

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA- IMIP

FACULDADE PERNAMBUCANA DE SAÚDE - FPS



**“REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E EXPRESSÃO DE
QUIMIOCINAS SÉRICAS EM CRIANÇAS COM PNEUMONIA E SEPSE”**

Trabalho de pesquisa do Programa de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq IMIP com vigência 2013-2014.

Bolsista: Isabelle Hsu Lee Ramos

Orientadora: M^a do Carmo M. B. Duarte

Co-orientadoras: Leuridan Cavalcante Torres e Nara Vasconcelos Cavalcanti

Colaboradores: Jailson Correia, Luana Nobre e Marina Cadena

Recife, agosto de 2014.

“REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS SÉRICAS EM CRIANÇAS COM PNEUMONIA E SEPSE”

Isabelle Hsu Lee Ramos¹; Leuridan Cavalcante Torres²; Nara Vasconcelos Cavalcanti³; Luana Nobre de Abreu Carvalho⁴; Jailson de Barros Correia⁵; Marina Cadena da Matta⁶; Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte⁷.

¹ Estudante de graduação de Medicina da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS) e bolsista do Programa de Iniciação Científica PIBIC IMIP/CNPq.

² Coordenadora do Laboratório de Pesquisa Translacional Prof. C. A. Hart; Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional - CNPq/ FACEPE; Docente pesquisadora da Pós-graduação *stricto sensu* do IMIP. Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP (IMIP).

³ Doutoranda em Saúde Materno Infantil do IMIP. Médica Pediatra do IMIP e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz.

⁴ Estudante do curso de graduação de Medicina da FPS.

⁵ Docente pesquisador da Pós-graduação *stricto sensu* do IMIP.

⁶ Mestranda em Saúde Materno Infantil do IMIP.

⁷ Docente pesquisadora da Pós-graduação *stricto sensu* do IMIP*; coordenadora da UTI Pediátrica do Hospital Esperança.

* Autor correspondente: mcduarte2010@gmail.com

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Financiamento: FACEPE (Processo No. 1279-4.01/10).

RESUMO

Objetivos: identificar os patógenos causadores de infecção bacteriana invasiva através de hemocultura e reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real e avaliar a resposta inflamatória inata (quimiocinas séricas) de crianças internadas com pneumonia e sepse. **Método:** estudo prospectivo, tipo corte transversal. A coleta de dados foi realizada no período de agosto de 2012 a setembro de 2013. Foram incluídas crianças com idade maior de 29 dias a 14 anos com diagnóstico clínico de pneumonia e/ou sepse comunitária, dentro das primeiras 48 horas de internamento no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira. Foram excluídas as portadoras de imunodeficiência primária ou secundária, de cardiopatias congênitas complexas, anemia falciforme e as com má-formações intra e extratorácicas. O critério de sepse seguiu as recomendações do Consenso Internacional de Sepse Pediátrica e pneumonia foi definida por critério clínico baseado na presença de febre, tosse e/ou dificuldade respiratória e taquipneia. A detecção de patógenos (*Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*) foi realizada pela técnica de PCR em tempo real. A mensuração das concentrações sanguíneas de quimiocinas foi realizada pelo BDTM CBA, *human chemokine kit* (IL-8, IP-10, MIG, RANTES e MCP-1) através da citometria de fluxo. Foi realizada análise descritiva (distribuição de frequência, mediana e intervalo interquartil - IIQ₂₅₋₇₅) e estatística dos dados utilizando-se testes não paramétricos (*Mann Whitney U test*) para comparação dos dois grupos (pneumonia e sepse). **Resultados:** 58 crianças foram avaliadas, sendo 17 pneumonias e 41 sepse. Quanto à identificação do patógeno, a frequência de positividade das hemoculturas foi de 1,9%. A positividade do PCR em tempo real foi de 89,7%, correspondendo a 51 casos com *Streptococcus pneumoniae* e um caso com *Staphylococcus aureus*. Em relação à associação das quimiocinas com a gravidade de doença não se observou associações significativas. **Conclusão:** o estudo verificou uma alta detecção de patógenos através da técnica de PCR em tempo real, em torno de 90%, em contraste da baixa taxa observada na hemocultura (1,9%) em crianças com pneumonia e/ou sepse comunitária. Não foi encontrada relação entre as quimiocinas com a gravidade da doença.

Palavras-chave: reação em cadeia da polimerase, pneumonia, sepse, criança, quimiocinas.

ABSTRACT

Objective: Identify pathogens causing invasive bacterial infection through blood culture and real time polymerase chain reaction (PCR) and to evaluate innate inflammatory response (blood levels of chemokines) of children admitted with sepsis and/or pneumonia. **Methods:** a prospective cross-sectional study was performed between August 2012 and September 2013. Children were enrolled if older than 29 days and younger than 14 years with a clinical diagnosis of pneumonia and/or sepsis within 48 hours of hospital admission to Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira. Exclusion criteria were a previous diagnosis of primary or secondary immunodeficiency, complex congenital heart disease, sickle cell disease. Sepsis diagnosis followed recommendations of the International Pediatric Sepsis Consensus and pneumonia was defined by clinical criteria based on the occurrence of fever, cough and/or respiratory distress and tachypnea. Pathogen detection (*Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*) was performed through real time PCR. Blood levels of chemokines were measured by flow cytometry using BDTM CBA – human chemokine kit (IL-8, IP-10, MIG, RANTES e MCP-1). Descriptive analysis was performed (frequency distribution, median and interquartile range). Additionally, statistical analysis was undertaken using non-parametric tests (Mann Whitney U test), in order to compare the two groups (pneumonia and sepsis). **Results:** 58 children were evaluated, 17 had pneumonia and 41 sepsis. Regarding pathogen identification, the frequency of positive blood cultures was 1,9%. Positivity of real time PCR was 89,7%, corresponding to 51 cases of *Streptococcus pneumoniae* and one case of *Staphylococcus aureus*. Concerning the relation between blood levels of chemokines and disease severity, it was not detected any significant association. **Conclusion:** the present study observed a high pathogen detection through real time PCR, almost 90%, in opposition to a low detection through blood culture (1,9%) in children with pneumonia and/or sepsis. There was no relation between blood levels of chemokines and disease severity,

Key words: polymerase chain reaction, pneumonia, sepsis, children, chemokines.

Introdução

As infecções bacterianas invasivas (IBI), como pneumonia (PNM) e sepse, causam um número considerável de morbidade, mortalidade e demandam altos gastos de recursos em saúde em todo o mundo¹. Estima-se cerca de 19 milhões de novos casos de IBI no mundo por ano². Dessas, quatro milhões são devido à infecção respiratória aguda em crianças³.

O diagnóstico do agente causal das IBI continua desafiador. A hemocultura é considerada o padrão-ouro⁴ para o diagnóstico etiológico com positividade em torno de 30% em crianças com sepse². No entanto, a hemocultura possui baixa sensibilidade e é influenciada pelo uso de antibióticos⁵. Novas técnicas vêm sendo desenvolvidas para detecção precoce do patógeno, entre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Revisão sistemática realizada em 2013 na qual foram incluídos 80 estudos sobre diagnóstico de pneumonia em crianças, verificou que a PCR aumentou a detecção do patógeno para 65-86% dos casos⁵. Na Inglaterra, estudo envolvendo 44.118 crianças verificou que em 44,7% dos casos com suspeita de infecção, a frequência de cultura de sangue e/ou do líquido cefalorraquidiano (LCR) positiva foi de 2,4%⁶.

O tipo da bactéria, carga bacteriana, virulência e fatores relacionados ao hospedeiro, como idade, susceptibilidade genética e estado imune têm sido implicados na patogênese e gravidade da IBI⁷. Um desequilíbrio da resposta inflamatória tem sido associado à gravidade de doença. Ademais, novos estudos têm sido realizados com o objetivo de se identificar biomarcadores precoces de atividade inflamatória na sepse, a fim de melhorar o diagnóstico e intervenção na criança grave⁸.

As quimiocinas são uma família de proteínas quimioatraentes por promoverem o recrutamento celular, em especial de neutrófilos para o sítio da infecção⁹. A mais importante

das quimionas é a Interleucina (IL) 8 e estudo de revisão em adultos verificou que níveis elevados desta citocina estavam associados a deterioração hemodinâmica precoce e mortalidade em pacientes com sepse⁸. A proteína 10 induzida pelo interferon (IP-10), também é uma quimiciocina pro-inflamatória, é considerada um biomarcador promissor para o diagnóstico de infecção viral. No entanto, estudos em crianças com infecção bacteriana correlacionaram níveis altos de IP-10 com gravidade de doença¹⁰.

Este estudo tem como objetivo identificar os patógenos causadores de IBI através de culturas e PCR em tempo real e avaliar a resposta inflamatória inata (quimiocinas séricas) de crianças internadas com pneumonia e/ou sepse em um hospital escola no nordeste do Brasil.

Métodos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) sob o número 3816/13. Trata-se de um estudo clínico, exploratório, translacional no qual foram incluídas crianças e adolescentes com idade maior que 29 dias a 14 anos admitidos no IMIP com diagnóstico de sepse de acordo com o Consenso Internacional de Sepse Pediátrica¹ ou de pneumonia baseado na presença de febre, tosse e/ou dificuldade respiratória e taquipneia idade-específica em anos conforme recomendações da Organização Mundial de Saúde. Foram excluídas as crianças com cardiopatia congênita hemodinamicamente significativa, deformidades e/ou malformações intratorácicas; comprometimento da função pulmonar, portadores de encefalopatias crônicas ou doenças neuromusculares; imunodeficiência primária ou secundária previamente diagnosticada; parada cardiorrespiratória; anemia falciforme; síndrome nefrótica; imunodepressão induzida por drogas.

A coleta de dados foi realizada no período de agosto de 2012 a setembro de 2013. As variáveis avaliadas foram idade, sexo, síndrome clínica (pneumonia ou sepse), evolução

clínica (alta ou óbito), espécie de bactéria através de hemocultura e de PCR em tempo real, concentração sérica de quimiocinas [regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES), monocina induzida pelo interferon gama (MIG), proteína quimiotática de monócitos (MCP) 1, IL-8, IP10]. Inicialmente, os responsáveis pelas crianças responderam um questionário com as variáveis de interesse do estudo e, em seguida, foi coletada a amostra do sangue periférico para realização de hemocultura, PCR em tempo real e análise de quimiocinas.

Para a detecção do patógeno bacteriano pela hemocultura coletou-se 2 ml de sangue periférico no meio de cultura TSB®. Após coleta, o material foi enviado imediatamente ao laboratório do IMIP para incubação em estufa através da técnica BactAlert, com temperatura de 35-37°C e observado por período variável de 2 a 5 dias. As amostras positivas foram submetidas a repiques em placa de ágar-sangue e as colônias isoladas. Para a detecção de patógenos (*Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*) pela técnica de PCR em tempo real, inicialmente foi realizada a extração de DNA das amostras de sangue periférico, utilizando *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, USA), conforme instrução do fabricante. Após a extração do DNA bacteriano foi realizado a sua quantificação utilizando-se nano-espectrofotômetro (NanoVue® - GE Healthcare, USA) e então realizado o PCR em tempo real, utilizando o *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, seguindo as instruções do fabricante no Laboratório de Pesquisa Translacional Prof. C. Anthony Hart no IMIP.

Para determinação da concentração sérica das quimiocinas foram utilizados BD™ CBA, *human chemokine kit* (IL-8, IP-10, MIG, RANTES e MCP-1), conforme instrução do fabricante. A determinação da concentração foi realizada por citometria de fluxo (FACSVERSE®, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). A análise foi realizada no *FCAP Array software* (BD BIOSCIENCES, CA). As concentrações foram expressas em pg/mL.

Na análise descritiva dos dados foram realizadas distribuição de frequência e medidas de tendência central e de dispersão. Na análise estatística, os pacientes foram categorizados em dois grupos, PNM e sepse, para a comparação das medianas dos níveis de quimiocinas através do teste *t* não paramétrico de *Mann-Whitney* pelo programa *GraphPadPrism 5*. Foi adotado o nível de significância de 5%.

Resultados

No estudo foram avaliadas 58 crianças, com mediana de idade de 22 meses, variando de um mês a 156 meses. O sexo masculino foi o mais frequente com 53,4% dos casos. Em relação às síndromes clínicas, 70,7% das crianças foram classificadas como sepse, enquanto que 29,3% delas como PNM. Nenhuma criança da amostra foi a óbito (Tabela 1).

Quanto à identificação do patógeno, a frequência de positividade das hemoculturas foi de 1,9%, correspondendo a uma criança com sepse. A PCR em tempo real identificou 51 (87,9%) crianças com *Streptococcus pneumoniae* e uma criança com *Staphylococcus aureus* (tabela 2).

Em relação à associação das quimiocinas com a gravidade de doença [pneumonia representando a síndrome de resposta inflamatória (SRI) localizada e sepse SRI sistêmica] não se observou associações significativas (figura 1).

DISCUSSÃO

O presente estudo observou uma alta taxa de positividade da PCR em tempo real, sendo o *Streptococcus pneumoniae* o patógeno mais frequentemente identificado (87,9%). Em relação às quimiocinas, não se verificou diferença nas concentrações de IL-8, RANTES, MCP1, IP10, MIG entre os grupos de crianças com pneumonia e sepse comunitária.

Na última década a técnica de PCR tem sido aprimorada, aumentando a detecção de patógenos para 65 a 86% em crianças com PNM comunitária. Este método proporciona rapidez no diagnóstico e é capaz de detectar simultaneamente múltiplos patógenos, sem a presença do agente viável⁵. Estudo na Itália envolvendo 803 crianças e recém-nascidos com suspeita de sepse avaliou 1.673 amostras de sangue e verificou que o PCR multiplex apresentou sensibilidade de 85.0% e especificidade de 93.5% comparada com a hemocultura¹¹. Fato que merece destaque no presente estudo foi a alta frequência de pneumococo identificado, diferentemente dos achados na Itália que observou uma frequência de pneumococo de 10,6%¹². No entanto, estudo realizado na Bélgica com 561 crianças hospitalizadas com pneumonia comunitária mostrou uma taxa de detecção de pneumococo de 73,9%, com a combinação de culturas (12,2%) com o PCR em tempo real (61,7%)¹³.

A positividade da hemocultura no presente estudo foi muito baixa (1,9%), semelhante ao estudo realizado na Inglaterra que encontrou uma frequência de positividade de cultura (sangue e LCR) de 2,4%⁶. Esta baixa frequência pode ser explicada pelo uso prévio de antibiótico, que reduz a sensibilidade das culturas. Além disso, vários estudos demonstraram que a taxa de isolamento de organismos patogênicos das hemoculturas aumenta com o volume de sangue coletado, o que representa uma potencial dificuldade em crianças pequenas¹⁴.

Em relação à resposta imune inata durante a infecção, o presente estudo não verificou associação entre níveis séricos de quimiocinas em crianças com sepse versus as com PNM. Outros estudos também foram realizados com a finalidade de se investigar potenciais biomarcadores inflamatórios para diagnóstico e prognóstico^{8, 15}. Em contraste com os nossos achados, estudo de revisão mostrou associação da IL-8 com pior prognóstico e mortalidade⁸.¹⁶ Estudo na Grécia com 195 crianças verificou que a RANTES, quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais, foi maior em crianças com PNM pneumocócica quando comparada com PNM causada por outros patógenos¹⁷. Outra

quimiocina pró-inflamatória descrita como promissor biomarcador para o diagnóstico de infecções virais (rinovírus, vírus respiratório sincicial, hepatite B e C e influenza H5N1) foi a IP-10¹⁸. Estudo observou que a IP-10 foi mais alta em neonatos com sepse e enterocolite necrotizante (ECN), quando comparado aos recém-nascidos com sepse sem ECN¹⁰.

Apesar da importância do presente estudo, algumas limitações precisam ser destacadas. Primeiro, o pequeno tamanho amostral. Segundo, a baixa especificidade dos critérios adotados para sepse, na distinção entre sepse de foco pulmonar e pneumonia tornando os grupos homogêneos. Terceiro, crianças mais graves com choque séptico não foram incluídas no estudo. Além disso, incluímos crianças de até 48 horas de internamento e sabe-se que os níveis mais altos de quimiocinas ocorrem nas primeiras horas da instalação da sepse. Estes fatos podem ter sido o motivo de não termos encontrado diferenças significativas nas concentrações séricas das quimiocinas entre os grupos de crianças com PNM e as com sepse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatric critical care*. 2005; 6: 2-8.
2. Angus DC, Poll TVD, Finfer SR, Vincent JL. Severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine*. 2013; 840-851.
3. Paiva MAS, Reis FJC, Fisher GB, Rozov T. I Consenso Brasileiro sobre Pneumonias. *Pneumonias na criança. Jornal da Pneumologia*. 1998; 24(2): 101-8.
4. Connell TG, Rele M, Moore M, Cowley D, Buttery JP, Curtis N. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in children's hospital pediatrics. *Pediatrics*. 2007; 119 (5): 891-896.
5. Chiappini E, Venturini E, Galli L, Novelli V, Martino MD. Diagnostic features of community-acquired pneumonia in children. 2013; 102: 17-24.
6. Doare KL, Nichols AL, Payne H, Wells R, Navidnia S, Appleby G, Calton E, Sharland M, Ladhani SN. Very low rates of culture-confirmed invasive bacterial infections in a prospective 3-year population-based surveillance in Southwest London. *Arch Dis Child*. 2014; 1-6.
7. Nadel S. Severe pediatric sepsis. *Expert reviews*. 2012; 10(2), 111-114.
8. Rivers EP, Jaehne AK, Nguyen HB, Papamatheakis DG, Singer D, Yang JJ, Brown S, Klausner H. Early Biomarker activity in severe sepsis and septic shock and a contemporary review of immunotherapy trials: not a time to give up, but to give it earlier. 2012; 127-136.
9. Zhao YX, Nilsson IM, Tarkowski A. The dual role of interferon-gamma in experimental *Staphylococcus aureus* septicaemia versus arthritis. *Immunology*. 1998; 93(1):80-5.
10. Ng PC, Li K, Chui KM et al. IP-10 is an early diagnostic marker for identification of late-onset bacterial infection in preterm infants. *Pediatr. Res*. 2007; 61(1), 93-98.
11. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, Menichella D. Multiplex PCR Allows Rapid and Accurate Diagnosis of Bloodstream Infections in Newborns and Children with Suspected sepsis . 2011; 49(6):2252-2258.
12. Resti M, Moriondo M, Cortimiglia M, Indolfi G, Canessa C, Becciolini L, Bartolini E, Benedictis FMD, Martino MD, Azzri C. Community-Acquired bacteremic pneumococcal pneumonia in children: Diagnosis and serotyping by Real-time Polymerase Chain Reaction using blood samples. 2010; 1042-1049.
13. Schutter ID, Vergison A, Tuerlinckx D, Raes M, Smet J, Smeesters PR, Verhaegen J, Mascart F, Surmont F, Malfroot A. Pneumococcal aetiology and serotype distribution in paediatric community-acquired pneumonia. *Plus one*. 2014; 9: 1-9
14. Golsalves WI, Cornish N, Moore M, Chen A, Varman M. Effects of volume and site of blood draw on blood culture results. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 3482-3485.
15. Riedel S, Carroll KC. Laboratory detection of sepsis: biomarkers and molecular approaches. *Clin Lab med*. 2013; 413-437.
16. Nelson GE, Mave V, Gupta A. Biomarkers for sepsis: a review with special attention to India. *Biomed Research International*. 2014; 1-11.
17. Doudouliaki T, Haidopoulou K, Pappa S, Sakellaropoulou A, Tsakiridis P, Emboriadou M, Hatzistilianou M. Association of the RANTES gene promoter polymorphisms -28C/G and -403G/A with pneumonia in Greek children. *International Journal immunopathology pharmacology*. 2013; 26(3) : 681-690.
18. Chan T, Gu F. Early diagnosis of sepsis using serum biomarkers. *Expert review of molecular diagnostics*. 2011; 11(5):487-96.

Tabelas e Figura

Tabela. 1 Característica de 58 crianças com pneumonia e sepse internadas no Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP) de 2012 a 2013.

Variáveis	
Idade meses (Med*, amplitude)	22; 1 a 156
Sexo (N,%)	
Feminino	27; 46,5
Masculino	31; 53,4
Síndrome clínica (N, %)	
Pneumonia	17; 29,3%
Sepse	41; 70,7%
Mortalidade (N,%)	0

*Med: mediana

Tabela. 2 Identificação de patógenos por culturas e reação em cadeia da polimerase em 58 crianças com infecção bacteriana.

	Patógenos bacterianos					
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella</i> SP	
	N	%	N	%	N	%
PCR	51	87.9	1	1,7	-	
Cultura	0		0		1	1,7
Total	51	87.9	1	1,7	1	1,7

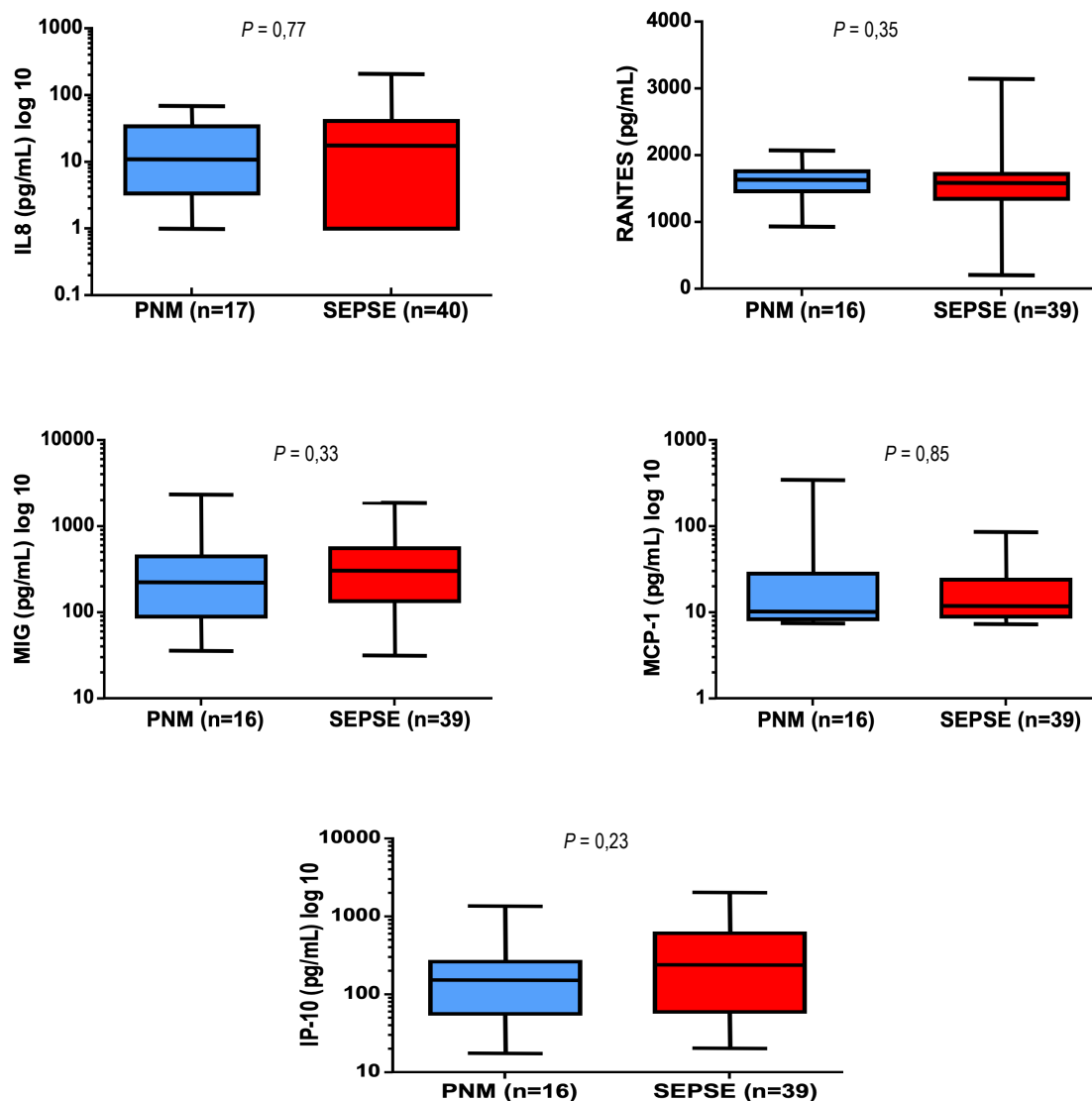


Figura 1. Concentração de quimiocinas no sangue de crianças com pneumonia e sepse.

* IL: interleucina; RANTES: regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais; MIG: monocina induzida pelo interferon gama; MCP: proteína quimiotática de monócitos; IP-10: proteína 10 induzida pelo interferon. Gráficos box plot com mediana e intervalo interquartil. Utilizado o teste de Mann-Whitney.