

Obrigada por ver esta apresentação
Gostaríamos de recordar-lhe que esta
apresentação é propriedade do autor.

É-lhe fornecida pela Sociedade Portuguesa de
Pediatria no contexto do 17º Congresso
Nacional de Pediatria, para seu uso pessoal,
tal como submetido pelo autor

© 2016 pelo autor

Biomarcadores de sépsis

Maria Teresa Neto

NMS/FCM
NICU/Hospital de Dona Estefânia/CHLC



Sumário

- Razões para um problema
 - Características de um bom marcador
 - Hemograma
 - Proteínas de fase aguda
 - Citocinas pró-inflamatórias
 - Marcadores de superfície celular
 - Conclusões
- 

Razões para um problema

1. Frequência da sepsis neonatal
2. Gravidade e letalidade da infecção
3. Consequências sobre outros órgãos
4. Sinais clínicos inespecíficos
5. Resultados culturais demorados ou falso negativos
6. Ausência de marcadores com sensibilidade e especificidade desejadas

Infecção no Registo Nacional

Infecção em UCIN

Número de registos - 42 757

Origem da infecção	<1500g	Todos
Materna	12,3%	9,7%
Hospitalar	31%	8,1%
Infecção Hospitalar /100 registos		8,1
Episódios de infecção hospitalar por RN infectado		1,3
Densidade de incidência de sépsis		6

Fonte: Registo Nacional das IACS em UCIN. DGS PPCIRA Departamento da Qualidade na Saúde. Acedido em Outubro de 2016

Letalidade da infeção

	Infeção precoce	Infeção hospitalar
Kuhn, 2010	1,2%	
Stoll, 2013	1,8%	
Joseph, 2012		5%
Portugal 2008-2016 Materna /hospitalar	2.4%	5%

Consequências

- Doença pulmonar crónica
- Lesão da substância branca
- Alterações do neurodesenvolvimento
 - Atraso cognitivo
 - Atraso motor
 - Atraso na linguagem
 - Retinopatia da prematuridade
 - Alterações da acuidade auditiva
- Morte

Boksa P, 2008; Adams-Chapman, 2012 ; Galinsky R 2013; Alistair J Gunn, Laura Bennet, Curr Opin Obst Gynecol 2008; Constantine MM et al, AJOG, 2007

Objectivos na decisão terapêutica

Infecção precoce ++

- Tratar de imediato RN doentes.
- Iniciar tratamento o mais cedo possível aos RN com suspeita de infecção.
- Minimizar o impacto das decisões que se tomem sobre mulheres e RN saudáveis.
- Minimizar a exposição aos antibióticos nos RN que não têm infecção.

Antibióticos de largo espectro no período neonatal imediato

Malefícios

- RN PN <1000g - Cursos iniciais de antibioticoterapia empírica superior a 5 dias – risco aumentado de morte e enterocolite necrosante.
- RN com IG<27 semanas - Cursos iniciais de antibioticoterapia de 7 ou mais dias – risco aumentado de infecção tardia.

Cotten, 2009; Tripathi, 2011; Alexander, 2011; Kuppala, 2011;

Sinais clínicos

Subtis, não específicos e difíceis de reconhecer

Sinais

- Gemido
- Polipneia
- Tiragem
- Palidez
- Má perfusão periférica
- Recusa alimentar
- Intolerância alimentar
- Hipotermia
- Episódios de apneia
- Hepatoesplenomegália

Podem simular:

- DMH
- Taquipneia transitória
- Persistência de canal arterial
- Apneia da prematuridade
- Síndrome de aspiração meconial
- Agudização de doença pulmonar crónica
- Erros inatos metabolismo
- Cardiopatia congénita

Hemograma

- Glóbulos brancos – inespecífico, VPP baixo. Leucocitose/Leucopénia
- Neutrófilos – Ligeiramente mais sensível que a contagem leucocitária. Neutropénia – hipertensão materna, asfixia grave, HIPV
- Relação neutrófilos imaturos/neutrófilos totais. Sensibilidade entre 60 a 90%. Valor máximo admitidos às 24h - 0,16. VPP baixo. A usar em combinação
- Trombocitopenia

Microrganismos e formas de estar

Os microrganismos podem existir no sangue sob várias formas:

- Bactérias viáveis;
- Bactérias intracelulares ou fagocitadas;
- Bactérias não viáveis;
- Ácido nucleico livre de células bacterianas lisadas.

Jordan, 2010

Hemocultura

Exige bactérias viáveis

- Falsos negativos
 - Bacteriemia transitória
 - Bacteriemia intermitente
 - Volume da amostra e número de colheitas
 - Antibioticoterapia prévia (ao RN ou à mãe)
- Resultados demorados

RN com risco infeccioso
ou suspeita de infecção.
Clínica inespecífica

Na dúvida, inicia
antibióticos de largo
espectro

Hemocultura negativa.
Receio de parar antibióticos
Mantem antibióticos 10 dias....

Afinal era
canal arterial...

Risco aumentado de
colonização bacteriana, com
bactérias MR, imprintig para
NEC e sepsis tardia

Características de um bom marcador

Elevada sensibilidade

- Porque o doente pode morrer se não for diagnosticado e não morre por ser medicado sem estar doente

Elevada especificidade

- Evita tratar desnecessariamente RN não infectados

Características de um bom marcador

- Pequena amostra de sangue
- Bioquimicamente estável – transporte e tempo de espera
- Técnica rápida, simples, automatizada e de baixo custo



Características de um bom marcador

- Cut-off bem definido
- Diferenciar entre infecção bacteriana/vírica/fúngica
- Dar indicações sobre a doença:
 - Gravidade da infecção
 - Resposta à terapêutica
 - Fim da terapêutica
 - Prognóstico

Um bom marcador

Simplesmente não existe!

Ainda...



Bio Marcadores

- Proteínas de fase aguda – PCR, procalcitonina(PCT)
- Biomarcadores em desenvolvimento
 - Proteínas de fase aguda - Amilóide sérico A (SAA), proteína ligante do lipopolissacárido (LPB)
 - Citocinas pró-inflamatórias – IL6, IL8, TNF α , Interferon γ
 - Antígenos de superfície celular – CD11b, CD14; **CD64**; CD32; CD16; Cde69; sCD163
 - Pentraxin(PTX3) Angiopoietinas; suPAR; Receptor solúvel expresso nas células mielóides 1 (sTREM-1)

(Ng, 2010, Mally, 2014)

Proteínas de fase aguda PCR

- Produção induzida no hepatocito pela IL6
- Subida entre 4-6h / 10-12h de doença*
- Às 0h sensibilidade 75% especificidade 95%; às 12 /24h de doença tem sensibilidade 90% e especificidade 1
- Dá indicações sobre gravidade da doença e resposta aos antibióticos
- Resultados seriados negativos permitem negar infecção bacteriana às 24h/36h

* Depende dos estudos e dos autores

(Neto MT, 2004, dados não publicados; Ng 2010, Mally, 2014)

Proteínas de fase aguda

PCT

- A sua subida ocorre depois da subida de $\text{TNF}\alpha$ e IL6
- Positiva entre as 2h e as 4h de doença; pico às 6-8h, nível estável às 12h, semi-vida de 24 a 30h
- Na sépsis precoce tem sensibilidade 92%, especificidade 97%, VPP 94% e VPN 96%
- Varia com a idade pós-natal com valores elevados nas primeiras 48h de vida de RN saudáveis
- Não dá indicações sobre a causa nem a evolução da infecção
- É influenciado por asfixia perinatal, hemorragia intracraniana, hipoxémia e diabetes materna

(Neto MT, 2004, dados não publicados; Ng, 2010, Mally, 2014)

PCR e PCT

	Início da subida	Anormal	Semi vida	Utilidade imediata	Marcador único?
PCR	4-6h após início da infecção	24h	24 a 48h	Valores repetidos negativos às 24/36h de sintomas indicam não infecção. Permite avaliar resposta à terapêutica e decidir a sua duração. Mais útil na sepsis tardia. Influenciada por cirurgia, SAM, lesão tecidular	Não. Deve ser usada com Hemograma, relação NI/NT
PCT	2-4h após início da infecção		24 a 30h	Variação contínua nas primeiras 48h de vida. Mais sensível que PCR Influenciado por DMH e diabetes materna, HIC, asfixia, hipoxémia	Não. Deve ser usada com PCR. Mantêm-se elevada mais tempo que IL6 e TNF.

Biomarcadores em desenvolvimento



Proteínas de fase aguda

- Amilóide sérico A (SAA)
 - Elevada sensibilidade (96%) e VPP 85%
 - Facilidade em ser integrado em pacotes de diagnóstico
 - Valor prognóstico
 - Tem limitações relacionadas com função hepática e estado nutricional
 - Valores com grandes intervalos que aumentam com a idade
- Proteína ligante do lipopolissacárido (LPB)
 - Sobe às 6-8h de infecção
 - Elevada sensibilidade e VPN
 - Pode ser determinada usando métodos analíticos padronizados
 - Pequenas variações fisiológicas nas primeiras 48h de vida
 - São necessários mais estudos

Citocinas pró-inflamatórias

TNF α

- É uma citocina proximal – a primeira a ser produzida na situação de infecção.
- Induz a produção de IL6 (citocina distal)
- Existência fugaz pelo que é difícil estudar a dinâmica
- Dá indicações sobre prognóstico – valores elevados estão associados a morbilidade e mortalidade elevadas

Citocinas pró-inflamatórias

IL6

- Sobe rapidamente após exposição a produtos bacterianos. Precede a subida da PCR
- No sangue do cordão tem sensibilidade e VPN de até 100% no diagnóstico de infecção precoce
- Semi-vida muito curta. Pode negativar em 24h após início de antibiótico
- Janela de oportunidade muito curta, beneficia adição a um marcador tardio (PCR)
- IL6 e PCR em conjunto podem evitar o uso de antibióticos em RN com suspeita de infecção precoce
- Não dá indicações sobre evolução da infecção

Citocinas pró-inflamatórias

IL8

- Sobe em 2h a 4h após início da infecção
- Diminui rapidamente a partir das 4h
- Sensibilidade 90% e especificidade entre 75% e 100%
- IL8 e PCR em conjunto podem evitar o uso de antibióticos em RN com suspeita de infecção
- Não dá indicações sobre evolução da infecção

Marcadores de superfície celular

- Os antigénios de superfície das células inflamatórias circulantes (neutrófilos, linfocitos, monocitos, natural *Killer Cells*), são activados pela infecção
- As técnicas de citometria de fluxo possibilitam a sua identificação e quantificação



Antigénios de superfície dos leucocitos

Possíveis marcadores de infecção

- CD11b
- CD64



Antigénios de superfície dos leucocitos CD11b

- Antigénio de superfície dos neutrófilos e monocitos.
- Com determinações diárias, foi demonstrada a subida 3 dias antes da colheita de sangue para hemocultura em RNPT.
- Sensibilidade e especificidade: 100% e 56% para os neutrófilos e 86% e 94% para os monocitos
- Poucos estudos, poucos doentes
- Influenciados por condições não infecciosas (DMH)

Antigénios de superfície dos leucocitos CD64

- É o mais bem posicionado como muito bom marcador no diagnóstico de infecção bacteriana co-natal, precoce e tardia
- RN de termo e PT - Aumenta em resposta a situações infecciosas
- RN termo - Sepsis precoce e pneumonia – sensibilidade 96%, especificidade 81%. Sem potenciação com IL6 ou PCR
- Sepsis tardia e ECN - Sensibilidade e especificidade elevadas (95% a 97% e 88% a 90%) no início e até 24h depois de infecção. Sensibilidade potenciada se concomitante com IL6 ou PCR (100%)

IL6 e CD64

“Marcadores adjuntos”

	Utilidade imediata	Marcador único?
IL6	Elevada muito precocemente, antes de sinais clínicos de infecção. Fugaz - pode já ser negativa quando outros marcadores estão ainda a subir.	Não
CD64 (dos neutrófilos)	Os resultados disponíveis dizem respeito a estudos limitados e bem definidos pelo que é difícil generalizar. Em investigação.	Não

Valor diagnóstico cumulativo

Hora 0

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
TNF α + IL6 + PCR	90%			90%
PCR + TNF α	88%	57%	39%	94%
PCR + IL6	83%	79%	66%	95%
PCR + IL8	86%	75%	53%	95%
PCR + PCT	74%	57%	53%	77%

Conclusão

- Nenhum marcador isolado tem vantagens sobre qualquer outro
- Dos comumente utilizados sabemos que nenhum deve ser interpretado isoladamente
- Dos mais raros em estudo sabemos que nenhum pode ser utilizado isoladamente
- Clínica e combinações de marcadores, podem ajudar a decidir correctamente a prescrição de antibióticos, abstenção de terapêutica ou paragem da mesma
- A PCR é o marcador mais estudado. Beneficia se adicionado à PCT ou às IL6/IL8



Outros meios de cultura

- Urina
- Saliva



Técnicas de identificação bacteriana

- Biologia molecular

- Plataformas multiplex podem medir múltiplos marcadores – proteínas, DNA, RNA, por técnicas FISH, PCR quantificada ou outras
- O doente pode estar já sob antibioticoterapia. Não necessita microrganismos vivos
- Poupança de tempo e de trabalho no laboratório
- Limitações: ausência de sequência genética para muitas bactérias; resistência da parede celular à digestão limitando a extracção de DNA

- Tecnologia Ómica

- Genómica
- Proteómica – Necessita bactérias viáveis. Poupança de tempo e de trabalho no laboratório
- Metabolómica - Grande expectativa. Possibilidade de diagnosticar infecção antes do aparecimento dos sinais clínicos