**; v. 102, p. 419-425, 1983.

HENGST, J. M. The role of C-reactive protein in the evaluation and management of infants with suspected sepsis. **Adv. Neonatal Care**, v. 3, n. 1, p. 3-13, 2003.

HOGASEN, A. K.; OVERLIE, I.; HANSEN, T. W.; ABRAHAMSEM, T. G.; FINNE, P. H.; HOGASEN, K. The analysis of the complement activation product SC5b-9 is applicable in neonates in spite of their profound C9 deficiency. **J. Perinat. Med.**, v. 28, n. 1, p. 39-48, 2000.

JASWAL, R. S.; KAUSHAL, R. K.; GOEL, A.; PATHANIA, K. Role of C-reactive protein in deciding duration of antibiotic therapy in neonatal septicemia. **Ind. Pediatr.**, v. 40, n. 9, p. 880-883, 2003.

JOHN, B. I. Linfócitos T e células Natural Killer. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. (Ed.). **Imunologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 101-112.

JURGES, E. S.; HENDERSON, D. C. Inflammatory and immunological markers in preterm infants: correlation with disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v.105, p. 551-555, 1996.

KLEIN, J. O.; MARCY, S. M. Bacterial sepsis and meningitis. In: REMINGTON J. S.; KLEIN, J. O. (Eds.). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990, p. 602-622.

KLEIN, J. O.; MARCY, S. M. Bacterial sepsis and meningitis. In: REMINGTON J. S.; KLEIN, J. O. (Eds.). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 6<sup>th</sup>. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. v.1, p.835-890.

KOENIG, J. M.; CHRISTENSEN, R. D.; Incidence, neutrophil kinetics, and natural history of neonatal neutropenia associated with maternal hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, n. 9, p.557-562, 1989.

KOENIG, J. M.; CHRISTENSEN, R. D. The mechanism responsible for diminished neutrophil production in neonates delivered of women with pregnancy-induced hypertension. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 165, p. 467-473, 1991.

KURLAT, I.; STOLI, B. J.; McGOWAN, J. E. Time to positivity for detection of bacteremia in neonates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27 p.1068-1071, 1989.

KÜSTER, H.; WEISS, M.; WILLEITNER, A. E.; DETLEFSEN, S.; JEREMIAS, I.; ZBOJAN, J.; GEIGER, R.; LIPOWSKY, G.; SIMBRUNER, G. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. **Lancet**, v. 352, n. 9136, p. 1271-1277, 1998.

KUSTER, H.; WEISS, M.; WILLEITNER, A. E.; DETLEFSEN, S.; JEREMIAS, I.; LA GAMMA, E. F.; DRUSIN, L. M.; MACKLES, A. W.; MACHALEK, S.; AULD, P. A. M. Neonatal. infections: na important determinant of late NICU mortality in infant less than 1000g at birth. **Am. J. Dis. Child.**, v.137, n. 9, p. 838-841,1983.

LEVY, O.; MARTIN, S.; EICHENWALD, E.; GANZ, T.; VALORE, E.; CARROLL, S. F.; LEE, K.; GOLDMANN, D.; THORNE, G. M., Impaired innate immunity in the newborn: newborn: neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. **Pediatrics**, v. 104, n. 6, p. 1327-1333, 1999.

LEWIN, E.B. Neonatal sepsis. In: THE MERCK manual of diagnosis and therapy. 6<sup>th</sup>. ed. Rahway, N.J: Merck Research Laboratories, 1992. p. 2025-2031.

LEWIS, D. B.; WILSON, C. B. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility to infection. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. **Infectious diseases of fetus and newborn infant**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p. 20-98.

LOKESHWAR, M. R.; BAVDEKAR, M.; KULKARNI, S.; SHAH, N. **Neonatal thrombocytopenia - a challenge.** Disponível em:

<<http://www.pediatriconcall.com/fordocor/pediatricanalysis/pediatricanalysis.asp>>. Acesso em: 29 abr. 2001.

MANROE, B. L.; WEINBERG, A. G.; ROSENFELD, C. R.; BROWNE, R. The neonatal blood count in health and disease: 1. Reference values for neutrophilic cells. **J. Pediatr.**, v. 95, p. 89-98, 1979.

MANUCHA, V.; RUSIA, U.; SIKKAM, M.; FARIDI, M. M.; MADAN, N. Utility of haematological parameters and C-reactive protein in the detection of neonatal sepsis. **J. Paediatr. Child. Health**, v. 38, n. 5, p. 459-464, 2002.

MARTIUS, J. A. Risk factors associated with early-onset sepsis in premature infants. **Eur. J. Obstetr. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 85, p. 151-158, 1999.

MATHERS, N. J.; POHLAND, F. Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection. **Eur. J. Pediatr.**, v. 146, p.147-151, 1987.

McGRATH, J. M.; STEWART, G. J. The effects of endotoxin on vascular endothelium. **J. Exp. Med.**, v. 129, p. 833, 1969.

MEJIA – DOMINGUEZ, A.M.; MEJIA – DOMINGUES, S.; DORANTES – MESA, S.; VIGUERAS – RENDOV, A. Valores da série roja, leucocitos y plaquetas en las primeras ocho semanas de la vida a 2.650 metros de altitud. **Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.**, 42 (5) : 297-305, 1985.

MESSER, J.; EYER, D.;DONATO, L.; GALLATI, H.; MATIS, J.; SIMEONI, U., Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. **J. Pediatr.**, v. 129, p. 574-580, 1996.

MILLER, M. E. Phagocyte function in the neonate selected aspects. **Pediatrics**, v. 64, p. 709-712, 1979.

MOHAN, P.; BROCKLEHURST, P. Granulocyte transfusions for neonates with confirmed or suspected sepsis and neutropaenia. **Cochrane Database Syst Rev.**, n. 4:CD 003956, 2003.

OMS, FIGO, 1976. In REZENDE, J.; MONTENEGRO, C. A. B. (Eds. ). *Obstetrícia Fundamental* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. P.336-345.

OSKI, F. The erythrocyte and its disorders. In: NATRHAN, D.; OSKI, F. (Eds.). **Hematology of infancy and childhood**. Philadelphia: WB Saunders, 1993. p. 18-43.

OSKI, F. A., NAIMAN, J. L. Valores hematológicos normais do recém-nascido. In: \_\_\_\_\_. **Hematologia do recém-nascido**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. cap.1, p.132.

OSKI, F. A.; STOCKMAN, J. A. Neonatal manifestations of severe maternal hypertension occurring before the thirty-sixth week of pregnancy. **Pediatrics**, v. 100, p. 265, 1982.

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.**, v.16, p.370-377, 1997.

PARRAVICINI, E.; Van de VEN, C.; ANDERSON, L.; CAIRO, M.S.; Myeloide hematopoietic growth factors and their role in prevention and/or treatment of neonatal sepsis. **Transf. Med. Rev.**, v. 16, n. 1, p. 11-24, 2002.

PATOLE, S.; VIJAYAKUMAR, P.; JOG, S. Perinatal immunomodulation. **J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.**, v. 11, n. 5, p. 290-301, 2002.

PELTOLA, H.; JAAKKOLA, M. C-reactive protein in early detection of bacteremia versus viral infections in immunocompetent and compromised children. **J. Pediatr.**, v. 113, p. 641-646, 1988.

PERKINS, S. L. Normal blood and bone marrow values in humans. In: LEE, R. G. (Ed.) **Wintrobe's Clinical hematology**. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 2738-2748.

PLACZEK, M. M.; WHITELAW, A. Early and late neonatal septicaemia. **Arch. Dis. Child.**, v. 58, n. 9, p. 728-731, 1983.

POURCYROUS, M.; BADA, H.; KORONES, S.; BARRETT, F.; JENNINGS, W.; LOCKEY, T. Acute phase reactants in neonatal bacterial infections. **J. Perinatol.**, v. 11, p. 319-325, 1991.

POURCYROUS, M.; BADA, H. S.; KORONES, S. B.; BASELSKI, V.; WRONG, S. P. Significance of serial C-reactive protein responses in neonatal infection and other disorders, **Pediatrics**, v. 92, p. 431, 1993.

POWELL, K. R. Laboratory aids for the diagnosis of neonatal sepsis. In: REMINGTON, J. S, et al., (Eds.). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995.

RIBEIRO-DO-COUTO, L. M.; POELEN, M.; HOOIBRINK, B.; DORMANS, L. A.; ROHOLL, P. J.; BOOG, C. J. Ultrastructural characterization of effector-target interactions for human neonatal and adult NK cells reveals reduced intercellular surface contacts of neonatal cells. **Human Immunol.**, v. 64, n. 5, p. 490-496, 2003.

RODWELL, R. L.; LESLIE, A. L.; TUDEHOPE, D. I. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. **J. Pediatr.**, v.112, p. 761-767, 1988.

RODWELL, R. L.; TAYLOR, K. M.; TUDEHOPE, D. I.; GRAY, P. H. Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.12, p.372-376, 1993.

SALGUEIRO, M. I. C. P.; COSTA, M. O. R.; COSTA-VAZ, F. A. Estado imunológico e mecanismos de defesa anti-infecciosa do recém-nascido pré-termo. **Pediatrics** (São Paulo) v. 22, n. 1, p. 68-77, 2000.



SCOTT, M. J.; HOTH, J. J.; GARDNER, A. S.; PEYTON, J. C.; CHEADLE, W. G. Natural killer cell activation primes macrophages to clear bacterial infection. **Am Surgery**, v. 69, n. 8, p. 679-686, 2003.

SÉGRE, C. A. M. Septicemia e meningite neonatal. **Pediatr. Mod.**, v. 28. n. 2, p. 97-105, 1983.

SHIGEOKA, A. O.; CHARETTE, R. P.; WYMAN, M. L. Defective oxidative metabolic responses of neutrophils from stressed neonates. **J. Pediatr.**, v. 98, p. 392-398, 1981.

SHINE, B.; GOULD, J.; CAMPELL, C.; HIDOCHA, P. R.; WOOD, C. Serum C-reactive protein in normal and infected neonates. **Clin. Chem.**, v.148, p. 97-103, 1985.

SIDRIM, R. B. **Sepse neonatal em unidade de terapia intensiva: características clínico-epidemiológicas etiologia e fatores de risco.**1999. 214 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina , Universidade Federal do Ceará, 1999.

SIEGEL, J. D.; McCracken, G. H. Sepsis neonatorum. **N. Engl. J. Med.**, v. 304, n. 11, p. 642-647, 1981.

SIEGEL, J. D. Neonatal sepsis. **Semin. Perinatol.**, v. 9, n.1, p. 20-28, 1985.

SQUIRE, E.; FAVARA, B.; TODD, J. Diagnosis of neonatal bacterial infection; Hematologic and pathologic findings in fatal and non fatal cases. **Pediatrics**. v. 64 p. 60-64, 1979

SOFATZIS, P.; MEXI, B. P.; LIOSSIS, G.; DRIVA, I.; ALEXIA,S.; COSTALES, C. Lymphocytes subpopulations in neonatal sepsis. **Perinatal Neonatal Med.**, v.1, suppl. 1, p. p.215, 1996.

SOLA, M. C.; Del VECCHIO, A.; RIMSZA, L. Evaluation and treatment of thrombocytopenia in the neonatal intensive care unit. **Clin. Perinatol.**, v. 27, p. 655-679, 2000.

ST. GEME, J. W.; POLIN, R. A. Neonatal sepsis: progress in diagnosis and management. **Drugs**, v. 36, n. 6, p. 784-800, 1988.

STIEHM, E. R. Decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants, and young children. **Pediatrics**, v. 60, p. 467-472, 1977.

STIEHM, E. R. **Immunologic disorders of infants and children.** 4<sup>th</sup>. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996.

STOLL, B.J.; GORDON, T.; KORONES, S. B. Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development National Research Network. **J. Pediatr.**, v.129, n. 1 p. 72-80, 1996.

TEIXEIRA, R. M. S. **Valores hematológicos normais** – estudo em recém-nascidos. 1987. 21f. Monografia (Curso de Especialização) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 1987.

TOLLNER, U. Early diagnosis of septicemia in the newborn. Clinical studies and sepsis score. **Eur. J. Pediatr.**, v. 138, p. 331-337, 1982.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv. Immunol.**, v. 47, p. 187, 1989.

UTHAISANGSOOK, S.; DAY, N. K.; BAHNA, S. L.; GOOD, R. A.; HARAGUCHI, S. Innate immunity and its role against infections. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 88, n. 3, p. 253-264, 2002.

VARAS, A.; JIMÉNEZ, E.; SACEDÓN, R.; RODRIGUEZ-MAHOU, M.; MAROTO, E.; ZAPATA, A. G.; VICENTE, A. Analysis of the human neonatal thymus: evidence for a transient thymic involution. **J. Immunol.**, v. 164, p. 6260-6267, 2000.

VILELA, M. M. S. Desenvolvimento do sistema imune da criança. In: GRUMACH, A. S. (Ed.). **Alergia e imunologia na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu, 2001. p.327-342.

VINCENT, J. L.; YAGUSHI, A.; PRADIER, O. Platelet function in sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 30, n. 5 suppl. p. S313-S317, 2002.

VRIES, E.; BRUIN-VERSTEEG, B.; COMANS-BITTER. Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. **Pediatr. Res.**, v. 47, p. 528-537, 2000.

WEINSCHENK, N. P.; FARINA, A.; BIANCHI, D. W. Premature infants respond to early-onset and late-onset sepsis with leukocyte activation. **J. Pediatr.**, v.137, n. 3, p. 345-350, 2000.

WEITZMAN, M. Diagnostic utility of white blood cell counts and differential cell counts. **Am. J. Dis. Child.**, v. 129, p.1183, 1975.

YODER, M. C.; POLIN, R. A. The immune system. In: FANAROFF, A. A.; MARTIN, R. J. **Neonatal perinatal medicine: diseases of the fetus and infant**. 6<sup>th</sup>. ed. St Louis: Mosby Year Book, 1997. v.1, p. 685-811,

YOKOYAMA, W. Natural killer cells: Right-side-up and up-side-down Nk-cell receptors. **Curr. Biol.**, v. 5, p. 982, 1995.

ZIPURSKY, A.; PALKO, J.; MILNER, R.; AKENZUA, G. I. The hematology of bacterial infections in premature infants. **Pediatrics**, v. 57, p. 839-853, 1976.

**ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

Ofício nº 008/99

Fortaleza, 24 de novembro de 1999

*Responsável: Professor José Ajax Nogueira Queiroz**Depatº/Serviço: Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC**Título do Projeto: Avaliação de Marcadores clínico-laboratoriais e Imunológicos na Sepsis Neonatal e no Lactente*

Levamos ao conhecimento de V.Sª, que o **Comitê de Ética em Pesquisa** do Hospital Infantil Albert Sabin – Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, publicada no Diários Oficial da União em 16 de outubro de 1996, aprovou o projeto supracitado.

Atenciosamente,

*Maria Ceci do Vale Martins*  
Dra. Maria Ceci do Vale Martins  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
COMEPE/HIAS/SSEC



