



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA RÁPIDA E
SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO URINÁRIA DA SEPSE NEONATAL DE INÍCIO
TARDIO: ESTUDO CLÍNICO DE PROVA DE CONCEITO EM RECÉM-NASCIDOS
PRÉ-TERMO DE MUITO BAIXO PESO**

CAIO AUGUSTO DE LIMA

MESTRADO ACADÊMICO

2023



CAIO AUGUSTO DE LIMA

DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA RÁPIDA E SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO URINÁRIA DA SEPSE NEONATAL DE INÍCIO TARDIO: ESTUDO CLÍNICO DE PROVA DE CONCEITO EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO DE MUITO BAIXO PESO

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 do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Robinson Sabino da Silva

UBERLÂNDIA

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L732 Lima, Caio Augusto de, 1988-
2023 DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA
RÁPIDA E SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO URINÁRIA DA SEPSE
NEONATAL DE
INÍCIO TARDIO: [recurso eletrônico] : ESTUDO CLÍNICO DE
PROVA DE CONCEITO EM RECÉM-NASCIDOS PRÉTERMO DE MUITO
BAIXO PESO. / Caio Augusto de Lima. - 2023.

Orientador: Robinson Sabino da Silva. Dissertação
(Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.350>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

I. Ciências médicas. I. Silva, Robinson
Sabino da, 1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de
Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. III.
Título.

CDU: 61

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 11 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8628 - www.ppcsa.famed.ufu.br - ppcsa@famed.ufu.br

**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 08/PPCSA				
Data:	04.07.2023	Hora de início:	15:00h	Hora de encerramento:	18:00h
Matrícula do Discente:	11812CSD006				
Nome do Discente:	Caio Augusto de Lima				
Título do Trabalho:	DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA RÁPIDA E SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO URINÁRIA DA SEPSE NEONATAL DE INÍCIO TARDIO: ESTUDO CLÍNICO DE PROVA DE CONCEITO EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO DE MUITO BAIXO PESO.				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	2: Diagnóstico, Tratamento e Prognóstico das Doenças e Agravos à Saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de Plataformas Diagnósticas pela saliva				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Microsoft Teams., em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Renata Pereira Georjutti (UNITRI), Tatiany Calegari (UFU) e Robinson Sabino da Silva (UFU) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Pereira Georjutti, Usuário Externo**, em 04/07/2023, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/07/2023, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiany Calegari, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/07/2023, às 18:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

05/07/2023,
11:34

SEI/UFU - 4623995 - Ata de Defesa - Pós-Graduação



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4623995 e o código CRC 2EB58E64.

Dedico este trabalho a minha família, amigos e a todas as pessoas que torceram por mim, não me deixaram desistir, e me incentivaram durante toda esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que foi meu porto seguro, iluminou meus passos e permitiu que eu chegasse ao fim de mais uma etapa com sucesso.

A todos os amigos do Hospital de Clínicas de Uberlândia que acompanharam a minha trajetória com palavras de incentivo.

A todos os colegas e alunos do Grupo de pesquisa que participaram e me auxiliaram nesta conquista.

A meus pai **José** e minha mãe **Elizabeth**, que confiaram em mim e sempre acreditaram que eu sou um vencedor.

As minhas irmãs, **Márcia e Eliane** e todos os sobrinhos que acreditaram e torceram por mim.

Aos amigos **Caroline, Douglas, Kelvyn, Monnyka, Pedro e Priscilla** que contribuíram de forma especial para o alcance deste objetivo.

Aos meus orientadores, **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (in memoriam)** e **Prof^a Dr. Robinson Sabino da Silva**, pelos ensinamentos, acolhimento e oportunidade de aprendizado.

Aos novos colegas do Laboratório pela paciência, cortesia, respeito e colaboração.

Às secretárias do curso de Pós-Graduação de Ciências da Saúde, **Gisele e Viviane**, pela atenção e cordialidade.

E a todos que torceram por mim e de uma forma ou de outra contribuíram para que alcançasse mais este degrau em minha carreira profissional, meus sinceros agradecimentos.

Gratidão a todos!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
volta ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
3. OBJETIVO	16
4. ARTIGO CIENTÍFICO	17
5. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a sepse neonatal é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em bebês prematuros, a sepse neonatal também é conhecida como síndrome clínica com infecção grave que atinge o sistema circulatório do neonato associado ao sistema imunológico sobrecarregado que é incapaz de proteger o organismo da infecção. As infecções são comumente desencadeadas por microrganismos oportunistas e quanto menor o peso em que o RNPT maiores são os riscos de desenvolvimento de sepse neonatal. Estima-se que as infecções neonatais são responsáveis por aproximadamente 23,4% das mortes registradas em neonatos em todo mundo (CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017).

A infecção pode ter diferentes cargas de microrganismos, o que sinaliza parcialmente a gravidade da sepse. As formas de exposição mais comuns em RNPT que desencadeiam a sepse neonatal são ligadas a infecção intrauterina, por bactérias intestinais materna e exposição a outros patógenos extrauterinos. Alguns aspectos relevantes da sepse são o tempo de exposição, o tamanho do inóculo, o estado do sistema imunológico do recém-nascido (RN), a presença de prematuridade e a virulência do respectivo microrganismo responsável pelo desencadeamento da sepse. Estima-se que a estadia prolongada de bebês prematuros no hospital em conjunto com procedimentos invasivos contínuos para acompanhamento de exames tendem a aumentar o risco de infecções hospitalares oportunistas e assim gerar a sepse neonatal (SHANE; SÁNCHEZ; STOLL, 2017).

Os principais microrganismos patogênicos da sepse são as bactérias gram positivas e gram negativas, vírus e fungos. A infecção mais comum ocorre por bactérias e a terapêutica varia baseada na idade do bebê, tipo de infecção, microrganismo patogênico causador da infecção e testes de antibiograma para checagem de resistência microbiana. Comumente, o tratamento com antibióticos se inicia imediatamente após a suspeita de sepse neonatal para evitar que ocorra piora no quadro clínico do neonato (ERSHAD. et al., 2019).

Embora os exames de sanguíneos são o padrão-ouro, a busca por novos biomarcadores de sepse em neonatos tem sido árdua. Destaca-se a presença de resultados incipientes na busca biomarcadores urinários relacionados a função renal de RN com frequente associação a citocinas inflamatórias da sepse. Comparado

com o sangue, a urina tem a vantagem de ser coletada de forma não invasiva, indolor e também possibilita, de maneira efetiva, a dosagem de vários potenciais biomarcadores da sepse (CHAUHAN; TIWARI; JAIN, 2017). Segundo Viana & Amaral (2022), o diagnóstico rápido e preciso da sepse neonatal é essencial para evitar piora dos quadros clínicos dos RNs e óbito. Assim, atualmente, a ausência de estrutura laboratorial para exames relacionados a sepse pode afetar negativamente neonatos acometidos pela sepse neonatal, o que afeta principalmente países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

A prevalência de sepse diminuiu em algumas regiões do mundo, no entanto, continua sendo um grave problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente em bebês com peso reduzido no nascimento. A detecção da sepse pode ocorrer por diferentes testes, no entanto ainda existe uma carência para realização de diagnósticos efetivos e confiáveis de forma rápida, frequentemente são necessários testes caros com demora na liberação de resultados. Esta dificuldade no diagnóstico precoce limita o tratamento correto no momento adequado. Atualmente, o tratamento padrão para a sepse neonatal utiliza administração contínua de antibióticos com acompanhamento de parâmetros clínicos de forma contínua, garantindo assim maiores taxas de sucesso no tratamento sistêmica (ERSHAD. et al., 2019).

Segundo Chauhan, Tiwari, Jain (2017), a presença dos marcadores inflamatórios presentes na urina apresenta capacidade de detecção da sepse após o nascimento, podendo preceder o aparecimento dos sintomas clínicos, representando uma ferramenta de potencial diagnóstico de forma rápida e eficiente, podendo também garantir terapêuticas eficazes que aumentam a sobrevivência do RN com sepse neonatal. Os sintomas da sepse neonatal são inespecíficos e variam de organismo para organismo, os mais comuns são: apneia, distensão abdominal, dispnéia, letargia, hipotonia e choque séptico em casos mais graves da infecção. O diagnóstico conclusivo da sepse neonatal é complexo pois o resultado de testes de detecção de bactérias com crescimento em meio de cultura pode apresentar resultados falsos positivos em caso de contaminações ou de falsos negativos quando a presença das bactérias tem níveis menos elevados no momento da coleta. (CORONELL. et al., 2009).

A sepse neonatal apresenta maior potencial de letalidade no RN com

consequente mortalidade neonatal, podendo também causar sequelas neurocognitivas. A sepse neonatal é classificada como precoce ou tardia, sendo que a sepse neonatal precoce acomete os RNs no período peri-parto, antes ou durante o parto. Os microrganismos causadores da sepse precoce normalmente têm origem do trato gênito-urinário materno, há indícios de que 62% das sepses neonatais precoces são ocasionadas por microrganismo gram positivos, O patógeno mais prevalente nesta infecção é o *Streptococcus agalactiae* com até 43%, seguidos de bactérias gram negativas com 37% e a *Escherichia coli* com 29% em estudos de coorte (SOIBELMANN; SILVEIRA, 2020). Sugere-se que fungos e vírus sejam responsáveis pelos outros casos de sepse neonatal, embora seja evidente uma proporção menor de casos (SOIBELMANN; SILVEIRA, 2020)

Segundo Viana & Amaral (2022), RNs do gênero masculino tem de duas a seis vezes mais chances de ter sepse neonatal precoce, estima-se que isso ocorra devido discrepância na presença de receptores de interleucina-1. Os RNs que nascem com baixo peso apresentem maior suscetibilidade a infecções e maior taxa de óbitos, devido ao fato de que neonatos prematuros que nascem com baixo peso (< 2500g) tenderem ao desenvolvimento de disfunção do sistema imunológico e redução dos anticorpos IgG que são adquiridos pela via transplacentária. Segundo Soibelman & Silveira, 2020, as principais formas de se proteger da sepse neonatal são a higienização das mãos regularmente e optar pelo consumo do leite materno ao bebê. A realização de procedimentos adequados na antibioticoterapia para o tratamento da sepse neonatal visa diminuir a resistência de microrganismos invasores oportunistas aos fármacos.

Segundo Viana & Amaral (2022), outro fator que aumenta as chances de sepse neonatal é a gestação em mulheres com idade materna abaixo dos 18 anos e acima dos 40 anos. Estas gestações de risco podem gerar ruptura precoce do útero, com isso, o risco de sepse neonatal em RNPTs aumenta. A sepse neonatal também esta associada a infecção do trato urinário materno durante a gestação, pois as chances das mulheres com este tipo de infecção no decorrer da gestação darem à luz a RNs de baixo peso e prematuros suscetíveis a infecções é aumentada. Esses microrganismos patogênicos responsáveis pela sepse neonatal, tanto a precoce quanto a tardia, são bastante distintos (SOIBELMANN; SILVEIRA, 2020).

As avaliações contínuas e planos otimizados estratégicos para a prevenção e tratamento da sepse neonatal são extremamente importantes, além de estudos

analíticos dos fatores associados aos óbitos dos RNs em neonatal com diagnóstico de sepse, visando a total compreensão dos mínimos fatores que possam fazer a diferença e ser mais efetivo de forma geral para que haja redução da mortalidade por sepse neonatal em RNs (VIANA; AMARAL, 2022). Em conjunto, percebe-se que a sepse neonatal requer de plataformas de diagnóstico que permitam a liberação de resultados de forma mais célere e se possível sem a utilização de reagentes, frequentemente de alto custo e com alta capacidade de poluir o meio ambiente. O aumento da oferta de plataforma de detecção da sepse neonatal de início tardio pode proporcionar diagnósticos para uma parcela mais significativa da população, especialmente em países de menor desenvolvimento tecnológico, possibilitando diagnóstico precoce e terapêutica no momento oportuno para redução da mortalidade infantil globalmente.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A sepse se constitui em uma infecção generalizada pela disfunção de um ou mais órgãos, oferecendo risco de vida para crianças independente de problemas de saúde subjacentes (KAWASAKI, 2017; WATSON et al., 2003). Além disso, a sepse é considerada uma das principais causas de óbitos em crianças mesmo em países de alto desenvolvimento tecnológico (WATSON et al., 2003). No período neonatal, nos primeiros 28 dias de vida, a sepse constitui uma das doenças mais graves pela sua alta incidência e letalidade (LEVY et al., 2001). No entanto, nas últimas duas décadas a sepse foi definida como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), causando uma infecção tanto em adultos quanto em crianças (LEVY et al., 2001; GOLDSTEIN et al., 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 15% dos óbitos neonatais são causados pela sepse, índice consideravelmente maior entre os recém-nascidos pré-termo (WHO, 2012). Esse grupo de recém-nascidos (RN) possui um sistema imunológico ainda imaturo e, portanto, incapaz de responder adequadamente aos agravos infecciosos (LEVY, 2007; SHARMA et al., 2012).

A sepse neonatal tardia (LOS) é definida mais frequentemente em 72 horas após o nascimento, e é um dado considerado importante para diferenciar da sepse neonatal precoce (EOS), em termos do espectro de patógenos causadores dessas infecções (BOGHOSSIAN et al., 2013; HAMMOUD et al., 2012). Contudo, cerca de 10-25% dos neonatos prematuros internados em unidades de terapia intensiva neonatal desenvolverão sepse neonatal tardia, responsável por 10-20% dos óbitos (LIU et al., 2012; BIZZARRO et al., 2015). Estudos têm demonstrado que durante o período neonatal, complicações associadas à sepse tem efeitos severos sobre o crescimento e o desenvolvimento neonatal, especialmente em neonatos prematuros (REGEV et al., 2016; ADAMS-CHAPMAN et al., 2006).

Nesse contexto, sabe-se que no período neonatal, e particularmente nos neonatos prematuros, as funções vitais e imunológicas são imaturas, sendo portanto, difícil de se estabelecer uma resposta regulada às infecções (BURY et al., 2021). Dessa forma, os sinais e sintomas clínicos são muitas vezes discretos, pouco sensíveis e específicos, com possibilidade eminente de deterioração clínica de maneira rápida (MCGOVERN et al., 2020; WYNN & POLIN, 2018). Assim, o conceito

de disfunção orgânica está indefinido nesta população, sem referência consensual para descrição das alterações fisiológicas associadas à LOS (sepse neonatal tardia), durante o período neonatal, em particular em neonatos prematuros (BURY et al., 2021; MCGOVERN et al., 2020; WYNN & POLIN, 2018).

A sepse neonatal tardia (LOS) continua sendo uma importante causa de morbidade e complicações a longo prazo entre prematuros, que incluem internações prolongadas e aumento dos custos com serviços de saúde (STOLL et al., 2002). É de suma importância conhecer a incidência e estratégias eficazes para prevenir a sepse neonatal tardia em unidades de terapia intensiva neonatal (MANZONI et al., 2013; LANDRE-PIEGNE et al., 2011).

Além da maior incidência e letalidade, a sepse neonatal tardia apresenta outras especificidades, como a dificuldade em estabelecer o diagnóstico, uma vez que os sinais e sintomas são inespecíficos e facilmente confundidos com as condições que são esperadas nesta população, tais como dispnéia, apnéia da prematuridade e dismotilidade gastrointestinal (BEKHOF et al., 2013).

Contudo, além dos fatores de risco associados à sepse neonatal tardia clássica, sabe-se que neonatos que necessitam de cuidados intensivos em países em desenvolvimento correm um risco aumentado comparado com países de maior índice de desenvolvimento tecnológico-industrial, devido a fatores estruturais, como superlotação de leitos, escassez da equipe de enfermeiros e médicos especializados, ausência ou uso indevido de insumos e equipamentos básicos, uso indevido e excessivo de antibióticos, falta de conhecimento adequado sobre o manejo de neonatos com sepse e dificuldades na implementação de práticas seguras de controle de infecção (GRAHAM et al., 2006; HARBATH et al., 1999; CIMIOTTI et al., 2006).

O diagnóstico microbiológico costuma ser pouco confiável em neonatos prematuros, devido ao longo tempo de espera do resultado e, muitas vezes, não é fácil correlacionar o quadro clínico com a bactéria identificada (BIZARRO et al., 2015). E, em suma, todos os elementos do diagnóstico, sejam eles clínicos, biológicos ou microbiológicos continuam sendo frequentemente debatidos (BIZARRO et al., 2015; MCGOVERN et al., 2020; BERLARK et al., 2018).

Além disso, os exames laboratoriais atualmente disponíveis, em especial hemograma e as proteínas de fase aguda, como a PCR (proteína C reativa), podem não contribuir de maneira adequada para o diagnóstico de sepse neonatal (QUADIR;

BRITTON, 2018; ROSENFELD et al., 2018). Dessa forma, todos esses fatores em conjunto têm contribuído para o uso excessivo de antibióticos no ambiente de terapia intensiva neonatal e o surgimento de organismos resistentes aos mesmos (TZIALLA et al., 2015).

Contudo, a hemocultura para detecção de patógenos causadores da sepse é considerada 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 preditoras de sepse neonatal são de suma importância para o diagnóstico precoce (GANATRA et al., 2010; BENITZ, 2010). Assim, têm-se observado a importância de alguns biomarcadores presentes no sangue e na urina de neonatos que estão associados com quadro de sepse (ANDREJAITIENE, 2006; CARROL et al., 2002).

Dessa forma, um dos grandes esforços na redução da taxa de mortalidade neonatal está direcionada na procura de novos marcadores bioquímicos que sejam capazes de prever de maneira precoce o risco de desenvolvimento de doenças agudas neonatais e o monitoramento do curso natural da doença no recém-nascido grave (MUSSAP. et al, 2012).

A dosagem de biomarcadores urinários têm se mostrado promissora quanto à avaliação de risco, diagnóstico e prognóstico de sepse, pela possibilidade de serem dosados de maneira efetiva neste fluido corporal (SUGUNA NARASIMHULU et al., 2013; SYLVESTER, et al., 2014). Dessa forma, a principal vantagem é a forma de coleta da urina, sendo esta não invasiva e indolor, permitindo a obtenção de várias amostras para acompanhamento e, portanto, mais segura e benéfica para o recém-nascido (RN).

A aplicação da espectroscopia infravermelho com transformada em Fourier acoplada com reflexão atenuada (ATR-FTIR) permite a obtenção de espectros específicos de biofluidos e tem sido aplicada para detecção de doenças. A plataforma ATR-FTIR permite estudar a composição molecular de grupos funcionais e também a proporção de seu conteúdo molecular de forma célere e com volumes ultra-reduzidos de amostra (BAKER et al., 2014).

A plataforma ATR-FTIR é considerada uma tecnologia verde, com grande vantagem de sustentabilidade pois permite análise sem a utilização de reagentes, que frequentemente apresentam alto potencial de malignidade, citotoxicidade e são

inflamáveis. Nos últimos anos sua aplicação tem sido direcionada para a triagem, diagnóstico e monitoramento de diversas doenças metastáticas, crônico-degenerativas e infecciosas. Os modos vibracionais no infravermelho de amostras consideradas minimamente-invasivas como a urina podem ser consideradas como impressões bioquímicas relacionadas diretamente com a presença de componentes específicos que apresentam grande potencial para o diagnóstico de doenças sistêmicas de forma rápida, com análise de custo reduzido e com alta sensibilidade (BAKER et al., 2014).

Desta forma, evidencia-se que o desenvolvimento de uma plataforma biofotônica baseada em ATR-FTIR de forma rápida e sustentável para detecção urinária da sepse neonatal de início tardio para recém-nascidos de muito baixo peso pode ter grande utilidade clínica e permitir avanços na terapia da sepse neonatal.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma plataforma biofotônica baseada em tecnologia ATR-FTIR para detecção urinária da sepse neonatal de início tardio de forma célere e sustentável baseada em um estudo clínico de prova-de-conceito com uma população de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

A reagent-free and rapid biophotonic platform for late-onset neonatal sepsis detection using urinary samples: A Proof-of-Concept with clinical samples in very low-weight in preterm neonates

Caio Augusto de Lima^a, Mayla Silva Borges^a, Camila Piqui Nascimento^a, Mariana Gonçalves Gomes Tavalone^b, Priscilla Larissa Silva Pires^b, Kelvyn Lucas Santos Zanetti^b, Bianca Landi Visconti Ferreira Gauze Rodrigues^b, Daniela Silva Rodrigues da Costa^b, Luiz Ricardo Goulart^{c,d}, Vânia Olivetti Steffen Abdallah^b, Robinson Sabino-Silva^a

^aInnovation Group in Salivary Diagnostics and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

^b School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

^c Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

^d *in memoriam*

*Corresponding Author: Robinson Sabino-Silva; Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuruama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil. Phone: +55 34 3218 2100. E-mail: robinsonsabino@gmail.com

ABSTRACT

Neonatal sepsis is a critical cause of morbidity and mortality affecting up to 2 cases per 1000 live births. There is a lack of diagnostic platforms for late-onset neonatal sepsis with reduced time to deliver results, which can provide suitable platforms for early diagnostics. The present study aimed to determine the discriminatory accuracy of a biophotonic Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy coupled with univariate analysis for late-onset neonatal sepsis and matched-control without sepsis in preterm-neonates. Here, an ultra-low volume of urinary samples from 45 samples, 6 late-onset sepsis in neonates, and 39 matched-control without sepsis in neonates were analyzed in a biophotonic coupled to univariate analysis associated with the receiver operating characteristic (ROC) curve. We demonstrated that three urinary vibrational modes of late-onset neonatal sepsis patients were distinct ($p < 0.05$) from matched-control without sepsis. The vibrational modes 1337, 1152, and 1107 cm^{-1} were selected as potential infrared vibrational modes to discriminate late-onset neonatal sepsis. The vibrational mode at 1516 cm^{-1} presented a sensitivity of 100% and specificity of 92.31% also suggesting a potential use in infrared discriminatory analysis for late-onset neonatal sepsis. After validation with additional studies in higher cohorts, the vibrational modes at 1516, 1337, 1152 and 1107 cm^{-1} present potential to be applied in screening or diagnostic platforms for late-onset neonatal sepsis detection. The feasibility of execution in a biophotonic platform that delivers fast results from a 2 μl drop of urine indicates potential application as a proof-of-concept for late-onset neonatal sepsis detection.

Keywords: Late-onset neonatal sepsis, urine, infrared spectroscopy, ATR-FTIR spectroscopy; Screening; Biomarkers

INTRODUCTION

The Millennium Development Goals proposed by United Nations suggest a global action focusing on the reduction in child mortality. The neonatal mortality rate is an outstanding mirror of several features of quality of life including access to adequate nutrition and food, sanitation, housing infrastructure quality with clean water, and access to adequate therapeutic procedures in public health services, including sepsis treatment [1]. Although it is critical to point out the huge disparities in the neonatal mortality rate worldwide, the neonatal period comprising by is the most vulnerable risk of dying for a child [1]. The Group for Child Mortality of the United Nations estimates the average global rate for neonatal mortality was 18 deaths per 1,000 live births in 2021 [2].

From the perspective of neonatal mortality in newborns, neonatal sepsis is a critical cause of morbidity and mortality affecting up to 2 cases per 1000 live births [3]. Neonatal sepsis is a clinical infection caused by bacteria, viruses, or fungi in blood circulation in the neonatal period. Neonatal sepsis can be detected by culture of a specific pathogen in blood, urine, or cerebrospinal fluid (CSF) culture [4]. Neonatal sepsis is divided into three groups: early-onset neonatal sepsis, late-onset neonatal sepsis, and very late-onset neonatal sepsis according to the time of the onset [5]. According to the time of onset, sepsis is classified into early-onset (EOS) when infection occurs before 72 h of life and late-onset sepsis (LOS) when it occurs after 72 h [4]. The clinical symptomatology of neonatal sepsis is random and nonspecific including fever, respiratory distress, behavioral changes such as lethargy or irritability, convulsions, and bleeding [6].

Despite advances to an early diagnosis of neonatal sepsis, this condition needs confirmatory analysis due to the inespecific symptomatology. The early and highly accurate diagnosis of neonatal sepsis is critical to decreasing the overuse of antibiotics and improving clinical outcomes in the neonatal period. Currently, due to the absence of appropriate

diagnostic tests for neonatal sepsis, pathogen detection which requires time-consuming biofluid culture samples remains a gold standard technique. However, blood culture results are frequently delivered over 72 h to detect a pathogen in the clinical routine. Besides, often is necessary additional time to analyze antibiotic susceptibility [7], which can lead to the overuse of antibiotics or delay critical therapeutic decision-making in the medical clinic. It is expected that cutting-edge platforms can overcome current limitations in the late-onset neonatal sepsis. The suggestion of biomarkers using mass spectrometry related to cell adhesion molecules, interleukins, and acute phase inflammatory components in neonatal sepsis [8], suggests the potential for infrared analysis in biofluids

.Sustainable technologies such as Attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy can offer a reagent-free, fast, and highly reproducible analytical platform applied device used to molecular analysis. It can be applied for molecular characterization with diagnostic purposes in biofluids [9; 10]. Each molecule in a biofluid depicts a unique profile with a unique infrared biophotonic signature. Considering the absence of the hazardous reagent application, ATR-FTIR is a promising green technology for the diagnostic field [11]. To our knowledge, the potential of urinary diagnostics for late-onset neonatal sepsis by ATR-FTIR spectroscopy was never been evaluated.

In the present study, we tested the hypothesis that non-invasive infrared spectral markers can be differentially expressed in the urine of late-onset neonatal sepsis in preterm neonates to be employed as non-invasive biomarkers in alternative detection platforms for late-onset neonatal sepsis. Thus, the present study aimed to determine the discriminatory accuracy of the ATR-FTIR platform coupled with univariate analysis for late-onset neonatal sepsis detection.

METHODS

Subjects and sample

Written informed consent was obtained from all the caregivers of in preterm neonates participants in this study. The research protocol followed the Standard for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies (STARD) statement. These experimental procedures approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia approved the study (Protocol # CAAE:36471314.5.0000.5152). The methods were carried out under the approved guidelines. The samples from late-onset neonatal sepsis and controls were carefully conducted using a protocol from the Neonatal Unit of the Clinical Hospital at the Federal University of Uberlandia. Of the 190 in preterm neonates eligible for inclusion in the study, 145 were excluded, 45 for having early sepsis (up to 72 hours of life) or late sepsis after the 8th day of life; 106 in preterm neonates were excluded due to suspected sepsis without confirmation with positive blood culture (HMC +) and/or with an infectious risk and/or with a presumed infectious process and/or with the use of antibiotics in the first 7 days of life. Of the remaining in preterm neonates, 45 were included in the study, 6 with late-onset neonatal sepsis (HMC+ up to the 7th day of life), and the other 39 in preterm neonates were used as control because they did not have any clinical or laboratory signs that would indicate late-onset neonatal sepsis. Urine was collected from in preterm neonates directly to a polypropylene device to minimize contamination with other pathogens or biofluids.

Chemical profile of unstimulated urine by ATR-FTIR Spectroscopy

ATR-FTIR spectrophotometer Vertex 70 (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) was used to record infrared spectra in the range of 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} region coupled to a micro-attenuated total reflectance (ATR) device. This ATR device is a high-refractive diamond component in an internal-reflection element [11; 10]. The urinary pellicle was

measured directly into the diamond disc. The infrared light is reflected at the interface toward the urine sample in the diamond disc, resulting in specific signature profile waves. The urine (2 μ L) from matched-controls preterm neonates without sepsis and late-onset neonatal sepsis in preterm neonates were dried using airflow on ATR-crystal for 3 min before recording urinary spectra in duplicate. The air spectrum was considered as a background in all ATR-FTIR sample analyses. Urinary pellicle spectra and background were captured with 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans [9, 12].

Spectra data evaluation procedures

The spectra were normalized by the vector method and adjusted to rubber band baseline correction. The obtained band areas were performed using Opus 6.5 software (Bruker Optics, Reinstetten, Germany). The original data were plotted in the Origin Pro 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA) software to create the second derivative analysis. The second derivative was obtained by applying the Savitzky-Golay algorithm with polynomial order 5 and 20 points of the window. The normalization of second derivatives was made by mean, and the peak heights indicated the intensity of each urinary component [13].

Band areas were calculated from normalized and baseline corrected spectra using OPUS software. Sensitivity and specificity values were calculated based on the external test set as follows:

The specificity or true negative rate is defined as the percentage of rats who are correctly identified as being control:

$$\text{Specificity} = TN / (TN + FP)$$

The quantity 1-specificity is the false positive rate and is the percentage of rats that are incorrectly identified as late-onset neonatal sepsis.

The sensitivity or true positive rate is defined as the percentage of rats who are correctly identified as having late-onset neonatal sepsis:

$$\text{Sensitivity} = TP / TP + FN$$

where TP stands for true positives; TN for true negatives; FP for false positives; and FN for false negatives [14].

Statistical analysis

The data of the band area were analyzed using the Student's t-test. For all spectral band candidates, we constructed the ROC curve and computed the AUC value, sensitivity, and specificity by numerical integration of the ROC curve. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to test the normality of the variables. All these analyses were performed using the software GraphPad Prism (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Only values of $p < 0.05$ were considered significant and the results were expressed as mean $\pm$ S.D [14].

RESULTS

Characterization of late-onset neonatal sepsis

A total of 190 in preterm neonates with gestational age of less than 34 weeks and birth weight of less than 1500 grams were eligible. Of these, 39 in preterm neonates were removed from the study due to confirmation of sepsis before 72 hours or detection of sepsis after the eighth day of life. 106 were excluded from other clinical demographic characteristics. The total sample included 45 samples, 6 late-onset neonatal sepsis in preterm neonates, and 39 matched-control without sepsis in preterm neonates. The demographic and clinical characteristics of all in preterm neonates are depicted in Table 1. The gestational age, birth

weight, gender proportion, and Score for Neonatal Acute, by Physiology and SNAP Perinatal Extension (SNAPPE II) were similar in both studied groups.

Table 1. Demography characteristics of preterm neonates without sepsis subjects and late-onset neonatal sepsis in preterm neonates.

Variables	Late-onset neonatal sepsis (N=6)	Control (N=39)	P value
Gestational age (Weeks)	27,17 ($\pm 2,31$)	29,36 ($\pm 2,09$)	0,0232
Birth weight (grams)	962,5 ($\pm 267,1$)	1144 ($\pm 266,7$)	0,1274
Gender (%)			
Male	50%	36,84%	
Female	50%	63,16%	0,6619
SNAPPE II	26,5 (10-70)	20 (0-81)	0,1764

Average spectra of urine

A representative infrared average spectrum of urine from late-onset neonatal sepsis in preterm neonates and in preterm neonates without sepsis is represented in Figure 1. These urinary indicates the presence of lipids, proteins, and carbohydrates in all samples collected from late-onset neonatal sepsis and matched-controls in preterm neonates.

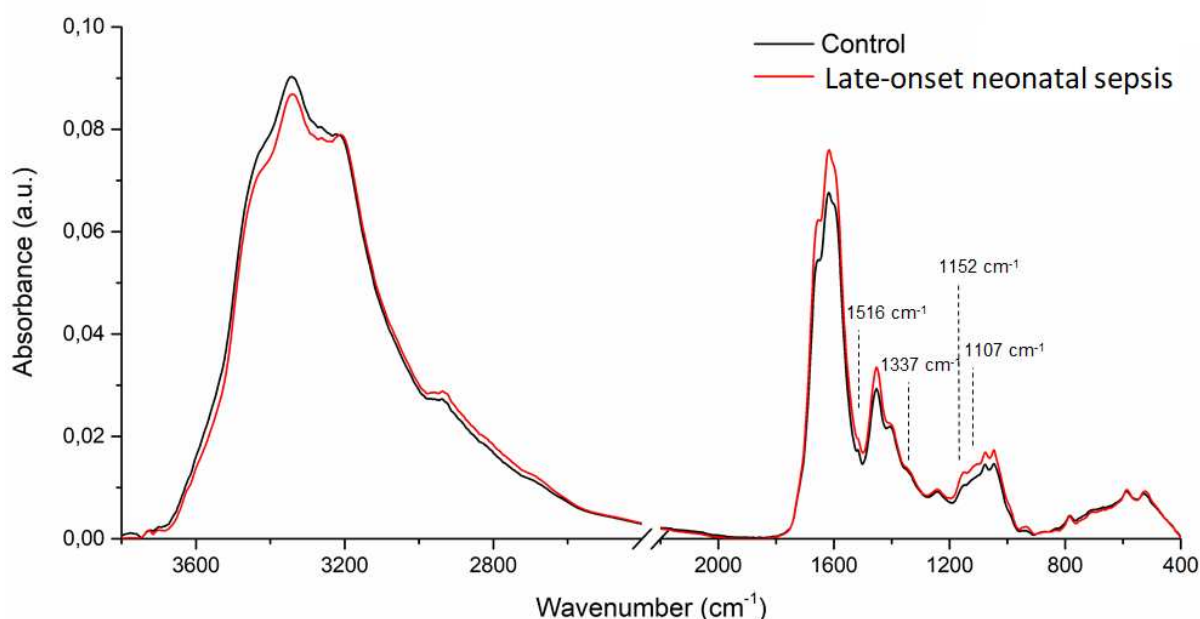


Figure 1. Average ATR-FTIR spectra (4000-400 cm^{-1}) in the urine of late-onset neonatal sepsis in preterm neonates and matched-controls in preterm neonates without sepsis.

Spectral bands analyzed by IR spectroscopy

Spectral band areas that indicate the intensity of specific molecules were analyzed in urine. The bands with similar expressions ($p > 0.05$) were not described here. Figure 2 indicates the intensity of four vibrational modes with respective ROC curve analysis. The vibrational mode at 1337 cm^{-1} was higher ($p < 0.05$) in late-onset neonatal sepsis in preterm neonates compared to in preterm neonates without sepsis. In this univariate analysis, using a cutoff value of 0.005 the corresponding sensitivity and specificity were 66.67% and 89.74%, respectively, with an area under the curve (AUC) of 0.7628 ($p: 0.04$) (Figure 2A). The

vibrational mode at 1152 cm^{-1} was also higher ($p < 0.05$) in late-onset neonatal sepsis in preterm neonates compared to matched-control in preterm neonates without sepsis. In this univariate analysis, using a cutoff value of 0.03216 the corresponding sensitivity and specificity were 83.33% and 71.79%, respectively with an area under the curve (AUC) of 0.8483 ($p: 0.0065$) (Figure 2B). The vibrational mode at 1107 cm^{-1} was also higher ($p < 0.05$) in late-onset neonatal sepsis in preterm neonates compared to in preterm neonates without sepsis. In this univariate analysis, using a cutoff value of 0.0002 the corresponding sensitivity and specificity were 66.67% and 100%, respectively with an area under curve (AUC) of 0.8333 ($p: 0.0092$) (Figure 2C). The vibrational mode at 586 cm^{-1} was also higher ($p < 0.05$) in late-onset neonatal sepsis in preterm neonates compared to controls. In this univariate analysis, using a cutoff value of 0.04133 the corresponding sensitivity and specificity were 66.67% and 78.95%, respectively with an area under the curve (AUC) of 0.7763 ($p: 0.0312$) (Figure 2D). The suggested assignments of the main wavenumbers evaluated are described in Table 2.

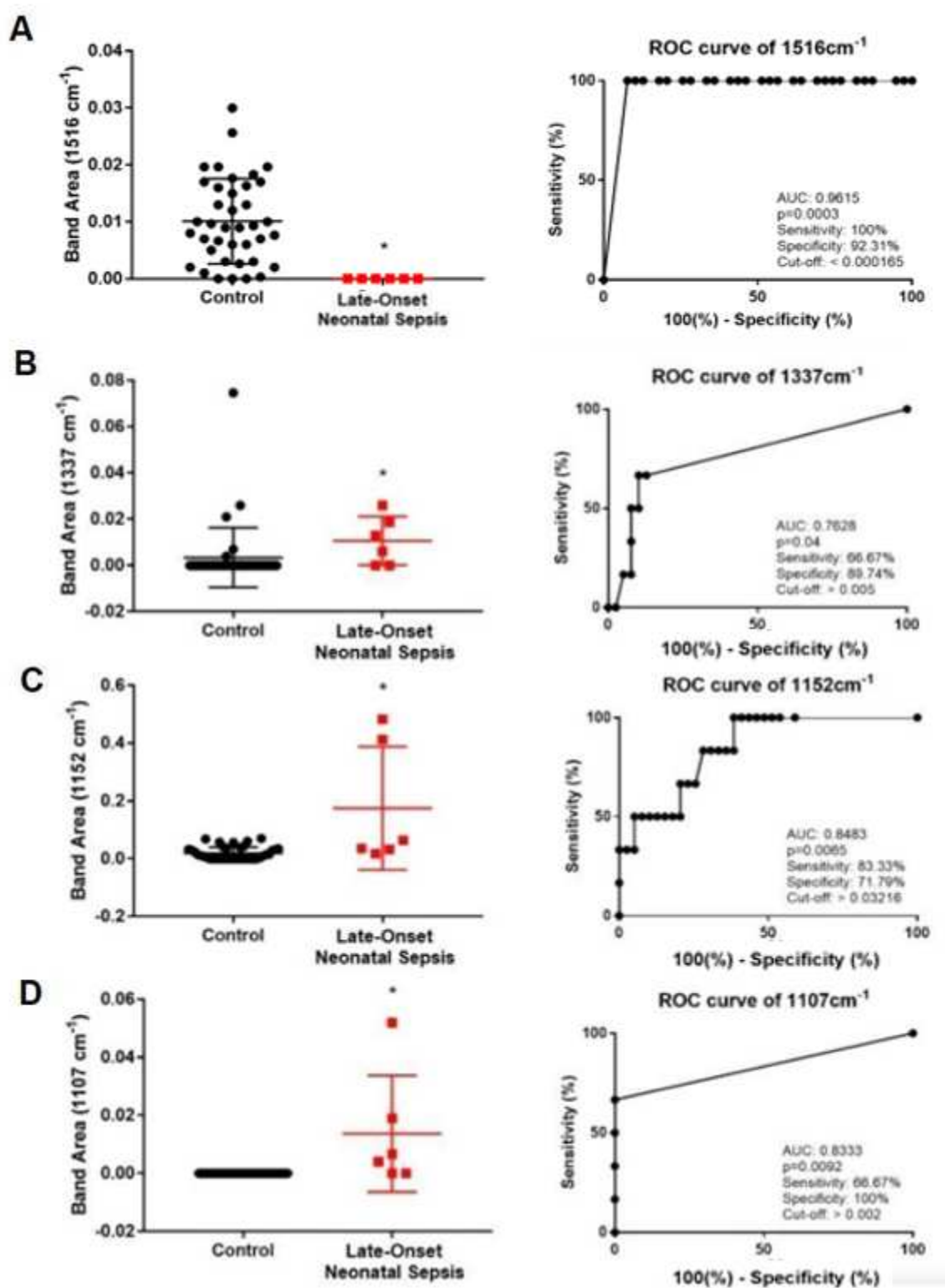


Figure 2. The intensity of vibrational modes at 1516, 1337, 1152, and 1107 cm^{-1} with respective ROC curve analysis.

Table 2. Proposed assignments to vibrational modes used to discriminate late-onset neonatal sepsis using urine [15].

Vibrational mode	Proposed vibrational mode	Molecular source
1516	Amide	Proteins
1337	CH ring from polysaccharides	Carbohydrates
1152	Glycogen-derived C-O stretching	Carbohydrates
1107	CO ring from polysaccharides	Carbohydrates

DISCUSSION

This proof-of-concept study indicates that the vibrational modes at 1516 cm^{-1} , 1337 cm^{-1} , 1152 cm^{-1} , and 1107 cm^{-1} are candidates to be used in the discrimination of late-onset neonatal sepsis using a biphotonic infrared platform coupled to univariate analysis. The potential application of the ATR-FTIR platform in urinary samples is attractive due to its potential to provide a novel strategy for a rapid delivery result using a reagent-free technology with a higher sustainability index for late-onset neonatal sepsis detection. Three of four suggested vibrational modes are suggested to be related to carbohydrate components, indicating potential alterations in glucose metabolism and the presence of glycans in urine.

Blood culture is considered a gold standard technique for late-onset neonatal sepsis diagnostics, however, the results frequently are delivered after 72 hours. Besides, the sensitivity is increased in automated blood cultures, which is not frequent in low- and middle-income countries [16]. Following bacterial levels, this technique can also present false-negative results [17]. Although the incidence of late-onset neonatal sepsis in neonates with very low birth weight is around 10 times higher than early-onset neonatal sepsis [18], biomarkers for late-onset neonatal sepsis are still quite scarce, with more studies focused in

early-onset neonatal sepsis [19]. Besides, most late-onset neonatal sepsis biomarkers were focused on serum samples, and it is still necessary to increase the levels of sensitivity and specificity of these biomarkers [20]. It was shown that C-reactive protein (CRP), high sensitivity CRP(hs-CRP), presepsin, procalcitonin (PCT), and interleukin-6 (IL-6) can be used as alternative analysis using platforms coupled with toxic reagents in the late onset neonatal sepsis detection [21]. This study suggested in serum samples a cutoff value >6 mg/dl for CRP, a cutoff value of >140 ng/ml for hsCRP, a cutoff value of >200 ng/ml for presepsin, a cutoff value of >389 pg/ml for PCT [21], and a cutoff value > 22 pg/ml for IL-6. However, these cutoff values probably need to be adjusted in different diagnostic laboratories and change the expected accuracy.

The discriminatory vibrational modes in urinary samples of sepsis in neonates with late-onset neonatal sepsis compared to matched controls without sepsis were related to the amide region (1516 cm^{-1}), (CH ring from polysaccharides (1337 cm^{-1}), glycogen-derived C-O stretching (1152 cm^{-1}), and CO ring from polysaccharides (1107 cm^{-1}). In this context, a previous study indicates that hyperglycemia in preterm neonates can be an alternative biomarker for invasive fungal infection [22]. Besides, a parallel elevation was detected in cellular glucose uptake with increasing bacterial levels in preterm neonates [23]. Continuous glucose monitoring can be useful for optimal blood glucose control, and reducing the risk of neonatal complications in preterm neonates [24]. These vibrational modes at 1516 cm^{-1} , 1337 cm^{-1} , 1152 cm^{-1} , and 1107 cm^{-1} in the univariate analysis could present limitations about reproducibility when applied on a larger scale in clinical neonatal practice for late-onset neonatal sepsis. On the other hand, this proof-of-concept study opens perspectives for the development of an innovative platform based on a sustainable biophotonic platform, without the use of reagents and that can make a faster release of results, allowing in the future a

reduction of over-treatment in the neonatal ICU due to the delay in the release of results by the available technologies and also earlier detection that allows adequate therapy.

In conclusion, this proof-of-concept study is pioneering to suggest ATR-FTIR spectroscopy to detect late-onset neonatal sepsis in preterm neonates compared with matched-controls preterm neonates with a gestational age of fewer than 34 weeks and very low weight on birth. Our study also highlighted the potential application of vibrational modes at 1516 cm^{-1} , 1337 cm^{-1} , 1152 cm^{-1} , and 1107 cm^{-1} related to CH ring from amides, polysaccharides, glycogen-derived C-O stretching, and CO ring from polysaccharides, respectively, for late-onset neonatal sepsis detection indicating a potential role of carbohydrates metabolites for this purpose. In summary, these novel data suggest that non-invasive urinary analysis by ATR-FTIR spectroscopy is a promising tool for late-onset neonatal sepsis detection.

ACKNOWLEDGEMENT AND FUNDING

This research was supported by a grant from the National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0, 403193/2022-2), CAPES—Prevention and Combat of Outbreaks, Endemics, Epidemics, and Pandemics (#23038.014934/2020-59), FAPEMIG (#APQ-02872-16, INCT TeraNano APQ-03613-17, APQ-00476-20, APQ-02148-21, APQ-01487-22, APQ-04686-22)), CNPq #409157/2022-8, Federal University of Uberlandia and Sabino-Silva, R. received a fellowship from FAU-ImunoScan-UFU, CNPq productivity fellowship (306050/2021-8), and PrInt CAPES/UFU.

REFERENCES

1- GBD 2019 Under-5 Mortality Collaborators. Global, regional, and national progress towards Sustainable Development Goal 3.2 for neonatal and child health: all-cause

and cause-specific mortality findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2021;398(10303):870-905. doi:10.1016/S0140-6736(21)01207-1

2 - Guinsburg R, Sanudo A, Kiffer CRV, et al. Annual trend of neonatal mortality and its underlying causes: population-based study - São Paulo State, Brazil, 2004-2013. *BMC Pediatr*. 2021;21(1):54. Published 2021 Jan 26. doi:10.1186/s12887-021-02511-8

3- van den Hoogen A, Gerards LJ, Verboon-Maciolek MA, Fleer A, Krediet TG. Long-term trends in the epidemiology of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility of causative agents. *Neonatology*. 2010;97(1):22-28. doi:10.1159/000226604

4- Sofouli GA, Tsintoni A, Fouzas S, Verveniotti A, Gkentzi D, Dimitriou G. Early Diagnosis of Late-Onset Neonatal Sepsis Using a Sepsis Prediction Score. *Microorganisms*. 2023;11(2):235. Published 2023 Jan 17. doi:10.3390/microorganisms11020235

5- Odabasi IO, Bulbul A. Neonatal Sepsis. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul*. 2020;54(2):142-158. Published 2020 Jun 12. doi:10.14744/SEMB.2020.00236

6- Jatsho J, Nishizawa Y, Pelzom D, Sharma R. Clinical and Bacteriological Profile of Neonatal Sepsis: A Prospective Hospital-Based Study. *Int J Pediatr*. 2020;2020:1835945. Published 2020 Aug 26. doi:10.1155/2020/1835945

7- Duncan CF, Youngstein T, Kirrane MD, Lonsdale DO. Diagnostic Challenges in Sepsis. *Curr Infect Dis Rep*. 2021;23(12):22. doi:10.1007/s11908-021-00765-y

8- Celik IH, Hanna M, Canpolat FE, Mohan Pammi. Diagnosis of neonatal sepsis: the past, present and future. *Pediatr Res*. 2022;91(2):337-350. doi:10.1038/s41390-021-01696-z

9- Caixeta DC, Lima C, Xu Y, et al. Monitoring glucose levels in urine using FTIR spectroscopy combined with univariate and multivariate statistical methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2023;290:122259. doi:10.1016/j.saa.2022.122259

10- Caixeta DC, Carneiro MG, Rodrigues R, et al. Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diagnostics (Basel)*. 2023;13(8):1396. Published 2023 Apr 12. doi:10.3390/diagnostics13081396

- 11-** Oliveira SW, Cardoso-Sousa L, Georjutti RP, et al. Salivary Detection of Zika Virus Infection Using ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Machine Learning Algorithms and Univariate Analysis: A Proof-of-Concept Animal Study. *Diagnostics (Basel)*. 2023;13(8):1443. Published 2023 Apr 17. doi:10.3390/diagnostics13081443
- 12-** Muraoka MY, Justino AB, Caixeta DC, Queiroz JS, Sabino-Silva R, Salmen Espindola F. Fructose and methylglyoxal-induced glycation alters structural and functional properties of salivary proteins, albumin and lysozyme. *PLoS One*. 2022;17(1):e0262369. Published 2022 Jan 21. doi:10.1371/journal.pone.0262369
- 13-** Rodrigues RP, Aguiar EM, Cardoso-Sousa L, et al. Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Braz Dent J*. 2019;30(5):437-445. Published 2019 Oct 7. doi:10.1590/0103-6440201902228
- 14-** Caixeta DC, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, et al. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One*. 2020;15(3):e0223461. Published 2020 Mar 17. doi:10.1371/journal.pone.0223461
- 15-** Movasaghi Z., Rehman S. & ur Rehman D. I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2008;43, 134-179, doi:10.1080/05704920701829043
- 16 -** Bromiker R, Elron E, Klinger G. Do Neonatal Infections Require a Positive Blood Culture?. *Am J Perinatol*. 2020;37(S 02):S18-S21. doi:10.1055/s-0040-1714079
- 17-** Dong Y, Speer CP. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100(3):F257-F263. doi:10.1136/archdischild-2014-306213
- 18-** Bustos B R, Araneda C H. Procalcitonina para el diagnóstico de la sepsis tardía en recién nacidos de muy bajo peso de nacimiento [Procalcitonin for the diagnosis of late onset sepsis in newborns of very low birth weight]. *Rev Chilena Infectol*. 2012;29(5):511-516. doi:10.4067/S0716-10182012000600005
- 19-** Gilfillan M, Bhandari V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. *Early Hum Dev*. 2017;105:25-33. doi:10.1016/j.earlhumdev.2016.12.002
- 20-** Abdollahi A, Shoar S, Nayyeri F, Shariat M. Diagnostic Value of Simultaneous Measurement of Procalcitonin, Interleukin-6 and hs-CRP in Prediction of Early-Onset

Neonatal Sepsis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012028.
doi:10.4084/MJHID.2012.028

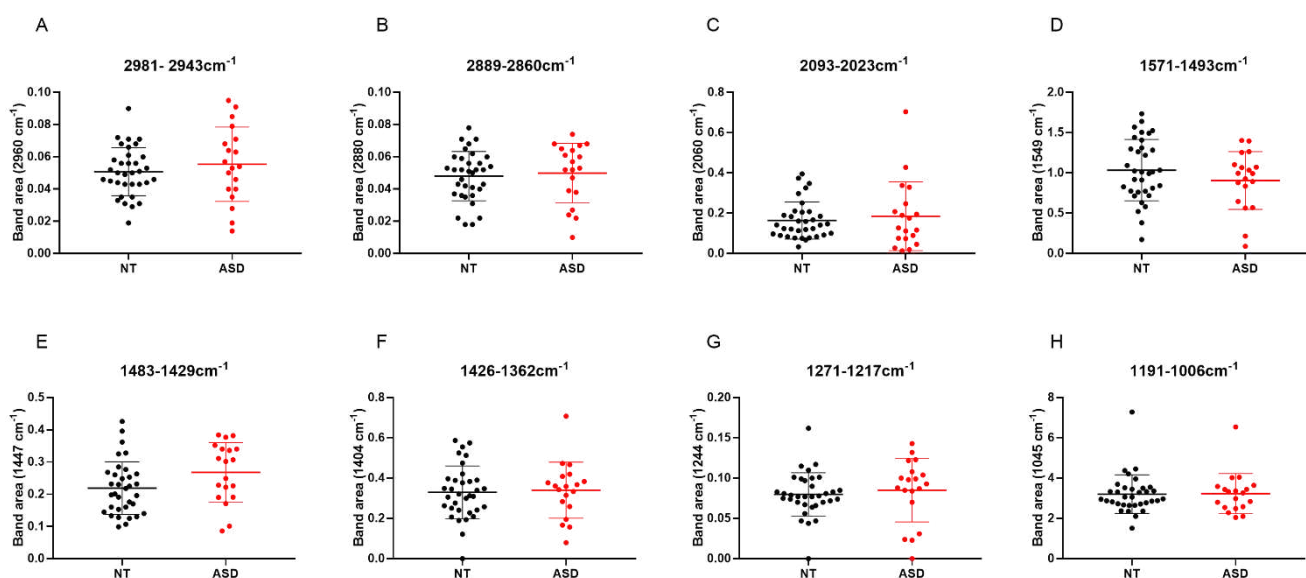
21- Rashwan NI, Hassan MH, Mohey El-Deen ZM, Ahmed AE. Validity of biomarkers in screening for neonatal sepsis - A single center -hospital based study. *Pediatr Neonatol*. 2019;60(2):149-155. doi:10.1016/j.pedneo.2018.05.001

22- Manzoni P, Castagnola E, Mostert M, Sala U, Galletto P, Gomirato G. Hyperglycaemia as a possible marker of invasive fungal infection in preterm neonates. *Acta Paediatr*. 2006;95(4):486-493. doi:10.1080/08035250500444867

23- Muk T, Brunse A, Henriksen NL, Aasmul-Olsen K, Nguyen DN. Glucose supply and glycolysis inhibition shape the clinical fate of *Staphylococcus epidermidis*-infected preterm newborns. *JCI Insight*. 2022;7(11):e157234. Published 2022 Jun 8. doi:10.1172/jci.insight.157234

24- Beardsall K. Hyperglycaemia in the Newborn Infant. Physiology Verses Pathology. *Front Pediatr*. 2021;9:641306. Published 2021 Jul 21. doi:10.3389/fped.2021.641306

Supplemewithout sepsisary Figure



Supplemewithout sepsisary Fig. 1 Specific band areas between WITHOUT SEPSIS and LATE-ONSET NEONATAL SEPSIS (A-H). $p > 0.05$

5. REFERÊNCIAS

- ADAMS-CHAPMAN, Ira; STOLL, Barbara J. Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 3, p. 290-297, 2006. doi: 10.1097/01.qco.0000224825.57976.87.
- ANDREJAITE, Judita. The diagnostic value of procalcitonin in severe sepsis. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 42, n. 1, p. 69-78, 2006.
- BEKHOF, Jolita et al. Clinical signs to identify late-onset sepsis in preterm infants. **European journal of pediatrics**, v. 172, p. 501-508, 2013.
- BENITZ, William E. Adjunct laboratory tests in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. **Clinics in perinatology**, v. 37, n. 2, p. 421-438, 2010.
- BERLAK, Neta et al. Late onset sepsis: comparison between coagulase-negative staphylococci and other bacteria in the neonatal intensive care unit. **Infectious Diseases**, v. 50, n. 10, p. 764-770, 2018. doi: 10.1080/23744235.2018.1487075.
- BIZZARRO, Matthew J. et al. Neonatal sepsis 2004-2013: the rise and fall of coagulase-negative staphylococci. **The Journal of pediatrics**, v. 166, n. 5, p. 1193-1199, 2015. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.02.009.
- BOGHOSSIAN, Nansi S. et al. Late-onset sepsis in very low birth weight infants from singleton and multiple-gestation births. **The Journal of pediatrics**, v. 162, n. 6, p. 1120-1124. e1, 2013.
- BURY, Gaelle et al. Diagnosis of neonatal late-onset infection in very preterm infant: inter-observer agreement and international classifications. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 3, p. 882, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph18030882>
- CHAUHAN, Nidhi; TIWARI, Sukirti; JAIN, Utkarsh. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: an overview. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 234-242, 2017.
- CARROL, E. D.; THOMSON, A. P. J.; HART, C. A. Procalcitonin as a marker of sepsis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2002.

CIMIOTTI, Jeannie P. et al. Impact of staffing on bloodstream infections in the neonatal intensive care unit. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 160, n. 8, p. 832-836, 2006.

CORONELL, Wilfrido et al. Sepsis neonatal. **Revista de enfermedades infecciosas en pediatría**, v. 22, n. 90, p. 57-68, 2009.

ERSHAD, Muhammed et al. Neonatal sepsis. **Current emergency and hospital medicine reports**, v. 7, p. 83-90, 2019.

GANATRA, Hammad A.; STOLL, Barbara J.; ZAIDI, Anita KM. International perspective on early-onset neonatal sepsis. **Clinics in perinatology**, v. 37, n. 2, p. 501-523, 2010.

GOLDSTEIN, Brahm et al. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatric critical care medicine**, v. 6, n. 1, p. 2-8, 2005.

GRAHAM III, Philip L. et al. Risk factors for late onset gram-negative sepsis in low birth weight infants hospitalized in the neonatal intensive care unit. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 25, n. 2, p. 113-117, 2006.

HAMMOUD, Majeda S. et al. Incidence, aetiology and resistance of late-onset neonatal sepsis: A five-year prospective study. **Journal of paediatrics and child health**, v. 48, n. 7, p. 604-609, 2012.

HARBARTH, Stephan et al. Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 20, n. 9, p. 598-603, 1999.

KAWASAKI, Tatsuya. Update on pediatric sepsis: a review. **Journal of Intensive Care**, v. 5, p. 1-12, 2017.

LANDRE-PEIGNE, C. et al. Efficacy of an infection control programme in reducing nosocomial bloodstream infections in a Senegalese neonatal unit. **Journal of hospital infection**, v. 79, n. 2, p. 161-165, 2011.

LEVY, Mitchell M. et al. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. **Intensive care medicine**, v. 29, p. 530-538, 2003.

LEVY, Ofer. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 5, p. 379-390, 2007.

LIU, Li et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2151-2161, 2012.

MANZONI, Paolo et al. Prevention of nosocomial infections in neonatal intensive care units. **American journal of perinatology**, v. 30, n. 02, p. 081-088, 2013.

MCGOVERN, Matthew et al. Challenges in developing a consensus definition of neonatal sepsis. **Pediatric research**, v. 88, n. 1, p. 14-26, 2020.

QUADIR, Ashfaq F.; BRITTON, Philip N. Procalcitonin and C-reactive protein as biomarkers for neonatal bacterial infection. **Journal of paediatrics and child health**, v. 54, n. 6, p. 695-699, 2018.

REGEV, Rivka H. et al. Association between neonatal morbidities and head growth from birth until discharge in very-low-birthweight infants born preterm: a population-based study. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 58, n. 11, p. 1159-1166, 2016.

ROSENFELD, Charles R. et al. Screening and serial neutrophil counts do not contribute to the recognition or diagnosis of late-onset neonatal sepsis. **The Journal of Pediatrics**, v. 205, p. 105-111. e2, 2019.

SHANE, Andi L.; SÁNCHEZ, Pablo J.; STOLL, Barbara J. Neonatal sepsis. **The lancet**, v. 390, n. 10104, p. 1770-1780, 2017.

SHARMA, Ashish Arunkumar et al. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. **Clinical Immunology**, v. 145, n. 1, p. 61-68, 2012.

PROCIANOY, Renato Soibelman; SILVEIRA, Rita C. The challenges of neonatal sepsis management. **Jornal de pediatria**, v. 96, p. 80-86, 2020.

STOLL, Barbara J. et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, v. 110, n. 2, p. 285-291, 2002.

SUGUNA NARASIMHULU, Sukumar et al. Usefulness of urinary immune biomarkers in the evaluation of neonatal sepsis: a pilot project. **Clinical Pediatrics**, v. 52, n. 6, p. 520-526, 2013.

SYLVESTER, Karl G. et al. Urine protein biomarkers for the diagnosis and prognosis of necrotizing enterocolitis in infants. **The Journal of pediatrics**, v. 164, n. 3, p. 607-612. e7, 2014.

TZIALLA, Chryssoula et al. Neonatal infections due to multi-resistant strains: Epidemiology, current treatment, emerging therapeutic approaches and prevention. **Clinica Chimica Acta**, v. 451, p. 71-77, 2015.

OLIVEIRA, Cinara Rejane Viana; SORTE, Ney Cristian Amaral Boa. Caracterização dos fatores de risco e ocorrência de óbito em recém-nascidos com diagnóstico de sepse neonatal em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e7811325941-e7811325941, 2022.

WATSON, R. Scott et al. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 167, n. 5, p. 695-701, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Born too soon: the global action report on preterm birth. 2012.

WYNN, James L.; POLIN, Richard A. Progress in the management of neonatal sepsis: the importance of a consensus definition. **Pediatric Research**, v. 83, n. 1, p. 13-15, 2018.