



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AIVE OLIVA SANTOS

**IL-1B URINÁRIO COMO BIOMARCADOR PREDITIVO DE SEPSE
NEONATAL EM PRÉ-TERMOS**

UBERLÂNDIA - MG
2017

AIVE OLIVA SANTOS

**IL-1B URINÁRIO COMO BIOMARCADOR PREDITIVO DE SEPSE
NEONATAL EM PRÉ-TERMOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da saúde

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237i
2017 Santos, Aive Oliva, 1976
IL-1 β urinário como biomarcador preditivo de sepse neonatal em
pré-termos / Aive Oliva Santos. - 2017.
74 p. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2017.13>
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Citocinas - Teses. 3. Sepse Neonatal
- Teses. 4. Recém-nascidos - Peso baixo - Teses. I. Goulart, Luiz
Ricardo. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

AIVE OLIVA SANTOS

**IL-1B URINÁRIO COMO BIOMARCADOR PREDITIVO DE SEPSE NEONATAL
EM PRÉ-TERMOS**

Uberlândia, 28 de agosto de 2017.

Resultado: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
(orientador)

Universidade Federal de Uberlândia- Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

Prof. Dr. David Nascimento Silva (Titular)
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^ª. Dr^a. Paula de Souza Santos (Titular)
Universidade Federal de Uberlândia

Prof^ª. Dr^a. Fabiana de Almeida Araújo Santos (Suplente)
Universidade Presidente Antônio Carlos



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 041/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa 3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Aplicações da nanobiotecnologia em doenças infecciosas, parasitárias e crônico-degenerativas.

Discente: Alve Oliva Santos – Matrícula nº 11512CSD001

Título do Trabalho: "IL-1 β urinário como biomarcador preditivo de sepse neonatal em pré-termos". Às 13:30 horas do dia 28 de agosto do ano de 2017, no anfiteatro do Bloco BB - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: David Nascimento Silva Teixeira (UFTM), Paula de Souza Santos (UFU) e Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU) – orientador da discente. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata (X) aprovado () reprovado. Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17:30 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho _____

Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira _____

Profa. Dra. Paula de Souza Santos _____

DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo e minha filha Valentina que sempre me estimularam a
prosseguir...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, Senhor da minha vida, pela oportunidade de crescer como ser humano e profissionalmente, que **“todos considerem e juntamente entendam que a mão do Senhor fez isso”**. *Isaías 41:20*.

Ao meu esposo José Carlos Jacinto, muito obrigada por ser o maior incentivador motivador, parceiro e amigo em todos os momentos. Foram madrugadas inteiras, e você estava ali renunciando seu cansaço. Obrigada por compreender essa fase e estar sempre ao meu lado. “EU TE AMO MUITO”!

A minha maravilhosa filha Valentina, que soube entender a minha ausência nos momentos em que queria atenção. Eu te amo! É meu bem mais precioso, presente de Deus, minha inspiração para prosseguir!

A minha sogra Jorizete e minha cunhada Eliane, que me deram suporte para que eu tivesse tempo para dedicar-me. Obrigada pelas orações, palavras de encorajamento e fé em Deus.

Aos meus pais Arlete e Luiz Carlos, que sempre estiveram na arquibancada da vida para me aplaudir. Os meus irmãos Aline, Júnior, Danilo e Andréa que torcem para meu sucesso!

Ao meu estimado orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pelo suporte, empenho, disposição, ensinamentos, paciência e palavras de encorajamento. “Vai dar certo Aive”! Profissional admirável pela sua competência!

A profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah, instrumento de Deus para tornar esse sonho possível, profissional espetacular e ser humano brilhante!

A admirável profissional e ser humano Dra. Roberta Rezende Rosa, obrigada pela força, apoio, dedicação, ensinamentos, desprendimento e disponibilidade em ajudar-me. Tenho certeza que Deus a retribuirá. Nasceu uma amizade sincera!

A querida Dra. Aline Teodoro de Paula pelos ensinamentos, apoio, dedicação e pelas palavras de estímulo e encorajamento. “Calma Aive, vai dar certo”!

A Patrícia Terra pela disposição, apoio e treinamentos na bancada. Que Deus lhe retribua de maneira sobrenatural.

À toda equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia fizeram parte desta conquista.

Aos membros da banca de qualificação Profa. Dra. Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo, Dra. Natássia pelas ricas contribuições para este estudo.

Aos membros da banca examinadora da dissertação por terem gentilmente aceitado participar da avaliação deste estudo, Prof. Dr. David Nascimento Silva, Profa. Dra. Paula de Souza Santos e Dra. Fabiana de Almeida Araújo Santos.

À Universidade Federal de Uberlândia, em especial à Pós-Graduação em Ciências da Saúde por contribuir com a minha formação.

Às agências brasileiras de financiamento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, por fornecer apoio financeiro ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranótics e Nanobiotecnologia - INCT-TeraNano (CNPq / CAPES / FAPEMIG, números de Subsídios CNPq-465669 / 2014-0 E FAPEMIG-CBB-APQ-03613-17).

RESUMO

Introdução: A sepse em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso (RNPTMBP) pode se tornar fatal devido ao diagnóstico difícil e tardio. Nossa hipótese é que níveis periféricos de citocinas pró e anti-inflamatórias no sangue podem ser espelhados na urina devido à filtração renal para remoção de moléculas em excesso. **Objetivo** do presente trabalho foi buscar biomarcadores urinários para detecção precoce de sepse em RNPTMBP, principalmente por ser uma técnica não invasiva. **Material e método:** Foram coletadas para análise urina desses pacientes com idade gestacional menor que 34 semanas e peso ao nascer menor que 1,5 kg. Realizou-se análise comparativa de um painel de citocinas em neonatos com quadro de sepse confirmada por cultura (caso) e sem sintomas de sepse (controle). As variáveis com diferença estatística entre os grupos foram: sexo, síndrome do desconforto respiratório, nutrição parenteral em dias, e desfecho (alta e óbito). **Resultados:** Evidenciou-se que o grupo caso apresentou predominância do sexo masculino, síndrome do desconforto respiratório e receberam nutrição parenteral. Entre os 27 biomarcadores analisados na urina, 06 apresentaram diferença significativa estatisticamente (*IL-1 β* , *IL-1 α* , *IL-2*, *IL-17 α* , *MCP-1*, *MIP-1 β*). **Conclusão:** A citocina *IL-1 β* mostrou ser um importante biomarcador preditivo para detecção precoce de sepse em RNPTMBP, constituindo método de coleta utilizado menos invasivo e rápido.

Palavras-chave: *sepse neonatal, diagnóstico, citocinas.*

ABSTRACT

Purpose: Sepsis in preterm neonates with very low birth weight (VLBW) may be fatal due to difficult and late diagnosis. Our hypothesis is that excess levels of pro-inflammatory cytokines in the blood are secreted in the urine due to renal filtration to remove their systemic overload, besides being a noninvasive sampling and easy to obtain. Our aim was to investigate urinary biomarkers for early detection of sepsis in preterm neonates. **Methods:** Urine of patients with gestational age less than 34 weeks and birth weight below 1.5 kg were collected for comparative analysis between culture-confirmed sepsis (case) and no sepsis symptoms(control) using a cytokine panel of 27 markers. **Results:** Variables with statistical difference between groups were: gender, respiratory distress syndrome, parenteral nutrition and outcome (discharge and death). Among the 27 urinary biomarkers, six showed significant differences (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-17A, MCP-1, MIP-1 β); however, IL-1 β showed to be the most important predictive urinary biomarker for early detection of sepsis in preterm neonates, with an accuracy of 85% and a relative risk of 7.3 when higher levels are detected above the cutoff value of 1.082 pg/mL. **Conclusion:** The cytokine IL-1 β was shown to be an important predictive biomarker for the early detection of sepsis in neonatal preterm of very low birth weight constituting a less invasive and rapid collection method.

Keywords: preterm neonatal sepsis, cytokines, non-invasive.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Comparison of cytokines and chemokines levels between the control (n = 13) and sepsis (n = 13) groups. Analyzes used the Mann-Whitney test, considering $p < 0.05$ as statistically significant	53
Fig. 2 – ROC curve of significant cytokines and chemokines levels between the control (n = 13) and sepsis (n = 13) groups	54

LISTA DE TABELAS

Table 1. Maternal, gestational and preterm neonates demographics data	50
Table 2. Values of retative risk ratio, sensitivity, specificity and ROC curve area for the different predivite diagnostic biomarkers	51
Table 3. Correlation between significative cytokines and chemokines with clinical data	52

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CNTF - Fator Neurotrófico ciliar

E. coli - Escherichia coli

GBS - Streptococcus do Grupo B

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

IFN – Interferão

IL – Interleucina

LIF - Fator Inibidor de Leucemia

NEC - Enterocolite Necrotizante

NP – Nutrição Parenteral

OMS - Organização Mundial de Saúde

OSM - Oncostatina M

PCR - Proteína C Reativa

RNTPMBP – Recém-nascido pré termo de muito baixo peso

SDR – Síndrome do Desconforto Respiratório

SIRS - Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TGF - Factor de Crescimento Transformante

UTIN – Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DE LITERATURA	15
Epidemiologia da Sepsis	15
Fisiopatologia da Sepsis	17
Funções das Citocinas na Sepsis	17
IL-1 β	18
IL1-ra	19
IL-2	19
IL-6	20
IL-17a	20
MCP-1	21
TNF- α	21
Classificação da Sepsis	22
Fatores de Risco para sepsis	23
Sinais e Sintomas clínicos	25
Microorganismos presentes na sepsis	25
Diagnóstico da Sepsis	26
Tratamento	28
OBJETIVOS	30
Artigo submetido para publicação no periódico “Intensive Medicine Care”	
Título: Urinary IL-1 β as a predictive biomarker of preterm neonatal sepsis	31
REFERÊNCIAS – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	55
APÊNDICES	
Apêndice A. Termo De Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE	62
Apêndice B – Questionário utilizado na coleta de dados	64
ANEXOS	
ANEXO A – Aprovação do parecer pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia	68
ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo	69

INTRODUÇÃO

A sepse neonatal é um evento associado a infecções bacterianas, virais e fúngicas. (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017). Essa condição está associada com alterações hemodinâmicas e intensa resposta inflamatória que acarretam manifestações clínicas como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017; FATTAH et al., 2017). Microrganismos de cepa virulenta, principalmente as bactérias, podem atingir a corrente sanguínea e causar infecção disseminada que, geralmente, vem acompanhada de uma resposta imune não efetiva no combate a esses microrganismos (CARVALHO et al., 2013; CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017).

Atualmente, a sepse é uma importante causa de mortalidade e morbidade em neonatos. As infecções neonatais são responsáveis por aproximadamente, 23,4% das mortes registradas em neonatos em todo mundo (CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017; CHAN. et al., 2013). Em países em desenvolvimento a sepse é responsável pela morte de 30–40% dos neonatos (MEIRELES et al., 2011). O diagnóstico baseado em sinais clínicos do recém-nascido não é específico e assertivo, uma vez que os sintomas de infecções neonatais podem ser atribuídos a várias outras doenças. A cultura de sangue para detecção de bactérias é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de sepse neonatal, entretanto esse teste pode levar de 48 a 72 horas para que os resultados sejam liberados (FATTAH. et al., 2017). Além disso, muitos resultados são inconclusivos. Dessa forma, novas técnicas utilizadas como preditivas de sepse neonatal são de grande importância para o diagnóstico precoce. Para isso, tem-se observado a importância de alguns biomarcadores presentes no sangue e na urina que estão associados com quadro de sepse.

Uma das formas de realizar um diagnóstico assertivo de sepse neonatal é a detecção de componentes anti-inflamatório e pró-inflamatórios, como citocinas, no sangue de recém-nascidos (NAKSTAD; SONERUD; SOLEVAG, 2016). A presença desses marcadores inflamatórios pode prever quadro de sepse logo após o nascimento e antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos, representando uma ferramenta de diagnóstico rápido e eficiente (NAKSTAD; SONERUD; SOLEVAG, 2016). As citocinas pró-inflamatórias são proteínas solúveis que são produzidas e secretadas, principalmente por monócitos e macrófagos imediatamente após a invasão bacteriana (CECCON et al., 2006). O hospedeiro, para fazer frente ao processo infeccioso, também produz as citocinas anti-inflamatórias, como *IL-4*, *IL-10*, que neutralizariam os efeitos das pró-inflamatórias, de maneira a ocorrer uma homeostase entre estes mediadores e finalização com sucesso do processo infeccioso (CECCON et al., 2006).

Um diagnóstico precoce da sepse neonatal é realizado nas primeiras 24 horas após o nascimento e permite intervenção rápida e o uso de medicamentos apropriados que contenham o processo infeccioso sistêmico e isso é crucial para a diminuição da mortalidade dos recém-nascidos (FATTAH. et al., 2017).

Assim, um dos grandes esforços na redução da taxa de mortalidade neonatal é focada na procura de novos marcadores bioquímicos que sejam capazes de prever precocemente o risco de desenvolvimento de doenças agudas neonatais e o monitoramento do curso da doença no recém-nascido grave (MUSSAP. et al, 2012).

Diante do exposto, é de extrema importância determinar biomarcadores preditivos precoces de sepse que auxiliem no diagnóstico desse quadro, o mais rapidamente possível após nascimento (SHARMA. et al., 2017).

REVISÃO DE LITERATURA

Epidemiologia da Seps

Em todo o mundo, a infecção é a maior causa de morte neonatal. Nos países desenvolvidos, a incidência de seps bacteriana neonatal varia de 1 a 4 casos por 1000 nascidos vivos (KLIEGMAN, 2013). A seps neonatal é definida como uma síndrome clínica e sistêmica nos primeiros 28 dias de vida (HEDEGAARD; WISBORG; HVAS, 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2010, 3,7 milhões de recém-nascidos morreram antes de completar 28 dias de idade e nos Estados Unidos 37% foram devido a causas infecciosas (MACHADO et al., 2014). No Brasil, 60% das mortes em menores de 1 ano de idade ocorrem no período neonatal (ANVISA, 2011). Cerca de 75% das mortes neonatais ocorrem na primeira semana de vida e cerca de 33% nas primeiras 24hs de vida (MUSSAP et al., 2012). As infecções neonatais são responsáveis por, aproximadamente, 23,4% das mortes registradas em neonatos todo ano no mundo (CHAN et al., 2013; CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017). Embora a taxa de mortalidade de crianças (1 a 5 anos) em todo o mundo tenha diminuído 3,4% ao ano de 1990 a 2012, a mortalidade neonatal nesse período diminuiu apenas 2% ao ano (LAWN et al., 2014). Além da prematuridade, seps (37%) e pneumonia (5%) continuam a ser os principais causas de mortes no período neonatal (OZA et al., 2015; PANIGRAHI et al., 2017).

Para Boghossian e colaboradores (2013) o baixo peso ao nascer e o parto prematuro predispõem o recém-nascido à seps. Nos Estados Unidos um quarto de recém-nascidos muito baixo peso ao nascer (menos de 1.500 g) possuem seps com cultura positiva. Os

recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer, representam a grande população de risco e alta mortalidade.

Os neonatos são altamente suscetíveis a doenças infecciosas porque seus sistemas imunitários são imaturos e pouco desenvolvidos (WYNN et al., 2010). Imunidade inata, que constitui a primeira linha de defesa contra infecções, é comprometida em neonatos e resulta na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, particularmente a interleucina-1, fator de necrose tumoral, interferon e interleucina-12. Apresentação de antígeno neonatal às células, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, exibem déficits no reconhecimento de patógenos, função fagocítica e função bactericida (GANATRA et al., 2010).

Recém-nascidos pré-termos têm uma incidência significativamente maior de sepse neonatal em comparação com o resto da população, representando 5,14 casos por 1000 nascimentos com uma taxa de letalidade de 24,4%. As taxas de sepse são mais comuns em recém-nascidos pré-termos de baixo peso ao nascer. Aproximadamente 21% dos recém-nascidos pré-termos pesando menos de 1500g, desenvolveram um ou mais episódios de sepse confirmada por cultura de sangue (CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013).

O período perinatal, é perigoso com múltiplas oportunidades para exposições a organismos virulentos. Situações potenciais incluem o útero, o canal de parto, o período neonatal, a unidade de cuidados, diversos procedimentos e dispositivos invasivos, cuidados de saúde, familiares, visitantes, e a comunidade. Além disso, em relação ao modo de transmissão de infecção, os neonatos são relativamente imunocomprometidos. A função imune inata prejudicada dos recém-nascidos pré-termos predispõe-os ao risco maior de infecções, porque a resposta imune fetal começa em torno de 24 semanas de idade e o desenvolvimento ocorre até o termo. Recém-nascidos prematuros não se beneficiam de

desenvolvimento do sistema imune, tornando-os mais suscetíveis a infecção por micro-organismos (TISSIERES et al., 2012). A hospitalização prolongada, procedimentos invasivos e dispositivos, falta de alimentação enteral e a utilização de antibióticos de amplo espectro, devido ao aumento do risco de infecção com agentes patogênicos multi-resistentes, aumentam o risco para esses recém-nascidos já que são vulneráveis à infecções (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

Fisiopatologia da Seps

O desencadeamento de resposta do hospedeiro à presença de um agente agressor infeccioso constitui um mecanismo básico de defesa. Dentro do contexto dessa resposta, ocorrem fenômenos inflamatórios, que incluem ativação de citocinas, produção de óxido nítrico, radicais livres de oxigênio e expressão de moléculas de adesão no endotélio. Há também alterações importantes dos processos de coagulação e fibrinólise. Deve-se entender se que, todas essas ações têm o intuito fisiológico de combater a agressão infecciosa e restringir o agente ao local onde ele se encontra. Ao mesmo tempo, o organismo regula essa resposta com o desencadeamento de resposta anti-inflamatória. O equilíbrio entre essas duas respostas é fundamental para que o paciente se recupere e o desequilíbrio entre essas duas forças, inflamatória e anti-inflamatória, é responsável pela geração de fenômenos que culminam em disfunções orgânicas (HOTCHKISS et al., 2003).

Funções das Citocinas na Seps

As citocinas são reguladoras da resposta imune à infecção e desempenham um papel fundamental na regulação da inflamação e do trauma. Existem dois tipos de citocinas. As citocinas pró-inflamatórias que estimulam a inflamação sistêmica, enquanto, as citocinas

anti-inflamatórias que inibem a inflamação e aumentam a cicatrização. As principais citocinas pró-inflamatórias que regulam as respostas precoces incluem interleucina-1a (IL-1a), IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Outros mediadores pró-inflamatórios incluem membros da família IL-20, fator inibidor de leucemia (LIF), interferon- γ (IFN- γ), oncostatina M (OSM), fator neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crescimento transformante- β (TGF- β), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, IL-33 e uma variedade de outras quimiocinas que atraem células inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias atuam como pirógenos endógenos (IL-1, IL-6, TNF- α), regulam a síntese de mediadores secundários e outras citocinas pró-inflamatórias tanto por macrófagos quanto células mesenquimais, fibroblastos, epiteliais e células endoteliais células e estimulam a produção de proteínas de fase aguda. A imunossupressão do hospedeiro pode ser responsável pela morte tardia em pacientes com sepse (BOOMER et al., 2011; CHAUDHRY et al., 2013).

IL-1 β

A *IL-1 β* é um membro da família de citocinas de interleucina-1. Esta citocina é produzida por macrófagos ativados como uma proproteína, que é processada proteoliticamente à sua forma ativa pela caspase-1. A IL-1 β é um mediador importante da resposta inflamatória e está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação e apoptose. O papel da *IL-1 β* na sepse não foi amplamente estudado. Foi relatado que, após a medição simultânea de 17 citocinas durante os primeiros sete dias após a admissão de pacientes com sepse, a *IL-1 β* apresentou aumentos persistentes naqueles que morreram, sugerindo que a *IL-1 β* pode desempenhar um papel na sepse (MERA et al., 2011; CHAUDHRY et al., 2013). Estudos mostraram o rápido aumento de citocinas

pró-inflamatórias após exposição a antígenos bacterianos, incluindo IL-1 β . Observou-se que a IL-1 β e outras citocinas, como IL-6 e TNF- α , foram aumentadas em neonatos diagnosticados com sepse (SUGITHARINI; PREMA; BERLA THANGAM, 2013). Um estudo realizado com recém-nascidos prematuros com história clínica de sepse precoce, também encontrou aumento das concentrações de IL-1 β e TNF- α , mas a IL-1 β apresentou o aumento mais marcante (BASU et al., 2015).

IL1-ra

Uma proteína de 152 aminoácidos atua como um inibidor específico para os outros dois membros funcionais da família IL-1, IL-1 α e IL-1 β . A IL-1Ra compete com IL-1 α e IL-1 β na ligação ao receptor de IL-1 e, assim, bloqueia a função de IL-1 α e IL-1 β . A ligação de IL-1Ra ao receptor de IL-1 evita a ativação celular por IL-1 α ou IL-1 β (SCHREUDER et al., 1997). Algumas citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13, aumentam a síntese de IL-1Ra, mas também inibem a síntese de IL-1 β (DINARELLO et al., 1997). Estudo de alguns biomarcadores no sangue obtido de 971 pacientes adultos do departamento de emergência demonstrou que a IL-1Ra e proteína c reativa (PCR) poderiam ser usadas para prever sepse grave, choque séptico e morte nos pacientes com suspeita de sepse (SHAPIRO et al., 2009).

IL-2

IL-2 foi descoberta há mais de 30 anos em sobrenadantes de células T ativadas, produzido principalmente pelo CD41 e ativadas por células CD81 T e células NK e NKT (NEDDERMANN et al., 1996). A IL-2 é um regulador de ILCs e atua como um fator de crescimento de células B ainda estimula a síntese de anticorpos e promove proliferação e

diferenciação de células *NK* para aumentar suas funções citolíticas (CHAUDHRY et al., 2013).

IL-6

Estudos descreveram IL-6 e TNF- α como marcadores de sepse neonatal por apresentarem alta sensibilidade e especificidade. (HUANG et al., 2009; FAN; YU, 2012; SHARMA et al., 2017; FATTAH et. al., 2017). Para outros autores a IL-6 não pode ser considerado um marcador confiável nos estágios posteriores da doença por apresentar meia-vida curta (NG et al., 1997; NG et al., 2004; BHARTIYA, 2000; BOSKABADI et. al., 2013). Mishra e outros (2006) verificou a presença da IL1-1 β juntamente com IL-6 com sensibilidade (89%) no início da infecção em comparação com outros biomarcadores. Para Machado e outros (2014) esta citocina está associada com a severidade da sepse.

IL-17A

IL-17A é uma citocina secretada principalmente por um subconjunto distinto e recém-caracterizado de células T auxiliares e células Th17A. Estas células são consideradas importantes quando os microorganismos não são eliminados pela resposta mediada por Th1 ou Th2. Intercede a resposta inflamatória desencadeando a produção de muitas outras citocinas, como IL-1 β , IL-6, TNF e orquestra a resposta de inata e células imunes adaptativas (WEAVER et al., 2007). O papel da IL-17A na sepse é controverso. Vários estudos sugeriram que a IL-17A é crucial para a proteção contra a infecção por candida, enquanto que outros estudos relataram que a IL-17A pode contribuir para a patologia inflamatória e piora da doença fúngica. A IL-17A mostrou que não tem uma contribuição importante para a patologia inflamatória levando a insuficiência orgânica na sepse fúngica, sugerindo que IL-17A é

bastante protetora na defesa do hospedeiro antifúngico (VAN DE VEERDONK et al., 2010). Também foi relatado que a IL-17A pode participar da proteção do hospedeiro durante a sepse polimicrobiana (FREITAS et al., 2009).

MCP-1

Um estudo de Narasimhulu e outros (2013), com biomarcadores urinários, mostrou que a MCP-1 pode ser útil na avaliação precoce de recém-nascidos com risco de sepse associada aos métodos atuais de avaliação da sepse. Essas citocinas pró-inflamatórias são aumentadas na resposta inflamatória infecciosa do recém-nascido. Um estudo realizado por Sugitharini e colaboradores (2013) com 118 recém-nascidos utilizando sangue periférico, analisou os níveis de alguns biomarcadores entre eles a MCP 1 e descobriram que eles estavam aumentados em neoantos sépticos.

TNF- α

TNF- α tornou-se a citocina pró-inflamatória mais bem estudada na sepse (CHAUDHRY et al., 2013). É produzida pelas células fagocíticas e apresentam um rápido aumento, de 2 a 4 horas, após o início do processo infeccioso (FAN; YU, 2012). Estudos demonstraram aumento significativo na produção de TNF- α em recém-nascidos com sepse (HUANG et al., 2009). No início da sepse, reações pró-inflamatórias induzidas pelo TNF- α são comuns, por outro lado, a expressão de TNF- α diminui rapidamente nos últimos estágios da sepse (KUBO et al., 2015). A TNF- α desempenha um papel importante no hospedeiro e defesa contra agentes patogênicos virais, bacterianos, fungicos e parasitários (AKDIS et al., 2016).

Classificação da Seps

Tradicionalmente, divide-se a seps neonatal em precoce e tardia. No Brasil, segundo as orientações determinadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), considera-se seps precoce aquela que ocorre até 48 horas após o nascimento e tardia aquela que ocorre após esse período, definição também adotada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (BARBOSA et al., 2014).

Para Shane, Sánchez e Stoll (2017) a seps neonatal é classificada de início precoce ou início tardio, dependendo da idade e início do episódio de seps. Manifestações clínicas de início precoce geralmente aparecem dentro das primeiras 72 horas da vida. As infecções de início precoce são adquiridas antes ou durante o parto e geralmente por transmissão vertical da mãe para recém-nascido. A seps de início tardio são infecções presentes após o parto, ou além de 3 a 7 dias de vida, e são atribuídos aos organismos adquiridos a partir de interação com o ambiente hospitalar ou comunidade. Atualmente, a seps é uma importante causa de mortalidade e morbidade de recém-nascidos.

Em adultos, a seps é definida como uma síndrome clínica complexa com múltiplas anormalidades fisiológicas e imunológicas que geralmente é associado infecções com bactérias ou fungos (MACHADO et al., 2014). A patogênese do seps está associada a alterações hemodinâmicas, distúrbios de microcirculação e mudanças celulares que causam desequilíbrio entre o fluxo sanguíneo levando a disfunção de múltiplos órgãos, responsável pela grave e frequentemente forma fatal da doença (CELES et al., 2012).

Como há dificuldades na confirmação do diagnóstico de seps neonatal, o fato levou ao uso de uma variedade de antibióticos com durações variadas, levando ao surgimento de micro-organismos resistentes aos antibióticos (OGUNLESI et al., 2011; VISWANATHAN et al., 2012).

Fatores de Risco para sepse

Dentre os fatores maternos, que caracterizam a sepse precoce, destacam-se trabalho de parto prematuro, ruptura de membranas mais de 18 horas antes do parto, colonização materna por *Streptococcus* do grupo B (GBS) febre materna ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) durante ou imediatamente após o trabalho de parto, procedimentos de medicina fetal nas 72 horas antes do parto, corioamnionite (NAKSTAD; SONERUD; SOLEVAG, 2016).

Os fatores de risco freqüentemente associados à sepse tardia, diagnosticada após 72 horas, é relacionada à assistência à saúde, incluindo prematuridade, devido à imaturidade do sistema imunológico, procedimentos invasivos, ventilação mecânica, nutrição parenteral, uso de antibiótico de largo espectro, cirurgia, longa permanência hospitalar e desrespeito às normas de prevenção de infecção hospitalar (CUNHA et al., 2014).

Um estudo realizado por (GOLDENBERG et al., 2008) demonstrou que as citocinas pró e anti-inflamatórias são aumentadas no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos com síndrome do desconforto respiratório (VARVARIGOU et al., 2012). Este evento foi esperado porque esta síndrome contribui para a inflamação devido à imaturidade estrutural dos pulmões e à deficiência de surfactante, que culminaram em insuficiência pulmonar, atelectasias, hipoxemia grave, hipercapnia e comprometimento do endotélio e integridade epitelial (GOLDENBERG et al., 2008; FERREIRA et al., 2000). Síndrome desconforto respiratório é um dos problemas mais comuns no recém-nascido pré-termo (GOLDENBERG et al., 2008). É causada por uma fraca produção de surfactante pulmonar devido à imaturidade das células epiteliais alveolares do tipo II, causando aumento da tensão superficial alveolar, dificultando a mecânica ventilatória e a hematose. Nos últimos anos melhorou drasticamente a assistência ao recém-nascido pré-termo e o tratamento tornou-se possível, mas continua a ser

uma importante causa de morbidade e mortalidade nesta população (VARVARIGOU et al., 2012).

Os avanços dramáticos na neonatologia melhoraram a sobrevivência em recém-nascidos com peso extremamente baixo. A administração de nutrição parenteral (NP) é uma prática diária na maioria das unidades de cuidados intensivos neonatais (UTIN) (MOYSES et al., 2013). A NP é estabelecida como o padrão de atendimento para recém-nascidos pré-termo, uma vez que estes pacientes têm reservas de nutrientes limitadas (EMBLETON; PANG; COOKE, 2001). Uma preocupação contínua associada ao uso precoce de NP é que os recém-nascidos estão expostos a um período de tempo mais longo, o que aumenta o risco de sepse secundária a um aumento da duração do uso do cateter venoso central e colestase (MOYSES et al., 2013).

Para Xião e colaboradores (2017) são considerados fatores de risco para sepse neonatal, a idade em dias, peso ao nascer, idade gestacional. De acordo com Xião e outros (2017), um fator de risco relevante para sepse é a idade em dias. Para Chen e outros (2015), os recém-nascidos pré-termo são mais propensos a desenvolver sepse devido ao seu baixo peso ao nascer, desenvolvimento imaturo de vários tecidos e órgãos, uso prolongado e excessivo de antibióticos nas UTINs. (CHEN et al., 2015).

Sinais e Sintomas clínicos

Os sinais e sintomas clínicos exibidos pelos lactentes que sofrem de sepse neonatal dependem da idade gestacional e da gravidade da infecção. Em geral, as crianças sépticas são hipotérmicas após o nascimento. Esta condição é um marcador inespecífico da sepse neonatal (SIMONSEN et al., 2014). Os sintomas iniciais da sepse são inespecíficos e exigem um alto grau de especulação para diagnóstico. Os recém-nascidos que apresentam sepse exibem

sintomas, incluindo, hipotermia, letargia, recusa de sugação, má perfusão, hipotonia, ausência de reflexos neonatais, ritmo cardíaco irregular, distúrbios respiratórios e acidose metabólica (SANKAR et al., 2008). Sintomas específicos associados a sepse neonatal inclui abaulamento da fontanela anterior no SNC, má perfusão periférica e hipotensão, intolerância alimentar e enterocolite necrotizante (NEC), hepatomegalia, insuficiência renal aguda, sangramento e abscessos (CHIRICO et al., 2011). Os recém-nascidos pré-termos apresentam bradicardia, cianose, e apnéia como os sintomas iniciais da sepse (LIM et al., 2012).

Microorganismos presentes na sepse

Bactéria encapsulada positiva é um agente patógeno primário para infecções neonatais. *escherichia coli* (*E. coli*) é considerado outro patógeno potente para causar sepse neonatal em termos e recém-nascidos pré-termos (STOLL et al., 2011). A mortalidade neonatal em lactentes com muito baixo peso está associada principalmente a infecções causadas por *Escherichia coli* (*E. coli*) (WESTON et al., 2011). Quase 70% de incidentes de sepse são atribuídos às infecções ocorridas por estreptococos do grupo B (GBS) e *E. coli* (CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017).

Em um estudo realizado por Xião e colaboradores (2017) foi demonstrado que em 192 recém-nascidos com sepse, 84 hemoculturas foram positivas. O microrganismo isolado predominante foi *Streptococcus G +* que representou 60% dos casos. O outro microrganismo isolado foi G-bacilli, que contabilizou os restantes 40% dos casos de sepse. Foram detectadas 34 cepas em pré-termos, 41% foi *Streptococcus pneumoniae* 59% foram G-bacilli. No estudo realizado por Srinivasa e colaboradores (2014) apontou se que as três principais cepas bacterianas que causam sepse neonatal são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus Agalactiae*, que foi consistente com estudos internacionais. Um estudo de Chen

e colaboradores (2015) encontrou 73% de recém-nascidos a termo infectados por *Streptococcus*. O estudo de Xião e outros (2017), descobriu que as bactérias principais em recém-nascidos pré-termos são *streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*.

Diagnóstico da Seps

Ao longo dos anos, o exame mais utilizado para auxiliar na detecção de um processo infeccioso foi o hemograma, sendo avaliados o número total de leucócitos, número de neutrófilos, número de neutrófilos imaturos, a relação de neutrófilos imaturos / neutrófilos totais e número de plaquetas, conforme descritos por Rodwell e colaboradores (1988). Porém os estudos mostram que o hemograma apresenta baixa sensibilidade e, portanto poderia apenas contribuir para a suspeita de seps, sem confirmar ou ser útil na decisão de iniciar ou suspender o antibiótico (TAPPERO et al., 2010).

O diagnóstico precoce, antes que ocorra deterioração clínica, é de particular interesse, uma vez que o tempo para início da terapêutica parece ser de grande importância e representa um dos maiores determinantes da sobrevivência na seps neonatal (MUSSAP et al., 2011). Assim, um dos grandes esforços na redução da taxa de mortalidade neonatal é focado na procura de novos marcadores bioquímicos que sejam capazes de prever precocemente o risco de desenvolvimento de doenças agudas neonatais e o monitoramento do curso da doença no recém-nascido grave (MUSSAP et al., 2013).

A Proteína C reativa (PCR) mostrou um elevado valor preditivo negativo, pelo que a sua utilização tem sido proposta no diagnóstico de seps. No entanto, este teste irá variar com base em fatores, tais como a ruptura prematura das membranas, a utilização de esteróides pré-natal e a idade gestacional, o que pode limitar a sua utilização (CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013). Portanto, no diagnóstico de seps neonatal sugere-se usar uma combinação de

exames complementares, em vez de um único parâmetro. Da mesma forma, os testes clássicos podem apresentar baixa sensibilidade, tem sido proposto o uso de novos marcadores inflamatórios como a procalcitonina, perfis de citocinas e outros para diagnóstico (CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; MUSSAP et al., 2013).

A cultura sanguínea é o "padrão-ouro" no diagnóstico da sepse neonatal, uma vez que confirma a presença de agentes patogênicos no sangue. No entanto, a taxa de positividade deste teste é baixa. O volume recomendado de sangue para uma cultura de sangue em neonatos é de 1 ml. Usando este volume, a sensibilidade deste teste é de apenas 30-40%. Se 3 ml forem utilizados, a sensibilidade aumenta para 70-80%. Infelizmente, na prática, o volume médio é inferior a 0,5 ml, uma vez que é difícil tomar volumes maiores devido ao tamanho, peso do recém nascido e à instabilidade hemodinâmica que pode apresentar como uma complicação do episódio de sepse (ZEA-VERA et al., 2014).

Nesse cenário o uso da urina apresenta-se como uma amostra promissora e com grande potencial de aplicação diagnóstica, especialmente por não ser invasiva e por ter baixo impacto sobre os cuidados dos RNTPMBP em UTIN (NARASIMHULU et al., 2013; SYLVESTER et al., 2014). O papel do rim na remoção plasmática de algumas citocinas pró-inflamatórias após o diagnóstico de sepse é muito importante, pois é responsável pela remoção dessas citocinas do plasma de pacientes sépticos até a diurese. A sobrevivência dos pacientes sépticos parece estar inversamente relacionada com os níveis de citocinas pró-inflamatórias (GRAZIANI et al., 2006). A sepse neonatal continua a ser uma das principais causas de morte, seu prognóstico depende em grande parte de um diagnóstico imediato (AYAZI et al., 2014).

No contexto atual, um biomarcador é definido como qualquer parâmetro mensurável que forneça informações significativas sobre o diagnóstico de sepse neonatal. Um biomarcador ideal para a sepse neonatal não só teria um alto grau de precisão ao reconhecer a presença (ou ausência) de infecção definitiva em uma fase inicial, mas também seria útil para guiar a duração de terapia antibiótica. Dado o risco de adiar o início da antibioticoterapia em recém-nascidos com sepse definida, tal biomarcador deve ser capaz de determinar em um período razoavelmente curto (dentro de algumas horas). Assim, um biomarcador ideal deve prever o início e o período de exposição aos antibióticos de maneira segura (BHANDARI et al., 2014).

Tratamento

A seleção de antibióticos para a terapia empírica depende dos patógenos etiológicos. Usa-se ampicilina e gentamicina para a eliminação de GBS e *E. coli* (STOLL et al., 2011). As infecções por *E. coli* mostram resistência aos antibióticos beta-lactâmicos e aos aminoglicosídeos (CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017).

O uso adequado de antibióticos é importante para salvar vidas e reduzir as complicações. O uso indiscriminado de antibióticos aumentam o risco organismos resistentes. Um estudo olhando para práticas do uso do antibiótico em UTIN, 24% de dias do uso dos antibióticos eram inadequadas. A causa mais comum de uso impróprio foi continuação excessiva de antibióticos, em vez de iniciação imprópria, seguido pela incapacidade para isolar o patógeno (CAMACHO-GONZALES et al., 2013).

Ampicilina e gentamicina continuam a ser os antibióticos preferidos para o tratamento empírico na suspeita de sepse neonatal de início precoce. O aumento de *E. coli*

resistentes à ampicilina em alguns centros têm levado ao uso aumentado de cefalosporinas de terceira geração, como parte do tratamento empírico; no entanto, estudos têm mostrado uma associação potencial com o aumento da mortalidade e o desenvolvimento de organismos multi-resistentes associado com esta prática. Para os recém-nascidos com sepse tardia, vancomicina pode ser considerada especialmente em recém-nascidos de muito baixo peso hospitalizados com risco para enterocolite necrotizante. A duração da terapia baseia-se no processo da doença. Fluconazol e Anfotericina continuam a ser as drogas de escolha para o tratamento antifúngico de candidíase neonatal (CAMACHO-GONZALES et al., 2013).

OBJETIVOS

Geral

Investigar um painel de citocinas na urina de neonatos pré-termos em busca de um biomarcador preditivo de sepse neonatal em recém-nascidos pré-termos de muito baixo peso.

Específicos

- Analisar as características demográficas dos grupos de recém-nascidos pré-termos (sem sepse e com sepse confirmada)
- Comparar as dosagens de 27 citocinas (IL1- β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , FGF basic, Eotaxin, GM-CSF, G-CSF, IP-10, MCP-1/MCAF, PDGF-BB, RANTES, VEGF) na urina de recém-nascidos pré-termos (sem sepse e com sepse confirmada) após 48h de nascimento.
- Analisar possível relação entre as características clínicas e a concentração de cada uma das citocinas.
- Investigar a associação de cada citocina em relação à predição de sepse neonatal.
- Determinar um biomarcador preditivo de sepse na urina de recém-nascidos pré-termos.

Urinary IL-1 β as a predictive biomarker of preterm neonatal sepsis

Artigo submetido para publicação no periódico "Intensive Medicine Care".

De: em.icme.0.555a1c.24c7fc4f@editorialmanager.com <em.icme.0.555a1c.24c7fc4f@editorialmanager.com> em nome de Intensive Care Medicine - Editorial Office (ICME)
<em@editorialmanager.com>

Enviado: segunda-feira, 21 de agosto de 2017 00:38

Para: Aive Oliva Santos

Assunto: ICME-D-17-01167 - Submission Notification to co-author -
[EMID:630a966e3cc32859]

Re: "Urinary IL-1 β as a predictive biomarker of preterm neonatal sepsis"

Submission ID: ICME-D-17-01167

Full author list: Aline Teodoro de Paula, Ph.D; Aive Oliva Santos; Roberta Rezende Rosa; Patrícia Terra Alves; Larissa Prado Maia; Daniela Silva Rodrigues Costa; Lúdia Mayrink; Daniela M. L. M. Ferreira; Camila Piqui Nascimento; Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo; Vânia Olivetti Steffen Abdallah; Luiz Ricardo Goulart

Dear Mrs Santos,

We have received the submission entitled: "Urinary IL-1 β as a predictive biomarker of preterm neonatal sepsis" for possible publication in Intensive Care Medicine, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dra Aline Teodoro de Paula who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Intensive Care Medicine

Urinary IL-1 β as a predictive biomarker of preterm neonatal sepsis

Aive Oliva Santos¹, Roberta Rezende Rosa², Aline Teodoro de Paula², Patrícia Terra Alves², Larissa Prado Maia², Daniela Silva Rodrigues da Costa¹, Lídia Mayrink¹, Daniela M. L. M. Ferreira¹, Camila Piqui Nascimento¹, Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo¹, Vânia Olivetti Steffen Abdallah¹, Luiz Ricardo Goulart².

1. Hospital de Clínicas de Uberlândia, Setor de Neonatologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.
2. Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Corresponding Author:

Luiz R. Goulart, Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Bloco 2E, Sala 248, Uberlândia, MG, Brasil. CEP 38400-902. E-mail: lrgoulart@ufu.br.

Abstract

Purpose: Sepsis in preterm neonates with very low birth weight (VLBW) may be fatal due to difficult and late diagnosis. Our hypothesis is that excess levels of pro-inflammatory cytokines in the blood are secreted in the urine due to renal filtration to remove their systemic overload, besides being a noninvasive sampling and easy to obtain. Our aim was to investigate urinary biomarkers for early detection of sepsis in preterm neonates.

Methods: Urine of patients with gestational age less than 34 weeks and birth weight below 1.5 kg were collected for comparative analysis between culture-confirmed sepsis (case) and no sepsis symptoms (control) using a cytokine panel of 27 markers.

Results: Variables with statistical difference between groups were: gender, respiratory distress syndrome, parenteral nutrition and outcome (discharge and death). Among the 27 urinary biomarkers, six showed significant differences (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-17A, MCP-1, MIP-1 β); however, IL-1 β showed to be the most important predictive urinary biomarker for early detection of sepsis in preterm neonates, with an accuracy of 85% and a relative risk of 7.3 when higher levels are detected above the cutoff value of 1.082 pg/mL.

Conclusion: IL-1 β may play an important role as a predictive biomarker in the neonatal sepsis onset.

Keywords: preterm neonatal sepsis, cytokines, non-invasive.

Introduction

Neonatal sepsis is an event associated with bacterial, viral and fungal infections that can affect neonates [1]. This condition is associated with hemodynamic changes and intense inflammatory response that lead to clinical manifestations such as systemic inflammatory response syndrome [2]. Virulent strain microorganisms, mainly bacteria, can reach the bloodstream and cause disseminated infection, which is usually followed up by a non-effective immune response in the control of these microorganisms [3,4].

The classification of neonatal sepsis can be defined as early onset or late onset, depending on the age and onset of the sepsis episode. Clinical manifestations of early onset usually appear within the first 72 hours of life. Late onset sepsis are infections present after birth beyond 3 to 7 days of life [1]. Currently, sepsis is an important cause of neonatal mortality and morbidity. Neonatal infections account for approximately 23.4% of deaths worldwide [4, 5]. Thus, it is extremely important to determine early predictive biomarkers of sepsis that will help in the diagnosis of this condition as soon as possible after birth[6]. The early diagnosis of neonatal sepsis is performed within the first 24 hours after birth, allowing rapid intervention and the use of appropriate therapy to contain systemic infection, and this is crucial for the reduction of neonatal mortality [2].

Diagnosis based on clinical signs of the newborn is not specific and assertive, since the symptoms of neonatal infections can be attributed to several other diseases. Blood culture for bacterial detection is considered the gold standard for the diagnosis of neonatal sepsis, however this test may take from 48 to 72 hours for results to be released [2]. In addition, many results are inconclusive. Thus, new techniques used as predictors of neonatal sepsis are of great importance for early diagnosis. To this end, it has been observed the importance of some biomarkers present in blood and urine that are associated with sepsis.

One of the ways to perform an assertive diagnosis of neonatal sepsis is the detection of anti-inflammatory and pro-inflammatory components, such as cytokines, in the blood of newborns [7]. The presence of these inflammatory biomarkers can predict sepsis soon after birth and even before clinical symptoms appear, representing a rapid and efficient diagnostic tool [7]. Cytokines are regulators of the immune response to infection and play a key role in regulating inflammation and trauma. Pro-inflammatory cytokines stimulate systematic inflammation, whereas anti-inflammatory cytokines inhibit inflammation and enhance healing [8].

It is important to emphasize that the role of kidney in plasma removal of some pro-inflammatory cytokines from the peripheral blood in sepsis is very important, since it is responsible for the removal of these molecules from the plasma of septic patients until the diuresis is preserved. The survival of septic patients appears to be inversely related to levels of plasma pro-inflammatory cytokines [9]. In this context, we hypothesized that inflammatory urinary markers should be increased in the preterm neonates, which may be correlated with the development of sepsis.

The use of urine presents as a promising sample with great potential for diagnostic application, especially since it is not invasive and because it has a low impact on Neonatal Intensive Care Unit (NICUs) [10–13]. Moreover, our hypothesis that inflammatory urinary markers should be increased in these patients should be reflected by systemic inflammation, since the removal of pro-inflammatory cytokines from the plasma should be evidenced by high levels in urine of preterm neonates with confirmed sepsis. Thus, the objective of the present study was to demonstrate whether cytokines could be used as predictors of neonatal sepsis in preterm newborns.

Materials and methods

Sampling and type of study

An observational, prospective, case-control study was carried out at the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia (UFU-HC), in the state of Minas Gerais, Brazil, after approval by the Ethics Committee in (CEP) no. 974.356, in the period from September 2015 to April 2016. The informed consent form was obtained from the parents for all the preterm neonates, whose accepted to participate in the study. Patients who were born with less than 34 weeks of gestation, weighing less than 1.500 g were selected.

A total of 26 preterm neonates were included in the study, half of this had confirmed sepsis, considered a case group (n = 13) and the others had no sepsis, considered a control group (n = 13). The maternal demographic data were maternal age, gestational age, type of delivery, history of abortion, antenatal steroid, chorioamnionitis, rupture of membranes and hypertension and diabetes. The preterm neonate demographic data were weight, gender, apgar 1 st and 5 th minute scores, resuscitation in the delivery room, continuous positive airway pressure (CPAP) in the delivery room, duration of hospitalization, respiratory distress syndrome, use of surfactant, use of corticosteroid, mechanical ventilation, Score for Neonatal Acute Physiology - Perinatal Extension (SNAPPE), type of sepsis, parenteral nutrition and main outcome (discharge or death). It was not included newborns who presented congenital malformations. Urine samples were obtained on the second day of life using a urine collector for newborns. The urine samples were transferred to 1.5 mL microtubes and immediately centrifuged (3800 rpm, 5 minutes, room temperature). The supernatant was collected and stored at -80° C until analysis.

Analysis of a panel of cytokines and chemokines

Cytokines and chemokines were quantified using the urine of the preterm neonates as a sample by a multiplex system in a Bio Plex Mafpix (Bio-Rad) analyzer, using the Bio-plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay Kit. The following cytokines and chemokines were analyzed: interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-1ra (IL-1ra), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-7 (IL-7), interleukin-8 (IL-8), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12p70), interleukin-13 (IL-13), interleukin-15 (IL-15), interleukin-17A (IL-17A), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β), fibroblast growth factor (FGF basic), eotaxin, colony stimulating factor of granulocytes and macrophages (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), CXCL10 motif chemokine (IP-10), chemotactic protein and monocyte activation factor (MCP-1/MCAF), activation factor-regulated BB platelet-derived growth factor (PDGF-BB), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and vascular endothelial growth factor (VEGF).

The median fluorescence intensity (MFI) of each sample was measured. Data analysis was performed on the equipment software (Luminex - XPONENT) and cytokines and chemokines concentrations were obtained by comparison with the equivalent standard curve of each cytokine to obtain the value in pg/mL.

Statistical analyzes

Maternal and newborn demographics data were compared using the Mann-Whitney U test and χ^2 test where appropriate. The outliers were identified and excluded for analysis. ROC curve was made for each biomarker. The optimal cut-off value for each marker was then

determined on the graph by minimizing the number of erroneously classified episodes. Diagnostic markers should ideally identify all genuinely infected episodes (100% sensitivity) and at the same time should not classify many uninfected cases (high specificity). A good cut-off value should then be chosen with sensitivity close to 100% and specificity greater than 85% [14]. After determining the cutoff value, a contingency analysis was performed between the groups using Fisher's test to obtain the odds ratio value. The level of significance was 5% for all comparisons. It was performed the correlation between clinical and demographics data and cytokines. All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, California USA).

Results

Maternal, gestational and neonatal demographics data were collected and are presented in Table 1. Among variables, only four presented significant differences between groups: gender, respiratory distress syndrome, parenteral nutrition and outcome (discharge and death). Maternal variables did not present significant differences between groups.

Among the 27 biomarkers (cytokines and chemokines) analyzed in the urine of preterm newborns, six presented significant differences ($p < 0.05$) between groups: IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-17A, MCP-1, MIP-1 β (Table 2; Fig. 1), and their respective ROC curves are presented in Figure 2. Correlation analyses were performed between clinical and demographics data with the most significant cytokines and chemokines (Table 3).

Discussion

This investigation proposed to analyze urinary levels of a 27-plex cytokine panel by a high-precision magnetic capture system in order to search for predictive biomarkers of

neonatal sepsis comparing them between preterm neonates without symptoms of sepsis (control) and confirmed sepsis (case). We demonstrated that several biomarkers may play important roles in sepsis, which are associated with systemic activation in early infection, and may be used as early predictors in neonatal sepsis of preterm newborns. However, IL1- β showed to be highly predictive, and corroborate other evidences in the literature.

Neonatal sepsis is a potentially fatal disease and is an important cause of morbidity and mortality in newborns. The first clinical signs and symptoms of neonatal sepsis are non-specific and generally confused with other common inflammatory diseases. In addition, laboratory tests are not specific, inconclusive and sometimes the blood culture has low sensitivity[15]. Cytokines are small molecules that, despite their short half-life from a few minutes to a few hours, play an important role in the septic response. During sepsis, their plasma concentrations may range from picograms per milliliter to nanograms or even micrograms per milliliter[16].

Due to the severe complications of neonatal sepsis, an ideal biomarker should have a high sensitivity and specificity. From the clinical point of view, a high sensitivity is more important to predict sepsis in neonates[17]. The sensitivity and specificity of a biomarker represent its accuracy [18], and an ideal diagnostic biomarker must present high sensitivity and specificity. Biomarker levels change during the course of a disease, allowing proper monitoring, which may also assist in the efficient treatment. The altered levels may be indicative of protection, severity or disease progression. Immune responses during sepsis can vary among patients and evolve over the course of the illness [19].

In the present study, six biomarkers IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-17A, MIP-1 β , MCP-1 were featured, showing as important sepsis neonate predictors with high sensitivity (>75%)

and declining value of specificity up to 61%. However, IL-1 β presented the best performance with sensitivity of 90% and specificity 80% (Table 2).

IL-1 β is a prototypic proinflammatory interleukin. There are two forms of IL-1: IL-1 α and IL-1 β with almost indistinguishable biological activities. This cytokine was first described as a protein that induced fever and was called leukocyte pyrogen[20]. This cytokine is produced by activated macrophages as a pre-protein, which is proteolytically processed to its active form by caspase-1. IL-1 β is an important mediator of the inflammatory response, and is involved in a variety of cellular activities, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis [21]. Its synthesis can be induced by TNF- α , IFN- α , β and γ , LP, viruses and antigens and acts on the hypothalamus, performing the endogenous pyrogen function.

Studies have shown the rapid increase of proinflammatory cytokines after exposure to bacterial antigens, including IL-1 β . It has been observed that IL-1 β and other cytokines, such as IL-6 and TNF- α were increased in neonates diagnosed for sepsis [12]. However our results do not point IL-6 and TNF- α as significant cytokines.

A study carried out with preterm neonates with a clinical history of early sepsis, also found increased IL-1 β and TNF- α concentrations, but IL-1 β presented the most striking increase [22]. Although they are mentioned, they are known as sepsis biomarkers, they are part of cytokines obtained through invasive techniques, since they are detected in the blood [10]. Thus, a determination of non-invasive biomarkers presents as a promising alternative for the diagnosis of neonatal sepsis. In our study we found an IL-1 β as the predictive biomarker of neonatal sepsis because it had 90% sensitivity and 80% specificity (p 0.0055) in the urine samples obtained on the second day of life.

The investigated samples presented IL-1ra with a sensitivity of 76% and specificity of 83%. IL-1ra has a longer half-life compared to other cytokines, enhancing its utility as a sepsis biomarker [17,23]. In the present study, the sensitivity and specificity values of this cytokine allow us to infer its usefulness as a predictive biomarker of sepsis since this cytokine is considered predictive in the diagnosis of sepsis [23].

In the present study, IL-2 presented a sensitivity of 81% and specificity of 61%, proving to be a good predictive biomarker of neonatal sepsis. IL-2, which was discovered more than 30 years ago in activated T-cell supernatants, is produced primarily by CD41 and activated by CD81 T cells and NK and NKT cells[24]. IL-2R consists of 3 subunits: the ligand-specific chain of IL-2Ra (CD25), the B-chain IL-2Rb CD122, which is also part of the IL-15R complex. All 3 subunits are required for assembly of the high affinity IL-2R. IL-2Ra is rapidly regulated and participates in the formation of a high affinity quaternary complex, which activates multiple signal transduction pathways. IL-2 is essential for the development of Treg cells and IL-2Ra is a marker for the flow Cytometric identification of Treg and regulatory B cells under resting conditions [8,25,26]. IL-2 is a regulator of ILCs and acts as a growth factor of B cells, stimulates the synthesis of antibodies and promotes proliferation and differentiation of NK cells to increase their cytolytic functions [8].

A study of Narasimhulu et al., in 2013[10] with urinary biomarkers showed that MCP-1 may be useful in the early assessment of neonates with sepsis risk when coupled with current methods of evaluating sepsis. These pro-inflammatory cytokines are increased in the infectious inflammatory response of the newborn. In our study, the presence of this biomarker deserves attention for the infectious inflammatory response, since MCP-1 presented 76% of sensitivity and specificity ($p = 0.0169$). Another cytokine IL-17A was remarked in the study, which presented both sensitivity and specificity of 76%. Recent studies in adult population

have shown higher IL-17A production in patients with severe sepsis than in healthy patients [27,28]. IL-17A is a cytokine secreted primarily by a distinct newly characterized subset of helper T cells and Th17 cells. These cells are considered important when microorganisms are not eliminated by Th1 or Th2 mediated response [29] and it mediates the inflammatory response triggering the production of many other cytokines, such as IL-1 β , IL-6, TNF and orchestrates the response of innate and adaptive immune cells [30]. As previous studies, we infer that IL-17A is a potential biomarker to help in sepsis detection.

In the present study, 92% of newborns in the case group had respiratory distress syndrome (RDS) in comparison with the control group, only 46% ($p = 0.0302$). Interestingly, it has been shown that pro- and anti-inflammatory cytokines are increased in the umbilical cord blood from newborns with respiratory distress syndrome [31]. RDS is one of the most common problems in the preterm newborn [32]. RDS is caused by poor production of pulmonary surfactant due to the immaturity of type II alveolar epithelial cells, causing increased alveolar surface tension, hampering ventilatory mechanics and hematose. Preterm newborn care has improved dramatically in recent years and treatment has become possible, yet it remains an important cause of morbidity and mortality in this population [31]. This event was expected because this syndrome contributes to inflammation due to the structural immaturity of lungs and surfactant deficiency, which culminate in pulmonary insufficiency, atelectasis, decreased gas exchange, severe hypoxemia, hypercapnia, and impaired endothelium and epithelial integrity [31,33].

Parenteral nutrition (PN) was also a significant variable in case group (21.8%) and in control group (11.92%) ($p = 0.0094$). The dramatic advances in neonatology improved survival in newborns of extreme low weight. The administration of PN is a daily practice in most neonatal intensive care units (NICU) PN is established as the standard of care for

preterm newborns since these patients have limited nutrient reserves[34]. The use of initial parenteral nutrition is an increasingly common practice in neonatal intensive care units[35]. A continuing concern associated with the early use of PN is that newborns are exposed to a longer period of time, which increases the risk of sepsis secondary to an increased duration of central venous catheter use and cholestasis [35].

The gender was significantly different between groups, especially for males with a prevalence of 92% in the case group against 61.5% in the control group. Our findings corroborate other report that has shown that gender is considered a risk factor for sepsis [36]; however, there are few descriptions in the literature about the relationship between male sex and sepsis.

Birth weight was not significant ($p= 0.1014$) in the present study, although all patients had very low weight ($< 1.5\text{Kg}$). The birth weight is described as a risk factor for sepsis[37]. Low birth weight and preterm neonates are more likely to develop sepsis because they have immature development of various organs and tissues [38].

In the main outcome, 23% of the newborns who belonged to the case group died and 76% were discharged. In the control group, 100% were discharged.

Conclusion

Early, accurate and timely diagnosis of neonatal sepsis remains challenging. Laboratory tests with a rapid response time, with high sensitivity and good specificity no only improve diagnosis, but also may lead to an early intervention with antimicrobials. Urine is a promising sample due to its non-invasive and easy collection, besides mirroring early systemic alterations of major pro-inflammatory biomarkers. Here, we demonstrate the great potential of this fluid sampling for sepsis prediction on preterm neonates in Neonatal

Intensive Care Unit. Despite the small sample size in this study, we corroborate with the notion that IL-1 β may play an important role as a predictive biomarker in the neonatal sepsis onset.

References

1. Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ (2017) Neonatal sepsis. *Lancet* 6736:1–11. doi:10.1016/S0140-6736(17)31002-4
2. Fattah M, Omer AF, Asaif S, et al (2017) Utility of cytokine, adhesion molecule and acute phase proteins in early diagnosis of neonatal sepsis. *J Nat Sci Biol Med* 8:32. doi: 10.4103/0976-9668.198362
3. Carvalho JK, Moore DB, Luz RA, et al (2013) Prediction of sepsis-related outcomes in neonates through systematic genotyping of polymorphisms in genes for innate immunity and inflammation: a narrative review and critical perspective. *Sao Paulo Med J* 131:338–50. doi: 10.1590/1516-3180.2013.1315519
4. Chauhan N, Tiwari S, Jain U (2017) Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. *Microb Pathog*. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.042
5. Chan GJ, Lee ACC, Baqui AH, et al (2013) Risk of early-onset neonatal infection with maternal infection or colonization: a global systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 10:e1001502. doi: 10.1371/journal.pmed.1001502
6. Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P (2017) Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. *J Matern Neonatal Med* 7058:1–14. doi: 10.1080/14767058.2017.1322060
7. Nakstad B, Sonerud T, Solevag AL (2016) Early detection of neonatal group B streptococcus sepsis and the possible diagnostic utility of IL-6, IL-8, and CD11b in a human

umbilical cord blood in vitro model. *Infect Drug Resist* Volume 9:171–179. doi: 10.2147/IDR.S106181

8. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, et al (2013) Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo* 27:669–84.

9. Graziani G, Bordone G, Bellato V, et al (2006) Role of the kidney in plasma cytokine removal in sepsis syndrome: a pilot study. *J Nephrol* 19:176–82.

10. Narasimhulu SS, Hendricks-Muñoz KD, Borkowsky W, Mally P (2013) Usefulness of Urinary Immune Biomarkers in the Evaluation of Neonatal Sepsis. *Clin Pediatr (Phila)* 52:520–526. doi: 10.1177/0009922813482751

11. Pynn JM, Parravicini E, Saiman L, et al (2015) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: potential biomarker for late-onset sepsis. *Pediatr Res* 78:76–81. doi: 10.1038/pr.2015.62

12. Sugitharini V, Prema A, Berla Thangam E (2013) Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. *Inflamm Res* 62:1025–1034. doi: 10.1007/s00011-013-0661-9

13. Sylvester KG, Ling XB, Liu GY-G, et al (2014) Urine Protein Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Necrotizing Enterocolitis in Infants. *J Pediatr* 164:607–612.e7. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.10.091

14. Ng PC, Lam HS (2006) Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr* 18:125–131. doi: 10.1097/01.mop.0000193293.87022.4c

15. Zhou M, Cheng S, Yu J, Lu Q (2015) Interleukin-8 for Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Meta-Analysis. *PLoS One* 10:e0127170. doi: 10.1371/journal.pone.0127170

16. Jong HK de, van der Poll T, Wiersinga WJ (2010) The Systemic Pro-Inflammatory Response in Sepsis. *J Innate Immun* 2:422–430. doi: 10.1159/00031628

17. Hedegaard SS, Wisborg K, Hvas A-M (2015) Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis – a systematic review. *Infect Dis (Auckl)* 47:117–124. doi: 10.3109/00365548.2014.971053
18. Mussap M, Noto A, Cibecchini F, Fanos V (2013) The importance of biomarkers in neonatology. *Semin Fetal Neonatal Med* 18:56–64. doi: 10.1016/j.siny.2012.10.006
19. Drewry AM, Ablordeppey EA, Murray ET, et al (2016) Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis : a prospective observational study. *Crit Care* 1–10. doi: 10.1186/s13054-016-1505-0
20. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, et al (2016) Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 138:984–1010. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.033
21. Cross AS (2016) IL-18/IL-1/IL-17A axis: A novel therapeutic target for neonatal sepsis? *Cytokine* 86:1–3. doi: 10.1016/j.cyto.2016.07.001
22. Basu S, Agarwal P, Anupurba S, et al (2015) Elevated plasma and cerebrospinal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha concentration and combined outcome of death or abnormal neuroimaging in preterm neonates with early-onset clinical sepsis. *J Perinatol* 35:855–861. doi: 10.1038/jp.2015.86.
23. Ng PC, Lam HS (2010) Biomarkers for Late-Onset Neonatal Sepsis: Cytokines and Beyond. *Clin Perinatol* 37:599–610. doi: 10.1016/j.clp.2010.05.005.
24. Neddermann P, Graziani R, Ciliberto G, Paonessa G (1996) Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130. *J Biol Chem* 271:30986–91.

25. Hill GR, Cooke KR, Teshima T, et al (1998) Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 102:115–23. doi: 10.1172/JCI3132.
26. Chang M, Williams A, Ishizawa L, et al (1996) Endogenous interleukin-11 (IL-11) expression is increased and prophylactic use of exogenous IL-11 enhances platelet recovery and improves survival during thrombocytopenia associated with experimental group B streptococcal sepsis in neonatal rats. *Blood Cells Mol Dis* 22:57–67. doi: 10.1006/bcmd.1996.0009.
27. Li J, Li M, Su L, et al (2015) Alterations of T Helper Lymphocyte Subpopulations in Sepsis, Severe Sepsis, and Septic Shock: A Prospective Observational Study. *Inflammation* 38:995–1002. doi: 10.1007/s10753-014-0063-3.
28. Wu H-P, Shih C-C, Chu C-M, et al (2015) Effect of interleukin-17 on in vitro cytokine production in healthy controls and patients with severe sepsis. *J Formos Med Assoc* 114:1250–1257. doi: 10.1016/j.jfma.2014.09.009.
29. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA (2008) Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8:776–787. doi: 10.1038/nri2402.
30. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE (2007) IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annu Rev Immunol* 25:821–852. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557.
31. Varvarigou AA, Thomas I, Rodi M, et al (2012) Respiratory distress syndrome (RDS) in premature infants is underscored by the magnitude of Th1 cytokine polarization. *Cytokine* 58:355–360. doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.005.
32. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R (2008) Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 371:75–84. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60074-4.

33. Ferreira PJ, Bunch TJ, Albertine KH, Carlton DP (2000) Circulating neutrophil concentration and respiratory distress in premature infants. *J Pediatr* 136:466–472. doi: 10.1016/S0022-3476(00)90009-X.
34. Embleton NE, Pang N, Cooke RJ (2001) Postnatal malnutrition and growth retardation: an inevitable consequence of current recommendations in preterm infants? *Pediatrics* 107:270–3.
35. Moyses HE, Johnson MJ, Leaf A a, Cornelius VR (2013) Early parenteral nutrition and growth outcomes in preterm infants : a systematic review and meta-analysis 1 – 4. *Am J Clin Nutr* 816–826. doi: 10.3945/ajcn.112.042028.1.
36. Vergnano S, Menson E, Kennea N, et al (2011) Neonatal infections in England: the NeonIN surveillance network. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* 96:F9–F14. doi: 10.1136/adc.2009.178798.
37. Romanelli RM de C, Anchieta LM, de Almeida Carvalho EA, et al (2014) Risk factors for laboratory-confirmed bloodstream infection in neonates undergoing surgical procedures. *Brazilian J Infect Dis* 18:400–405. doi: 10.1016/j.bjid.2013.12.003.
38. Xiao T, Chen L-P, Liu H, et al (2017) The Analysis of Etiology and Risk Factors for 192 Cases of Neonatal Sepsis. *Biomed Res Int* 2017:1–6. doi: 10.1155/2017/8617076.

Table 1.Maternal, gestational and preterm neonates demographics data.

Variables	Case (n=13)	Control (n=13)	<i>p</i>
Maternal age	29.0 (17-38)	25.6 (16-39)	0.2259
Gestational age (weeks)	27.9 (±2.47)	29.3 (±2.83)	0.1899
Birth weight (g)	954.4 (±324)	1163 (±266)	0.1014
Gender			
Female	1 (7.7%)	8 (61.5%)	0.0112*
Male	12 (92.30%)	5 (38.5%)	
Apgar 1 minute	5.46 (±2.96)	6.23 (±1.53)	0.7122
Apgar 5 minutes	8.38 (±1.80)	8.61 (±1.32)	0.9937
Type of delivery			
Vaginal	5 (38.5%)	4 (30.8%)	>0.9999
Cesarean section	8 (61.5%)	9 (69.2%)	
Antenatal steroid	13 (100%)	10 (76.9%)	0.2200
Chorioamnionitis	3 (23.1%)	1 (7.7%)	0.5930
Rupture of membranes (hours)			
Less than 18h	10 (76.9%)	2 (15.4%)	>0.9999
More than 18h	3 (23.1%)	11 (84.6%)	
Resuscitation in the delivery room	7 (53.9%)	9 (69.2%%)	0.6882
Duration of hospitalization (days)	70.62 (±32.49)	62.85 (±34.04)	0.3291
Surfactant	9 (69.2%)	6 (46.1%)	0.4283
Mechanical ventilation	10 (76.9%)	6 (46.1%)	0.2262
Type of Sepsis			
Early (up to 72h)	5 (38.5%)	-	-
Late (after 72 h)	8 (61.5%)	-	
Use of corticosteroids	3 (23.1%)	2 (15.4%)	0.6447
Parenteral Nutrition (days)	21.8 (±14.03)	11.92 (±2.29)	0.0094*
CPAP in delivery room	6 (46.1%)	6 (46.1%)	>0.9999
Respiratory Distress Syndrome	12 (92.3%)	6 (46.1%)	0.0302*
Hypertension	6 (46.1%)	5 (38.5%)	>0.9999
Diabetes	10 (76.9%)	11 (84.6%)	>0.9999
SNAPPE	36.2 (±17.6)	39.7 (±22.6)	0.6406
Main Outcome			
Discharge	10 (76.9%)		0.0001*
Death	3 (23.1%)	13 (100%)	

Table 2. Values of relative risk ratio, sensitivity, specificity and ROC curve area for the different predictive diagnostic biomarkers.

Markers	<i>p</i> (Mann-Whitney)	RR	CI	SB	SF	<i>p</i> (Fisher Test)	Cut-off	RCA	<i>p</i> RCA
IL-1β	0.0015**	7.364	1.755 - 41.68	0.9	0.8	0.0055*	> 1.082	0.9	0.0025*
IL-1ra	0.0597	3.611	1.509 - 10.41	0.7692	0.8333	0.0048*	> 9245	0.7244	0.0569
IL-2	0.0266*	3.214	1.088 - 11.82	0.8182	0.6154	0.0472*	< 4.299	0.7657	0.0277*
IL-17A	0.0620	3.333	1.365 - 9.69	0.7692	0.7692	0.0169*	> 570.6	0.716	0.0612
MIP-1β	0.0045*	2.619	1.095 - 7.608	0.7692	0.6667	0.0472*	> 5.505	0.8269	0.0055*
MCP-1	0.0191*	3.333	1.365 - 9.69	0.7692	0.7692	0.0169*	> 89.85	0.7692	0.0196*

RR – relative risk; CI - confidence interval; SB - Sensitivity; SF-Specificity; RCA-ROC curve area

Table 3. Correlation between significative cytokines and chemokines with clinical data.

Variables	MIP-1β	IL-1ra	IL-2	IL-1β	MCP-1	IL-17A
Maternal age	0.357	0.466	0.007*	0.397	0.376	0.104
Birth weight (g)	0.017*	0.317	0.659	0.825	0.350	0.071
Apgar 5 minutes	0.298	0.176	0.103	0.802	0.683	0.013*
Type of delivery (vaginal/c-section)	0.938	0.212	0.753	0.512	0.047*	0.773
Antenatal steroid	0.141	0.015*	0.287	0.047*	0.612	0.177
Chorioamnionitis	0.890	0.679	0.027*	0.330	0.139	0.836
Duration of hospitalization (days)	0.373	0.894	0.028*	0.424	0.538	0.641
Mechanical ventilation	0.014*	0.082	0.521	0.277	0.082	0.022*
Sepsis Type (early and late)	0.005*	0.137	0.455	0.001*	0.069	0.047*
Parenteral nutrition (days)	0.028*	0.166	0.910	0.068	0.477	0.389
Respiratory Distress Syndrome	0.016*	0.327	0.369	0.251	0.009*	0.053
Main outcome (Discharge/ Death)	0.165	0.410	0.785	0.119	0.019*	0.024*

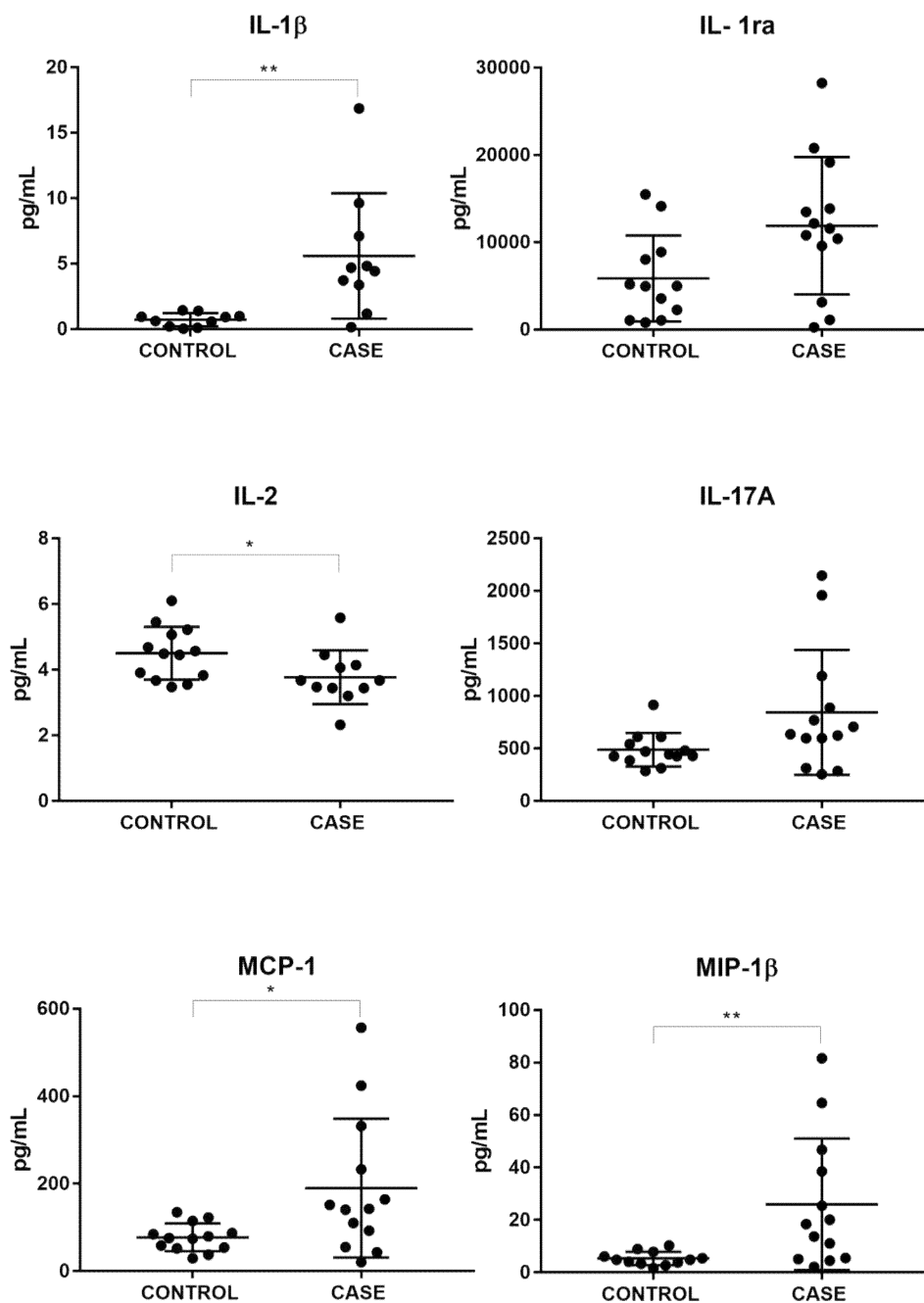


Fig. 1 - Comparison of cytokines and chemokines urinary levels between the control (n = 13) and sepsis (n = 13) groups. Analyzes used the Mann-Whitney test, considering $p < 0.05$ as statistically significant.

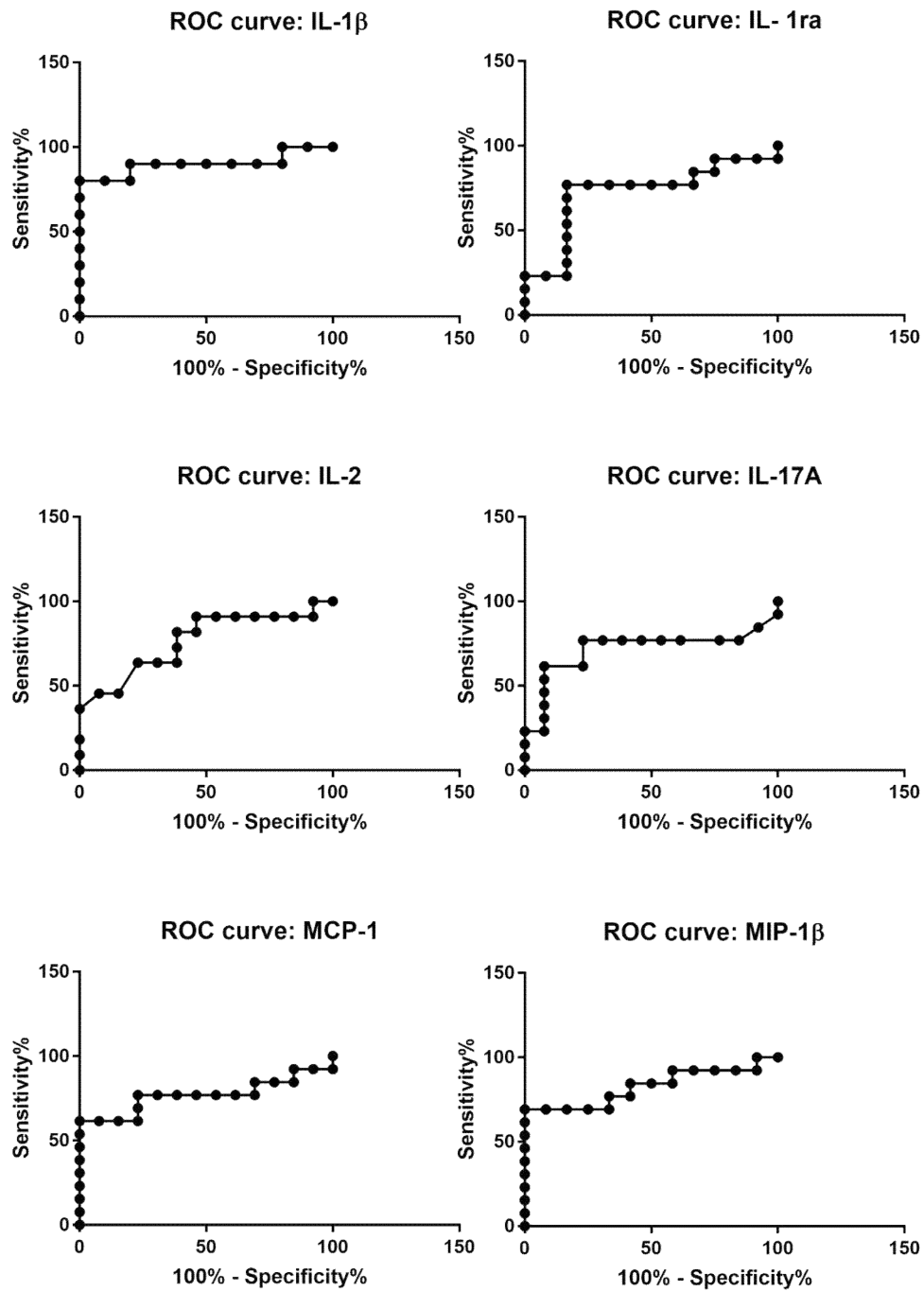


Fig. 2 – ROC curve of significant cytokines and chemokines urinary levels between the control (n = 13) and sepsis (n = 13) groups.

REFERÊNCIAS – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Neonatologia: critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde. Brasília: ANVISA; 2010 In: Centers for disease control and prevention – CDC. **Guidelines for the prevention of Intravascular Catheter – Related Infections**; 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/bsi-guidelines-2011.pdf>>.

AKDIS, M.; AAB, A.; ALTUNBULAKLI, C.; AZKUR, K.; COSTA, R. A.; CRAMERI, R.; et al Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 138, n. 4, p. 984–1010, 2016. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.033.

AYAZI, P.; MAHYAR, A.; DANESHI, M. M.; JAHANIHASHEMI, H.; ESMAILZADEHHA N.; MOSAFERIRAD, N.. Comparison of serum IL-1beta and C-reactive protein levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. **Le Infezioni in Medicina**, n. 4, 296-301, 2014.

BARBOSA, N. G.; REIS, H.; RESENDE, D. S.; ALVARES, D. S.; ABDALLAH, V. O. S.; FILHO, P. P. G. Sepsis neonatal precoce em unidade de terapia intensiva neonatal de um hospital universitário terciário. **Pediatria Moderna**, v. L, n. 4, p. 186–192, 2014.

BHANDARI, V.. Effective Biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 3, p. 234–45, 2014. DOI:10.1093/jpids/piu063

BHARTIYA, D.; KAPADIA, C.; SANGHVI, K.; SINGH, H.; KELKAR, R.; MERCHANT, R.. Preliminary studies on IL-6 levels in healthy and septic Indian neonates. **Indian. Pediatr.**, v. 37, p. 1361-1367, 2000.

BASU, S.; AGARWAL, P.; ANUPURBA, S.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.. Elevated plasma and cerebrospinal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha concentration and combined outcome of death or abnormal neuroimaging in preterm neonates with early-onset clinical sepsis. **J Perinatol.**, v. 35, n. 10, p. 855–861, 2015. doi: 10.1038/jp.2015.86.

BOGHOSSIAN, N. S.; PAGE, G. P.; BELL, E. F.; STOLL, B. J.; MURRAY, J. C.; COTTEN, C. M.; et al. Late-onset sepsis in very low birth weight infants from singleton and multiple-gestation births. **J. Pediatr.**, v. 162, n. 1120–1124.e1, 2013.

BOOMER, J. S.; TO, K.; CHANG, K. C.; TAKASU, O.; OSBORNE, D. F.; WALTON, A. H.; et. al.. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. **JAMA**, v. 306, n. 23, p. 2594–2605, 2011.

BOSKABADI, H.; MAAMOURI, G.; AFSHARI, J. T.; MAFINEJAD, S.; HOSSEINI, G.; MOSTAFAVI-TOROGHI, H.. Evaluation of Serum Interleukins-6, 8 and 10 Levels as Diagnostic Markers of Neonatal Infection and Possibility of Mortality. **Iran J Basic Med Sci.**, v. 16:1232- 237, 2013.

CAMACHO-GONZALEZ, A.; SPEARMAN, P. W.; STOLL, B. J.; Neonatal Infectious Diseases Evaluation of Neonatal Sepsis. **Pediatr Clin N Am.**, v. 60, p. 367–389, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2012.12.003>

CARVALHO, J. K.; MOORE, D. B.; LUZ, R. A.; XAVIER-ELSAS, P. P.; GASPAR-ELSAS, M. I.. Prediction of sepsis-related outcomes in neonates through systematic genotyping of polymorphisms in genes for innate immunity and inflammation: a narrative review and critical perspective. **Sao Paulo Med J.**, v. 131, n. 5, p. 338-50, 2013. doi: 10.1590/1516-3180.2013.1315519

CECCON, M. E. J. R.; VAZ, F. A. C.; DINIZ, E. M. A.; OKAY, T. S.. Interleucina 6 e Proteína C Reativa no Diagnóstico de Sepse Tardia no Recém-Nascido. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 52, n. 2, p. 79-85, 2006.

CELES, M. R. N.; PRADO, C. M.; ROSSI, M. A.. Sepsis: going to the heart of the matter. **Pathobiology**, v. 80, n. 2, p. 70–86, 2012.

CHAN, G. J.; LEE, A. C.; BAQUI, A. H.; TAN, J.; BLACK, R. E.. Risk of early-onset neonatal infection with maternal infection or colonization: a global systematic review and meta-analysis. **PLoS Med.**, v. 10, n. 8, p. e1001502, 2013. doi: 10.1371/journal.pmed.1001502

CHAUHAN, N.; TIWARI, S.; JAIN, U.. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. **Microb Pathog.**, v. 107, p. 234-242, 2017. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.042

CHAUDHRY, H.; ZHOU, J.; ZHONG, Y.; et al.. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. **In Vivo**, v. 27, n. 6, p. 669–84, 2013.

CHEN, H.. Risk factors and nursing strategies of premature infants with fungal sepsis in neonatal intensive care unit. **Nurs Pract Res.**, v. 12, p. 102–104, 2015.

CHIRICO, G.; LODA, C.. Laboratory aid to the diagnosis and therapy of infection in the neonate. **Pediatr Rep.**, v. 3, n. 1, p. e1, 2011.

CUNHA, R. C. M. L.; Araújo, G. C.; Borges, M. R. M. M.; Queiroz, M. V. F.; Pimenta, R. S.. Prevalência de sepse e fatores de risco em neonatos de unidade de terapia intensiva de referência em Palmas, Tocantins, Brasil. **Rev Panam Infectol.**, v. 16, n. 2, p. 86-94, 2014.

DINARELLO, C. A.. Induction of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist. **Semin Oncol.**, v. 24, n. 3, Suppl 9, p. S9–81-S89-93, 1997.

EMBLETON, N. E.; PANG, N.; COOKE, R. J.. Postnatal malnutrition and growth retardation: an inevitable consequence of current recommendations in preterm infants?. **Pediatrics**, v. 107, n. 2, p. 270–3, 2001.

FAN, Y.; YU, J. L. Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis. **World J Pediatr.**, v. 8, p. 101–108, 2012.

FATTAH, M. A.; OMAR, A. F.; ASAIF, S.; MANLULU, R.; KARAR, T.; AHMED, A.; et al Utility of cytokine, adhesion molecule and acute phase proteins in early diagnosis of neonatal sepsis. **J Nat Sci Biol Med.**, v. 8, n. 1, p. 32-39, 2017. doi: 10.4103/0976-9668.198362

FERREIRA, P. J.; BUNCH, T. J.; ALBERTINE, K. H.; CARLTON, D. P.. Circulating neutrophil concentration and respiratory distress in premature infants. **J Pediatr.**, v. 136, p. 466–472, 2000. doi: 10.1016/S0022-3476(00)90009-X.

FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J. C.; VICTONI, T.; SECHER, T.; LEMOS, H. P.; SONEGO, F.; et. al.. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. **J Immunol.**, v. 182, n. 12, p. 7846–7854, 2009.

GANATRA, H. A.; STOLL, B. J.; ZAIDI, A. K.. International perspective on early-onset neonatal sepsis. **Clin Perinatol.**, v. 37, p. 501–23, 2010.

GOLDENBERG, R. L.; CULHANE, J. F.; IAMS, J. D.; ROMERO, R.. Epidemiology and causes of preterm birth. **Lancet**, v. 371, p. 75–84, 2008. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60074-4

GRAZIANI, G.; BORDONE, G.; BELLATO, V.; et al.. Role of the kidney in plasma cytokine removal in sepsis syndrome: a pilot study. **J Nephrol.**, v. 19, p. 176–82, 2006.

HEDEGAARD, S. S.; WISBORG, K.; HVAS, A. M.. Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis – a systematic review. *Infect Dis. (London)*, v. 47, n. 3, p. 117–124, 2015. doi: 10.3109/00365548.2014.971053

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med.**, v. 9, n. 348, , p. 138-50, 2003. PubMed PMID: 12519925.

HUANG, W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 1e13, 2009.

KLIEGMAN, R.. **Nelson textbook of pediatrics**. In: KLIEGMAN, R.; STANTON, B.; ST GEME, J.; SCHOR, N.; BEHRMAN, R.; (editors), 19 th ed., Elsevier Saunders, Chapter 109, p. 794, 2013.

KUBO, T.; WAWRZYNIAK, P.; MORITA, H.; SUGITA, K.; WANKE, K.; KAST, J. I.; et al.. CpG-DNA enhances the tight junction integrity of the bronchial epithelial cell barrier. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 136, n. 1413-6, p. e1-8, 2015.

LAWN, J. E.; et al. Every Newborn: progress, priorities, and potential beyond survival. **Lancet**, v. 384, p. 189–205, 2014.

- LIM, W. H.; et al., Prevalence and pathogen distribution of neonatal sepsis among very-low-birth-weight infants. **Pediatr Neonatol.**, v. 53, n. 4, p. 228-34, 2012.
- MACHADO, J. R.; SOAVE, D. F.; SILVA, M. V.; MENEZES, L. B.; ETCHEBEHERE, R. M.; MONTEIRO M. L. G. R.; et. al.. Neonatal Sepsis and Inflammatory Mediators. **Mediators Inflamm.**, p. 269681, 2014. doi: 10.1155/2014/269681.
- MEIRELES, L. A.; VIEIRA, A. A.; COSTA, C. R.. Avaliação do diagnóstico da sepse neonatal: uso de parâmetros laboratoriais e clínicos como fatores diagnósticos. **Rev. esc. enferm. USP.**, v. 45, n. 1, 2011; <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-62342011000100005>
- MERA, S.; TATULESCU, D.; CISMARU, C.; BONDOR, C.; SLAVCOVICI, A.; ZANC, V.; et. al.. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. **APMIS**, v. 119, n. 2, p. 155–163, 2011.
- MISHRA, U. K.; JACOBS, S. E.; DOYLE, L. W.; GARLAND, S. M.. Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.**, v. 91, p. F208–F212, 2006. doi: 10.1136/adc.2004.064188
- MOYSES, H. E.; JOHNSON, M. J.; LEAF, A. A.; CORNELIUS, V. R.. Early parenteral nutrition and growth outcomes in preterm infants : a systematic review and meta-analysis 1–4. **Am J Clin Nutr.**, v. 87, n. 4, p. 816–826, 2013. doi: 10.3945/ajcn.112.042028.1.
- MUSSAP, M.; NOTO, A.; FRAVEGA, M.; FANOS, V. Aoluble CD14 subtype presepsin (sCD14-ST) and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in neonatal sepsis: new clinical and analytical perspectives for two old biomarkers. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 24, n. S2, p. 12-14, 2011.
- MUSSAP, M.; NOTO, A.; CIBECCHINI, F.; FANOS, V. The importance of biomarkers in neonatology. **Semin. Fetal Neonatal Med.**, v. 18, n. 1, p. 56-64, 2013. doi 10.1016/j.siny.2012.10.006
- MUSSAP, M.; PUXEDDU, E.; BURRAI, P.; NOTO, A.; CIBECCHINI, F.; TESTA, M.; PUDDU, M.; OTTONELLO, G.; DESSI, A.; IRMESI, R.; GASSA, E. D.; FANNI, C.; FANOS, V. Soluble CD14 subtype (sCD14-ST) presepsin in critically ill preterm newborns: preliminary reference ranges. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n. S5, p. 51-53, 2012.
- NAKSTAD, B.; SONERUD, T.; SOLEVAG, A. L.. Early detection of neonatal group B streptococcus sepsis and the possible diagnostic utility of IL-6, IL-8, and CD11b in a human umbilical cord blood in vitro model. **Infect Drug Resist.**, v. 9, p. 171–179. 2016 doi: 10.2147/IDR.S10618.
- NARASIMHULU, S. S.; HENDRICKS-MUÑOZ, K. D.; BORKOWSKY, W.; MALLY, P.. Usefulness of Urinary Immune Biomarkers in the Evaluation of Neonatal Sepsis. **Clin Pediatr (Phila)**, v. 52, p. 520–526, 2013. doi: 10.1177/0009922813482751
- NEDDERMANN, P.; GRAZIANI, R.; CILIBERTO, G.; PAONESSA, G.. Functional

expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130. **J Biol Chem.**, v. 271, n. 48, p. 30986–91, 1996.

NG, P. C.; CHENG, S. H.; CHUI, K. M.; et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.**, v. 77, p. F221–7, 1997.

NG, P. C.; LI, G.; CHUI, K. M.; et al. Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. **Pediatr Res.**, v. 56, p. 796–803, 2004.

OGUNLESI, T. A.; OGUNFOWORA, O. B.; OSINUPEBI, O.; OLANREWaju, D. M.. Changing trends in newborn sepsis in Sagamu, Nigeria: bacterial aetiology, risk factors and antibiotic susceptibility. **J Paediatr Child Health**, v. 47, p. 5–11, 2011.

OZA, S.; LAWN, J. E.; HOGAN, D. R.; MATHERS, C.; COUSENS, S. N.. Neonatal cause-of-death estimates for the early and late neonatal periods for 194 countries: 2000–2013. **Bull. World Health Organ.**, v. 93, p. 19–28, 2015.

PANIGRAHI, P.; PARIDA, S.; NANDA, N. C.; SATPATHY, R.; PRADHAN, L.; CHANDEL, D. S.; et. al. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. **Nature**, 2017. doi:10.1038/nature23480

RODWELL, R.L.; LEISLE, A. L.; TUDEHOPE, D.I. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. **The Journal of Pediatric.**, v. 112, p. 761-7, 1988.

SANKAR, M. J.; et al.. Sepsis in the newborn. **Indian J Pediatr.**, v. 75, n. 3, p. 261-6, 2008.

SCHREUDER, H.; TARDIF, S.; TRUMP-KALLMEYER, S.; et. al.. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. **Nature**, v. 384, p. 194-200, 1997.

SHANE, A. L.; SÁNCHEZ, P. J.; STOLL, B. J.. Neonatal sepsis. **Lancet**, v. 6736, p. 1–11, 2017. doi:10.1016/S0140-6736(17)31002-4

SHAPIRO, N. I.; TRZECIAK, S.; HOLLANDER, J. E.; BIRKHAHN, R.; OTERO, R.; OSBORN, T. M.; et. al.. A prospective, multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. **Crit Care Med.**, v. 37, n. 1, p. 96–104, 2009.

SHARMA, D.; FARAHBAKHSH, N.; SHASTRI, S.; SHARMA, P.. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. **J Matern Neonatal Med.**, v. 7, p. 1–14. 2017. doi: 10.1080/14767058.2017.1322060

SIMONSEN, K. A.; et al.. Early-onset neonatal sepsis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 27, n. 1, p. 21-47, 2014.

SRINIVASA, S.; ARUNKUMAR, D.. Bacterial isolates and their Antibiotic susceptibility patterns in Neonatal sepsis. **Current Pediatric Research**, v. 18, n. 2, p. 83–86, 2014

- STOLL, B. J.; et al.. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. **Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. 817-26, 2011.
- SUGITHARINI, V.; PREMA, A.; BERLA THANGAM, E.. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. **Inflamm Res.**, v. 62, n. 12, p. 1025–1034, 2013. doi: 10.1007/s00011-013-0661-9.
- SYLVESTER, K. G.; LING, X. B.; LIU, GY-G.; et al.. Urine Protein Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Necrotizing Enterocolitis in Infants. **J Pediatr.**, v. 164, p. 607–612.e7, 2014. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.10.09.
- TAPPERO, E.; JOHNSON, P. Laboratory Evaluation of Neonatal Sepsis. Neonatal Nurse Pratitioner Programs, Neonatology Associates. **Newborn & Infant Nursing Reviews**, v. 10, n.4, p. 210-217, 2010.
- TISSIERES, P.; OCHODA, A.; DUNN-SIEGRIST, I.; DRIFTE, G.; MORALES, M.; PFISTER, R.; et al. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon-g. **PLoS One**, v. 7, p. e32863, 2012.
- VAN DE VEERDONK, F. L.; KULLBERG, B. J.; VERSCHUEREN, I. C.; HENDRIKS, T.; VAN DER MEER, J. W.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G. Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure. **Shock**, v. 34, n. 4, p. 407–411, 2010.
- VARVARIGOU, A. A.; THOMAS, I.; RODI, M.; et al Respiratory distress syndrome (RDS) in premature infants is underscored by the magnitude of Th1 cytokine polarization. **Cytokine**, v. 58, p. 355–360, 2012. doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.005.
- VISWANATHAN, R.; SINGH, A. K.; GHOSH, C.; et al.. Profile of neonatal septicaemia at a district-level sick newborn care unit. **J Health Popul Nutr.**, v. 30, p. 41–8, 2012.
- WEAVER, C. T.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. **Annu Rev Immunol.**, v. 25, p. 821–852, 2007. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557.
- WESTON, E.J.; et al.. The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005-2008. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 30, n. 11, p. 937-41, 2011.
- WYNN, J. L.; LEVY, O.. Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. **Clin Perinatol.**, v. 37, p. 307-337, 2010.
- XIAO, T.; CHEN, L-P.; LIU, H.; et al The Analysis of Etiology and Risk Factors for 192 Cases of Neonatal Sepsis. **Biomed Res Int.**, p. 1–6, 2017. doi: 10.1155/2017/8617076.
- ZEA-VERA, A.; TURIN, C. G.; OCHOA, T. J.. Unifying criteria for late neonatal sepsis: proposal for an algorithm of diagnostic surveillance. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 31, n. 2, p. 358-63, 2014.

APÊNDICES

Apêndice A. Termo De Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Recém-nascido

Prezada senhora, o(a) menor (a), pelo qual a senhora é responsável, está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada “**Avaliação de biomarcadores no período neonatal**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Daniela Marques de L. M. Ferreira, Patrícia Terra Alves, Lúdia Mayrink de Barros, Heloísio dos Reis, Aive Oliva Santos, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa, Andréia de Albuquerque Freitas, Angela Maria Oliveira e Larissa Prado Maia.

Nesta pesquisa nós estamos buscando novos exames que possam nos mostrar mais precocemente se o bebê recém-nascido está com infecção.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido por um destes pesquisadores: Daniela Marques de L. M. Ferreira, Lúdia Mayrink de Barros, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa ou Andréia de Albuquerque Freitas, após o nascimento do seu bebê, durante a sua internação hospitalar na Maternidade do Hospital das Clínicas da UFU.

A participação do(a) seu(sua) filho (o) será autorizando a utilização de uma amostra do sangue e urina dele que já é colhido para exames de rotina referentes aos cuidados médicos. Se o seu filho tiver nascido prematuro e adoecer com suspeita que esteja com infecção será autorizando também a utilização de uma amostra do líquido e secreção traqueal (que apenas será colhido para fazer o diagnóstico desta infecção, se houver necessidade, por decisão da equipe médica que está cuidando do seu bebê). Em nenhum momento o(a) menor será identificado(a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a identidade dele(a) será preservada.

O(A) menor não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos consistem no incômodo que ele(a) poderá sentir com a coleta do sangue e urina, porém estes materiais já serão coletados rotineiramente para os cuidados dele(a) durante a internação e no incômodo que ele(a) poderá sentir com a coleta de secreção traqueal e líquido, que também serão colhidos rotineiramente no caso dele ter suspeita de infecção. Os benefícios que haverão, mesmo que

não diretamente, são o avanço no diagnóstico mais cedo das infecções nos bebês possibilitando início do tratamento mais rápido e contribuindo para diminuir a mortalidade dos bebês.

O(A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com a senhora.

Se houver qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah, Dra. Daniela Marques de L. M. Ferreira, Lídia Mayrink de Barros, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa ou Andréia de Albuquerque Freitas - Hospital das Clínicas, Serviço de Neonatologia - Av. Pará, 1720. Bairro Umuarama - Telefones: 3218-2112 / 3218-2454.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia – A. João Naves de Ávila, 2121 bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG – CEP: 38408-100 – Telefone: 3239-4131.

Uberlândia, de de 20....

Assinatura dos pesquisadores

Eu, responsável legal pelo(a) menor _____ consinto na participação dele no projeto citado acima, após ter sido devidamente esclarecida.

Responsável pelo(a) menor participante da pesquisa

APÊNDICE B – Questionário utilizado na coleta de dados.

Projeto de Pesquisa: **Desenvolvimento e Avaliação de Biomarcadores Associados à Patologias no Período Neonatal e Implicações Diagnósticas e Prognósticas**

INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

Nº sujeito pesquisa

Nº prontuário MÃE

Nº prontuário RN

Nome RN

DADOS MATERNOS, DE PRÉ-NATAL E PARTO

Idade Materna Estado Civil () solteira () casada () amasiada () viúva () divorciada

Escolaridade () 1a 3 anos () 4 a 7 anos () 8 a 11 anos () 12 ou + () ignorado

Nº gestações (filhos vivos)

Nº abortos

Nº consultas pré-natal

Corticoide antenatal () não () sim, 1 doses () sim, 2 doses () sim, ≥ 3 doses

Anormalidades do pré-natal () infecção urinária

() corioamnionite

() sofrimento fetal agudo

() pré-eclampsia

() sífilis

() ruprema, quantas horas? _____

() RCIU

() TPP

() oligodramnio

() anormalidade congênita

() diabetes

() drogas ilícitas

() toxoplasmose

() HIV

() HBsAg () DPP

Uso de ATB () Não () Sim Quando? () 1º trim. () 2º trim. () 3º trim () 48 horas antes parto

Qual ATB? _____

Tipo de parto () vaginal () cesariana

DADOS DO RECÉM NASCIDO

Data nascimento _____ Sexo ☐ Masc. ☐ Fem. ☐ Indeterminado

Gemelaridade ☐ Sim ☐ Não Boletim de Apgar 1º min _____ 5º min _____

Peso nascimento _____ Idade Gestacional Clínica _____

Classificação do RN ☐ PIG ☐ AIG ☐ GIG

Surfactante ☐ sim ☐ não Uso de β -bloqueadores ☐ sim ☐ não

Hemotransfusão ☐ Não ☐ Sim Idade: _____ Hemocomponente: _____

Infecções ☐ diarreia ☐ meningite ☐ onfalite ☐ conjuntivite ☐ HIV ☐ infecções cutânea
☐ sífilis ☐ CMV ☐ rubéola congênita ☐ toxoplasmose

Dispositivos e Procedimentos: V.M. _____ dias CPAP nasal _____ dias PICC _____ dias SVD _____ dias

Cat. Umb. ☐ não ☐ sim (arterial, venoso) _____ dias NPP _____ dias

CVC _____ dias Drenos _____ dia Procedimento Cirúrgico ☐ não ☐ sim

OBSERVAÇÕES

Nº SUJEITO DA PESQUISA

DESFECHO

☐ Alta hospitalar ☐ Transferência ☐ Óbito Data: _____ Idade: _____

Diagnósticos:

OBSERVAÇÕES:

Nº SUJEITO DA PESQUISA:

2 dias

() Sepse Precoce () Sepse tardia Data: Idade do RN:
() Não () Sepse Clínica () HMC + Microorganismo:
HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:
ATB: Nº dias: Urina:

7 DIAS

() Sepse tardia Data: Idade do RN:
() Não () Sepse Clínica () HMC + Microorganismo:
HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:
ATB: Nº dias: Urina:

14 DIAS

() Sepse tardia Data: Idade do RN:
() Não () Sepse Clínica () HMC + Microorganismo:
HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:
ATB: Nº dias:

28 DIAS

() Sepse tardia Data: Idade do RN:
() Não () Sepse Clínica () HMC + Microorganismo:
HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:
ATB: Nº dias:

42 DIAS

() Sepse tardia Data: Idade do RN:
() Não () Sepse Clínica () HMC + Microorganismo:
HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:
ATB: Nº dias:

Nº SUJEITO DA PESQUISA:

SUSPEITA DE SEPSE 1

() Sepse Precoce () Sepse tardia Data: Idade do RN:
() Não () Sepse Clínica () HMC + Microorganismo:
HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:
ATB: Nº dias: Urina:

SUSPEITA DE SEPSE 2

() Sepse tardia Data: Idade do RN:
() Não () Sepse Clínica () HMC + Microorganismo:
HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:
ATB: Nº dias: Urina:

SUSPEITA DE SEPSE 3

() Sepse tardia Data: Idade do RN:
() Não () Sepse Clínica () HMC + Microorganismo:
HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:
ATB: Nº dias: Urina:

SUSPEITA DE SEPSE

() Sepse tardia Data: Idade do RN:
() Não () Sepse Clínica () HMC + Microorganismo:
HMG (rodwell): PCR: LCR cultura:
ATB: Nº dias: Urina:

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do parecer pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e Avaliação de Biomarcadores Associados à Patologias no Período Neonatal e Implicações Diagnósticas e Prognósticas

Pesquisador: VÂNIA OLIVETTI STEFFEN ABDALLAH

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36471314.5.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 974.356

Data da Relatoria: 18/12/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: Em contraposição aos contínuos avanços na assistência perinatal observados nas últimas décadas, a mortalidade neonatal ainda é expressiva, especialmente nos países em desenvolvimento, e os recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer, ou seja, aqueles com peso de nascimento inferior a 1500 gramas, representam uma parcela da população de risco responsável por esta alta mortalidade. As infecções bacterianas continuam sendo uma das principais causas de mortalidade nos recém-nascidos pré-termos, além de acarretarem aumento no tempo de hospitalização e nos custos. O diagnóstico de sepse neo-natal é difícil de ser estabelecido e continua a ser um desafio. Os primeiros sinais e sintomas de sepse neo-natal são muitas vezes inespecíficos e facilmente confundidos com as condições que são esperadas nesta população, tais como desconforto respiratório, apneia da prematuridade e dismotilidade gastrointestinal. Essa dificuldade no diagnóstico, aliada a alta taxa de mortalidade tem levado ao uso excessivo de antibióticos no ambiente de terapia intensiva neonatal e o surgimento de organismos resistentes. O diagnóstico precoce, antes que ocorra deterioração clínica, é de particular interesse dos neonatologistas, uma vez que o tempo para início da terapêutica representa um dos determinantes da sobrevida na sepse neonatal. Assim, esforços para a redução da taxa de mortalidade neonatal são realizados como a procura de novos marcadores bioquímicos

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 974.356

que sejam capazes de predizer precocemente o risco de desenvolvimento de doenças agudas neonatais e o monitoramento do curso da doença no recém-nascido grave e agudamente doente. Inúmeros testes laboratoriais tem sido avaliados na tentativa de se obter um que seja útil para o diagnóstico precoce de sepse neonatal e que possibilite a confirmação do diagnóstico de forma rápida e possa ser utilizado para o acompanhamento da evolução. Apesar de extensa investigação ao longo das últimas décadas, ainda não há um único teste que satisfaça os critérios que o tornariam o marcador ideal para a diagnóstico precoce da sepse no recém-nascido. Os autores concordam que a combinação de marcadores, com a mínima coleta de sangue e custos mínimos, oferece melhores resultados no diagnóstico da sepse neonatal precoce e tardia do que o uso de um marcador único. O objetivo do presente trabalho é desenvolver novos biomarcadores por métodos biotecnológicos e imunológicos e verificar sua contribuição no diagnóstico precoce da infecção neonatal. O estudo será uma corte prospectiva realizada no Serviço de Neonatologia do HCU-UFU, Banco de Leite do HCU-UFU, Maternidade do HCU-UFU e no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU. Serão estudadas todas as mães e seus recém nascidos prematuros (RNPT) menores que 34 semanas e peso de nascimento menor que 1.500g, nascidos no HCU-UFU, no período de 10 anos (2015 a 2024). Será constituído também um grupo controle de recém-nascidos à termo (RNT) saudáveis. Será coletado sangue materno, leite humano da própria mãe, sangue do cordão umbilical, sangue do RNPT (com 48 horas, 7 dias, 14 dias, 28 dias e após a cada 14 dias enquanto este permanecer internado, aproveitando o momento de coletas de sangue que são realizadas rotineiramente), urina do RNPT (com 48 horas de vida e 7 dias) . Nos RNPT que apresentarem suspeita clínica de sepse será colhido sangue, urina e líquido (antes do início da terapêutica), conforme rotina já estabelecida no serviço. Apenas nos RNPT que requerem intubação orotraqueal para suporte ventilatório e que forem submetidos à aspiração, a secreção traqueal será colhida. Todas estas amostras serão encaminhadas ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia para dosagem dos biomarcadores: Proteína C reativa (PCR), Procalcitonina (PCT), CD14 subtipo solúvel – presepsina (sCD14-ST), Interleucina – 6 (IL-6), Interleucina – 1 (IL-1), Interleucina – 10 (IL-10), Fator de necrose tumoral (TNF), transforming growth factor beta 1 (TGF-1), CD14/CD16, CD4/CD8, entre outros marcadores de interesse. Nos pacientes com suspeita clínica de sepse, além dos biomarcadores serão realizados, conforme rotina do serviço, os exames de hemograma e hemocultura. Após a coleta dos dados e análises, os grupos serão estratificados e avaliados estatisticamente. Metodologia Proposta: Serão estudadas todas as mães e seus recém-nascidos prematuros (RNPT) menores que 34 semanas e peso de nascimento menor que 1.500g, nascidos no HCU-UFU, no período de 10 anos. Será constituído

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 974.356

também um grupo controle que consiste de RN à termo, sem história de asfixia perinatal ou patologias neonatais durante a internação, cuja mãe não apresentou bolsa rota maior que 18 horas ou clínica de corioamnionite, totalizando aproximadamente 100 recém-nascidos. Estes RN serão selecionados entre aqueles que tiverem indicação de coleta de sangue para qualquer monitoramento necessário, por exemplo dosagem de bilirrubina, íons, glicemia, entre outros. Nas primeiras 48 horas após o nascimento, a pesquisadora abordará cada mãe de recém-nascido incluído no estudo para informar a respeito do estudo. O primeiro TCLE será obtido das mães, para a utilização de seu sangue e leite. Um segundo TCLE será obtido das mães de RNPT, consentindo com a utilização do sangue do cordão, sangue periférico, urina, líquido e aspirado traqueal de seus filhos. Um terceiro TCLE será obtido das mães de RN a termo (grupo controle), consentindo com a utilização do sangue do cordão e sangue periférico de seus filhos. Após o nascimento do RN será coletado 2 mL de sangue da mãe, em até 24 horas do parto. Este sangue será colhido na mesma ocasião da coleta de exames rotineiros (sorologia para VDRL e HIV) que é realizado em todas as parturientes do hospital. Todas as mães de RNPT abaixo de 1500g são encaminhadas ao Banco de Leite Humano do HCU- UFU para retirada do leite, uma vez que seus bebês não apresentam condições de sugar diretamente ao seio. Uma amostra (10 mL) deste leite materno será destinada ao estudo. Será armazenado cerca de 5 mL do sangue do cordão umbilical que é coletado rotineiramente em todos os recém-nascidos, termo e pré-termo. Após admissão destes RNPT na Unidade de Terapia Intensiva neonatal será repetido a coleta de sangue com 48 horas, 7 dias, 14 dias, 28 dias e após a cada 14 dias enquanto este permanecer internado, aproveitando o momento de coletas de sangue que são realizadas rotineiramente no serviço nestes bebês. Nos recém-nascidos que apresentarem suspeita clínica de sepse será colhido sangue no momento da suspeita e antes do início da terapêutica, conforme rotina já estabelecida no serviço. Para o grupo controle (RNT) será repetido a coleta de sangue com cerca de 48 horas, aproveitando o momento de coleta de sangue para algum monitoramento que se fizer necessário nos cuidados deste recém-nascido. Assim, todas as amostras de sangue serão obtidas da sobra dos exames coletados de rotina na UTI neonatal e não representarão, portanto, uma nova coleta de sangue. Será colhido uma amostra de urina com 48 horas e 7 dias. Nos RNPT que apresentarem suspeita clínica de sepse será colhido nova amostra de urina no momento da suspeita. Nestes casos será colhido líquido (LCR) conforme rotina já estabelecida no serviço. O nos RNPT que requerem intubação orotraqueal para suporte ventilatório e que forem submetidos à aspiração, a secreção traqueal será colhida. Nas amostras de sangue serão realizados, conforme a disponibilidade, a dosagem dos seguintes biomarcadores: Proteína C reativa (PCR), Procalcitonina (PCT), CD14 subtipo solúvel – presepsina (sCD14-ST),

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 974.356

Interleucina – 6 (IL-6), Interleucina – 1 (IL-1), Interleucina – 10 (IL-10), Fator de necrose tumoral (TNF), transforming growth fator beta 1 (TGF-1), CD14/CD16, CD4/CD8, entre outros marcadores de interesse. Nos pacientes com suspeita clínica de sepse, além dos biomarcadores serão realizados, conforme rotina do serviço, os exames de hemograma e hemocultura. Nas amostras de leite materno, urina e líquido serão realizados, a detecção de imunoglobulinas específicas. Além de analisar os marcadores já investigados na literatura, propomos também desenvolver novos biomarcadores por tecnologias proteômicas, genômicas e imunológicas (em anexo na plataforma Brasil).

Critério de Inclusão: Serão incluídos na pesquisa os RNPT com idade gestacional menor que 34 semanas e peso de nascimento menor que 1.500g nascidos no HCU- UFU durante o período de estudo. O grupo controle será constituído de recém-nascidos à termo, sem história de asfixia perinatal ou patologias neonatais durante a internação, cuja mãe não apresentou bolsa rota maior que 18 horas ou clínica de corioamnionite, selecionados entre aqueles que tiverem indicação de coleta de sangue para qualquer monitoramento necessário, por exemplo dosagem de bilirrubina, íons, glicemia, entre outros.

Critério de Exclusão: Serão excluídos os RNPT com malformações congênitas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Desenvolver e/ou avaliar o papel de biomarcadores no período neonatal, desde o nascimento até a alta hospitalar.

Objetivos Específicos: 1- Desenvolver novos biomarcadores por métodos biotecnológicos e imunológicos. 2. Verificar a contribuição dos biomarcadores no diagnóstico precoce da infecção neonatal (sepse neonatal precoce e sepse neonatal tardia). 3- Avaliar o comportamento dos biomarcadores e suas relações com as principais patologias no período neonatal: hemorragia periintra-ventricular, retinopatia da prematuridade e displasia broncopulmonar, entre outras. 4- Avaliar a relação entre os biomarcadores e o desfecho final do recém-nascido: alta ou óbito. 5- Avaliar os biomarcadores no sangue de cordão do RNT e RNPT correlacionando-os à evolução clínica e desfecho do recém-nascido. 6- Avaliar os biomarcadores no sangue periférico do RNT e RNPT correlacionando-os à evolução clínica e desfecho do recém-nascido. 7- Avaliar os biomarcadores na urina do RNPT correlacionando-os à evolução clínica e desfecho do recém-nascido. 8- Avaliar os biomarcadores no líquido do RNPT correlacionando-os à evolução clínica e desfecho do recém-nascido. 9- Avaliar os biomarcadores na secreção traqueal do RNPT correlacionando-os à evolução clínica e desfecho do recém-nascido. 10- Avaliar os biomarcadores

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 974.356

no sangue da mãe do RNT e RNPT correlacionando-os à evolução clínica e desfecho do recém-nascido.11- Avaliar os biomarcadores no leite materno do RNPT correlacionando-os à evolução clínica e desfecho do recém-nascido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores: Os riscos aos indivíduos participantes da pesquisa são mínimos e se referem basicamente ao risco de identificação de participação na pesquisa, pois os riscos referentes à coleta de sangue, urina, LCR e secreção traqueal, tais como dor local, formação de hematoma no local, queda de saturação durante a coleta, já estão incluídos nos cuidados de rotina a que estes recém-nascidos estão submetidos pela própria prematuridade e não serão realizadas novas coletas. A equipe executora compromete-se com o sigilo absoluto da identidade dos sujeitos da pesquisa.

Os benefícios do estudo são a possibilidade de se detectar um marcador precoce para o diagnóstico de infecções neonatais e outras patologias prevalentes neste período.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O CEP/UFU, considera que as pendências foram respondidas de maneira clara e adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os itens foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer 887.483 foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 974.356

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2015.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2016

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2017

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2018

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2019

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2020

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2021

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2022

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2023

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Dezembro de 2024

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 974.356

previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

UBERLANDIA, 05 de Março de 2015

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLANDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo

De: em.icme.0.555a1c.24c7fc4f@editorialmanager.com <em.icme.0.555a1c.24c7fc4f@editorialmanager.com> em nome de Intensive Care Medicine - Editorial Office (ICME) <em@editorialmanager.com>

Enviado: segunda-feira, 21 de agosto de 2017 00:38

Para: Aive Oliva Santos

Assunto: ICME-D-17-01167 - Submission Notification to co-author - [EMID:630a966e3cc32859]

Re: "Urinary IL-1 β as a predictive biomarker of preterm neonatal sepsis"

Submission ID: ICME-D-17-01167

Full author list: Aline Teodoro de Paula, Ph.D; Aive Oliva Santos; Roberta Rezende Rosa; Patrícia Terra Alves; Larissa Prado Maia; Daniela Silva Rodrigues Costa; Lídia Mayrink; Daniela M. L. M. Ferreira; Camila Piqui Nascimento; Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo; Vânia Olivetti Steffen Abdallah; Luiz Ricardo Goulart

Dear Mrs Santos,

We have received the submission entitled: "Urinary IL-1 β as a predictive biomarker of preterm neonatal sepsis" for possible publication in Intensive Care Medicine, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dra Aline Teodoro de Paula who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Intensive Care Medicine