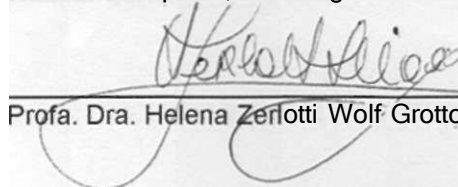


BÁRBARA LIMA DOS ANJOS

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FCM/UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas, da aluna Bárbara Lima dos Anjos, RA: 049983. Campinas, 28 de agosto de 2009.



Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto - Orientadora

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE FASE AGUDA EM CRIANÇAS
ATENDIDAS EM UM SERVIÇO DE URGÊNCIA.**

CAMPINAS - SP

UNICAMP

2009

BÁRBARA LIMA DOS ANJOS

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE FASE AGUDA EM CRIANÇAS
ATENDIDAS EM UM SERVIÇO DE URGÊNCIA.**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: PROF.^a DR.^a HELENA ZERLOTTI WOLF GROTTTO

CAMPINAS – SP

UNICAMP

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Anjos, Bárbara Lima dos
An58a Avaliação de marcadores de fase aguda em crianças atendidas em
um serviço de urgência / Bárbara Lima dos Anjos. Campinas, SP :
[s.n.], 2009.

Orientador : Helena Zerlotti Wolf Grotto

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

**Título em inglês : Evaluation of C-reactive protein and serum amyloid A in the
detection of inflammatory and infectious diseases in children**

Keywords: • Inflammation
• Acute phase reaction
• Emergency care

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Helena Zerlotti Wolf Grotto

Prof^º. Dr^º. Ana Lúcia Lyrio de Oliveira

Prof^ª. Dr^ª. Mariana Porto Zambon

Data da defesa: 28-08-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Bárbara Lima dos Anjos

Orientadora: Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto

Membros:

1. Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto -

2. Profa. Dra. Ana Lúcia Lyrio de Oliveira -

3. Profa. Dra. Mariana Porto Zambon -

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/08/2009

Dedicatória

À minha mãe Ilda, ao meu pai Ionas e minha irmã Natália pelo carinho, incentivo e por entenderem a dor da distância.

Agradecimentos

A Deus pela tua proteção no dia de ontem e no dia de hoje.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Helena Zerlotti Wolf Grotto, pela confiança, oportunidade, por compartilhar a sabedoria, experiências e pelos ensinamentos, em especial em me fazer aprender a ser paciente.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia; Ed, Fernanda, Gisélia, Carmen, Bia, Rosângela, Almir, Tânia, Marilda, Francisca, Edna, Valéria, Toninho, Satiko, Clélia e Dr^a Fátima por me acolherem com tanto carinho quando cheguei, não seria possível descrever tudo o que devo agradecer, mas certamente vocês sabem o quanto me ajudaram e marcaram minha vida.

À equipe de enfermagem do Pronto Socorro de Pediatria do HC UNICAMP, Elisângela, Olímpia, Ângela, Marli, Cris, Patrícia, Suzana e Ed, por me proporcionar momentos de alegria.

Ao Laboratório de Imunologia Celular, em especial a Prof^a Dr^a Maria Heloísa Blotta e ao Rômulo de Oliveira, pelos auxílios nos protocolos de ELISA.

Aos funcionários do Laboratório de Urinálise, em especial ao funcionário Marco e a Dr^a Paula pela realização de algumas análises.

Aos funcionários do Serviço de Bioestatística da Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, pelas análises estatísticas envolvidas neste trabalho.

Às Prof^{as} Drs Mariana Zambon e Adriana Riccetto do Pronto Socorro de Pediatria do HC UNICAMP pelas orientações tão importantes.

A Eliana, amiga de graduação e pós, por entrar nessa comigo e seguir nesta aventura compartilhando conquistas, saudades, dúvidas e muitas alegrias.

A Juliana, pelos ensinamentos, amizade inexplicável e por me proporcionar ótimas gargalhadas.

A Maruska, pela amizade iniciada no pensionato e que hoje é tão fundamental.

Às minhas amigas de Campo Grande, Ana Rachel, Isabele, Juliana e Francine por sempre me apoiarem e torcerem por mim.

A Eliane Borges por me orientar nessa fase da minha vida e se tornar uma grande amiga.

Ao Rovilson, Izildinha, Bruno, Camila e Marina, minha segunda família, obrigada por me acolherem tão bem, com tanto carinho e amor.

A Taís Mazzola por me receber com tanto empenho no Laboratório de Imunopediatria, pelas realizações de análises e pela nova grande amizade.

Aos responsáveis pelas crianças que participaram deste trabalho, pela confiança que me concederam. Em especial, às crianças, gostaria de colocar seus nomes aqui, mas, como isso não é possível, levo seus sorrisos (e choros) na memória.

Aos colegas de pós-graduação, Patrícia, Thiago, Susan e Fernanda pela amizade e pelo apoio.

Ao Wagner pelo amor, carinho, pela paciência e por me apoiar nesse objetivo e nos outros que compartilharemos juntos.

À minha família linda, por estarem sempre comigo, pelo amor e por todas as oportunidades. Por sacrificarem tanto para que eu tivesse o melhor. Amo Vocês.

A todos os que direta ou indiretamente compartilharam comigo seus conhecimentos e experiências para a realização desse trabalho.

RESUMO

Introdução: A resposta de fase aguda é composta de uma complexa rede de eventos envolvendo diversas células e mediadores pró e anti-inflamatórios. O diagnóstico clínico dessa condição nem sempre é facilmente obtido. O desempenho de diversos marcadores da resposta aguda é constantemente avaliado em variados grupos de doença, com o objetivo de otimizar o diagnóstico, proporcionando ao médico e ao paciente uma definição terapêutica precisa e em curto espaço de tempo. Além de parâmetros como os relacionados aos leucócitos e velocidade de hemossedimentação, a determinação de proteínas como a proteína C reativa (PC-R) e a amilóde sérico A (SAA) são propostas como úteis na detecção da presença do processo inflamatório/infeccioso. O objetivo do presente estudo foi a avaliação de alguns marcadores da resposta inflamatória, comparando a eficiência entre eles na identificação de crianças atendidas num Serviço de Urgência com suspeita de apresentarem inflamação ou infecção, além disso, nas crianças com quadro suspeito de dengue avaliar tais parâmetros.

Materiais e métodos: Foram estudadas 90 crianças com idade entre 1 mês e 10 anos atendidas na Unidade de Emergência Referenciada do Hospital das Clínicas da UNICAMP. De acordo com os dados clínicos, consulta dos prontuários e exames subsidiários, essas crianças foram divididas em grupo inflamatório (n= 17) e infeccioso (n= 66) e dentro do infeccioso em sugestivo de infecção bacteriana, viral e dengue. Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de leucócitos e presença de granulócitos imaturos por equipamentos hematológicos automatizados e por observação microscópica do esfregaço de sangue; dosagem de PC-R por 2 sistemas, determinação dos níveis de SAA e IL-6 por kits comerciais.

Resultados: O melhor marcador do processo inflamatório/infeccioso foi a PC-R (> 80% de positividade pelos 2 sistemas), seguido da SAA (73,3%) e da VHS (72,1%). A contagem de leucócitos e a detecção de granulócitos imaturos revelaram desempenho inferior ao recomendado, não sendo úteis para o diagnóstico. Não houve diferença nos valores de leucócitos, VHS, PC-R, SAA e IL-6 entre os grupos inflamatório e infeccioso, mas apresentaram níveis superiores no grupo bacteriano quando comparado ao viral a contagem de leucócitos, níveis de PC-R e SAA. Nos pacientes com suspeita clínica de dengue apresentaram níveis inferiores de leucócitos e plaquetas e quanto aos marcadores séricos a VHS apresentou valores significativamente diminuídos.

Conclusões: A PC-R foi o biomarcador com melhor desempenho no grupo de crianças estudado, enquanto as informações fornecidas pelo hemograma identificaram o menor número de pacientes. Os resultados da SAA foram semelhantes aos da PC-R sendo, portanto, discutível a sua utilização na rotina diagnóstica. De acordo com os nossos dados, deve ser encorajada a associação da interpretação de mais de um parâmetro na detecção do processo inflamatório/infeccioso.

ABSTRACT

Introduction: the acute-phase response consists of a complex network of events involving various cells and pro anti-inflammatory mediators. The clinical diagnosis of this condition is not always easily obtained. The performance of several markers of the acute response is constantly evaluated in different groups of diseases, aiming to optimize the diagnosis and in order to establish a precise therapeutic in a short time. In addition to parameters such as those related to leukocyte and erythrocyte sedimentation rate (ESR), the determination of levels of proteins such as C-reactive protein (CR-P) and serum amyloid A (SAA) are proposed as useful in detecting the presence of the inflammatory/infection process. The objective of this study was the assessment of some markers of inflammatory response, comparing the efficiency among them in identifying children from the emergency room with infection or inflammation suspicious.

Materials and methods: a total of 90 children aged between 1 month and 10 years with a clinical suspicious to have inflammation or infection diseases attended in the Emergency Unit of Clinical Hospital of the UNICAMP were enrolled. According to clinical data, medical records and subsidiary exams, these children were divided into inflammatory (n = 17) and infectious groups (n = 66). Infectious group was subdivided into bacterial or viral infection. The following parameters were evaluated: white blood cell count and presence of immature granulocytes by automated hematology equipment and microscopic observation of blood smears, determination of PC-R by 2 systems, and measurement of SAA and IL-6 levels by commercial kits.

Results: the best marker of the inflammatory/infection process was the CR-P (> 80% positivity from both systems), followed by SAA (73.3%) and ESR (72.1%). The leukocyte count and the detection of immature granulocytes showed performance below the recommended and, consequently not useful for diagnosis. There was no difference in the values of leukocytes, ESR, CR-P, SAA and IL-6 between inflammatory and infectious groups, but higher leukocyte counting, PC-R and SAA levels were observed in the bacterial group when compared to the viral one.

Conclusions: The CR-P was the biomarker with better performance in the group of children studied, while information supplied by the blood cells analysis identified the smallest number of patients. The results of SAA was similar to PC-R; therefore is questionable the SAA measurement utility in routine diagnosis. According to our data, the association of more than one parameter in the detection of the inflammatory/ infection response should be encouraged.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição dos pacientes estudados de acordo com sexo, idade, presença de febre e diagnóstico.

Tabela 2- Valores de mediana (mínimo e máximo) e resultados das análises de concordância entre os métodos automatizados.

Tabela 3- Valores de mediana (mínimo e máximo) da contagem diferencial de leucócitos determinados pelos três métodos automatizados e método manual.

Tabela 4- Resultados das análises de concordância entre os métodos na contagem diferencial de leucócitos.

Tabela 5- Valores da acurácia dos alarmes em relação ao desvio à esquerda.

Tabela 6- Resultados das análises de concordância entre os métodos para dosagem de PC-R.

Tabela 7- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos parâmetros hematológicos fornecidos por 3 equipamentos e observação microscópica .

Tabela 8- Valores mediana (mínimo e máximo) dos marcadores da resposta inflamatória.

Tabela 9. Valores de mediana (mínimo e máximo) e comparações dos marcadores da resposta inflamatória nos grupos: inflamatório e infeccioso.

Tabela 10- Valores de mediana (mínimo e máximo) das contagens diferenciais de leucócitos nos grupos inflamatório e infeccioso.

Tabela 11- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos marcadores do processo inflamatório/infeccioso.

Tabela 12- Valores de mediana (mínimo e máximo) e comparações dos parâmetros avaliados no grupo infeccioso subdivididos em bacteriano e viral.

Tabela 13- Frequência da positividade dos marcadores da resposta inflamatória nos pacientes com processo inflamatório/infeccioso.

Tabela 14- Frequência dos marcadores da resposta inflamatória nos grupos: inflamatório e infeccioso.

Tabela 15- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos parâmetros relacionados ao hemograma avaliados no grupo de pacientes com Dengue.

Tabela 16- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos marcadores do processo inflamatório/infeccioso avaliado nos grupos de pacientes com e sem Dengue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.A: Box plot dos valores de hemoglobina realizados pelos equipamentos Micros CRP 200, Pentra DX 120 e XE 2100.

Figura 1.B: Box plot das contagens de PLT realizadas pelos equipamentos Micros CRP 200, Pentra DX 120 e XE 2100.

Figura 1.C: Box plot das contagens de leucócitos realizados pelos equipamentos Micros CRP 200, Pentra DX 120 e XE 2100.

Figura 2.A: Box plot das contagens de linfócitos realizado pelos equipamentos Micros CRP 200, Pentra DX 120, XE 2100 e pelo método manual.

Figura 2.B: Correlações das contagens de neutrófilos realizadas pelos equipamentos Pentra DX 120, XE 2100 e pelo método manual.

Figura 2.C: Correlações das contagens de eosinófilos realizado pelos equipamentos Pentra DX 120, XE 2100 e pelo método manual.

Figura 3.A: Box-plot das dosagens de PC-R realizadas no soro e sangue pelo equipamento Micros CRP 200.

Figura 3.B: Box-plot das dosagens de PC-R realizadas no soro nos equipamentos Micros CRP 200 e Modular/Hitachi.

Figura 3.C: Box-plot das dosagens de PC-R realizadas no sangue no Micros CRP 200 e no soro pelo equipamento e Modular/Hitachi.

Figura 4. A: Box plot das contagens de leucócitos pelo equipamento Pentra DX 120 nos subgrupos bacteriano e viral.

Figura 4.B: Box plot das contagens de leucócitos pelo equipamento XE 2100 nos subgrupos bacteriano e viral.

Figura 4.C: Box plot da determinação de PC-R dosado no sangue pelo equipamento Micros CRP 200 nos subgrupos bacteriano e viral.

Figura 4.D: Box plot da determinação de PC-R dosado no soro pelo equipamento Modular/Hitachi nos subgrupos bacteriano e viral.

Figura 4. E: Box plot da determinação de SAA nos subgrupos bacteriano e viral.

Figura 5. A: Box plot das contagens de leucócitos pelo equipamento Pentra DX 120 nos pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

Figura 5.B: Box plot das contagens de leucócitos pelo equipamento XE 2100 nos pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

Figura 5.C: Box plot das contagens de plaquetas pelo equipamento Pentra DX 120 nos pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

Figura 5.D: Box plot da contagem de plaquetas pelo equipamento XE 2100 nos pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

Figura 6: Box plot da determinação de VHS no grupo de pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

LISTA DE ABREVIATURAS

a ₁ AG	Glicoproteína a ₁ ácida
aa	Aminoácidos
BASO	Basófilos
Bast	Bastonetes
CHCM	Média da concentração de hemoglobina corpuscular
CV	Coeficiente de variação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (anticoagulante)
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EOS	Eosinófilos
Fib	Fibrinogênio
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
GB	Glóbulos Brancos
GRA	Granulócitos
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônias e granulócitos e macrófagos
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
ICAM	Molécula de adesão intracelular
ICC	Coeficiente de concordância intraclases
IC	Intervalo de confiança

IFN	Interferon
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-6	Interleucina-6
IL-6R	Receptor de Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-11	Interleucina-11
IL-12	Interleucina-12
JAKs	Janus cinase
Leuc	Leucócitos
LIN	Linfócitos
MON	Monócitos
NEUT	Neutrófilos
NK	Natural Killer
PC-R	Proteína C reativa
PFA	Proteínas de fase aguda
PLT	Plaquetas
RFA	Resposta de fase aguda
SAA	Amilóide A sérico
T	Temperatura
TGF β	Fator de crescimento transformador β

TNF	Fator de necrose tumoral
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TNF β	Fator de necrose tumoral β
VCM	Volume corpuscular médio
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

	Págs.
RESUMO	v
ABSTRACT	viii
1-INTRODUÇÃO	31
1.1-Inflamação/Infecção	33
1.2-Febre	34
1.3-Leucograma/Leucocitose	36
1.4- Leucopenia	40
1.5- Resposta de fase aguda	40
1.6- Proteínas de fase aguda	42
1.7- Velocidade de hemossedimentação	44
1.8- Proteína C-reativa	46
1.9- Amiloide sérico A	50
1.10-Interleucina -6	52
2- OBJETIVOS	55
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS	59
3.1- Local do estudo e procedência dos pacientes	61
3.2- Pacientes	61
3.3-Critérios de exclusão	61
3.4- Aspecto Ético	61

3.5- Tipo de Estudo	62
3.6- Métodos	62
3.6.1- Coleta das amostras	62
3.6.2-Análises realizadas	62
3.6.2.1-Hemograma Completo	62
3.6.2.2-VHS	63
3.6.2.3-PC-R	63
3.6.2.4-SAA.....	64
3.6.2.5- IL-6	64
3.7-Validação dos métodos	65
3.8-Análise Estatística	66
4- RESULTADOS	69
4.1- Descrição da população	71
4.2- Validação dos métodos	73
4.2.1- Contagem Global	73
4.2.2- Contagem diferencial de leucócitos	76
4.2.3- Acurácia dos sistemas automatizados em relação a detecção da presença de granulócitos imaturos	79
4.2.4- Comparação entre métodos de determinação da PC-R	79
4.3- Avaliação dos parâmetros laboratoriais nos grupos com inflamação e infecção	82
4.3.1-Comparação entre os grupos inflamatório e infeccioso	84

4.3.2- Comparação dos valores dos marcadores de fase aguda entre os grupos inflamatório e infeccioso	86
4.4- Eficiência dos diversos parâmetros laboratoriais na identificação da presença de processo inflamatório/infeccioso	90
4.5- Análise dos pacientes com Dengue	92
5- DISCUSSÃO	99
6-CONCLUSÕES	113
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS	133
Quadro I	135
Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	138
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	140
Resumo apresentado no 20° International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) realizado de 28 de setembro a 02 de outubro de 2008 em Fortaleza-CE ..	
.....	141
Artigo submetido à Revista Journal Tropical Pediatrics	144

1-INTRODUÇÃO

1.1- Inflamação/Infecção

Inflamação é a reação de um tecido e de sua microcirculação a uma agressão. Caracteriza-se pela produção de mediadores inflamatórios e movimentação de líquido e leucócitos do sangue para os tecidos extravasculares.

Uma das causas mais comuns de uso inadequado de antibióticos é a dificuldade em distinguir infecção de inflamação. Infecção pressupõe invasão de um tecido normalmente estéril por um microrganismo, que leva à resposta inflamatória local e à resposta imunológica manifestada pela formação de anticorpos contra o agente agressor. Já a inflamação é uma resposta do organismo a um dano tecidual que pode ser infeccioso ou não. Tem por função conter, isolar e destruir os microrganismos invasores, inativar as toxinas e preparar o tecido ou o órgão para a cicatrização e reparação. Essa resposta inflamatória pode ser localizada ou sistêmica e é mediada pela liberação e ação de diversos fatores, como as citocinas (Rubin e Farber., 1999; Gyssens., 1999).

Os quatro sinais clínicos de inflamação foram descritos dois séculos d.C por Aulus Celsus, a saber: rubor (eritema), calor (temperatura elevada), tumor (edema) e dor (algia). O rubor e o calor são o resultado do aumento da circulação na área inflamada. O tumor é a consequência do aumento local do líquido intersticial e a dor depende do acúmulo, no local, de substâncias biológicas que atuam sobre as terminações nervosas. A perda da função é a consequência da somatória de vários fatores, especialmente do edema e da dor. Os sinais cardinais referem-se a inflamações da superfície corpórea ou das articulações, porém, inflamações com as mesmas características ocorrem em todos os tecidos e órgãos agredidos (Faria.,2003).

A inflamação tem sido historicamente denominada como aguda ou crônica dependendo da persistência da lesão, sintomas clínicos e a natureza da resposta inflamatória. Do ponto de vista funcional e morfológico, as inflamações agudas se caracterizam pelo predomínio de fenômenos exsudativos, ou seja, conseqüentes a alterações da permeabilidade vascular, permitindo o acúmulo de líquido na

região inflamada (edema), além de fibrina, leucócitos, especialmente os neutrófilos, e hemácias. Nas inflamações crônicas, além destes elementos, ocorrem no local a proliferação de vasos, de fibroblastos (com conseqüente deposição de colágeno), como também migração e proliferação local de monócitos e linfócitos (Montenegro e Franco.,2004).

A lesão local, quando grave, pode levar à liberação de mediadores inflamatórios para dentro da circulação em especial as citocinas, provocando assim efeitos sistêmicos. As manifestações sistêmicas mais proeminentes da inflamação são as seguintes: febre, choque, leucocitose, leucopenia e resposta da fase aguda, mediada por diversas proteínas (Rubin e Farber., 1999).

1.2- Febre

As palavras doença e febre estão intimamente ligadas. A febre é um alerta da presença de diversas patologias e estima-se que 20% a 30% das consultas pediátricas têm a febre como queixa única ou inicial (Murahovschi., 2003).

Considera-se como febril toda criança com temperatura corporal acima de 38°C, com variação de 37,7°C a 38,3°C, desde que aferida adequadamente (Ricetto e Zambon., 2005).

Na seqüência patogênica da febre, agentes infecciosos (bactérias, vírus, fungos ou suas toxinas) ou não infecciosos (drogas e antígenos não infecciosos) funcionam como pirógenos exógenos que induzem as células fagocíticas a produzirem substâncias de natureza protéica, como as interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e outras que atuam no hipotálamo anterior elevando o “set-point” do centro termorregulador, iniciando assim uma série de respostas fisiológicas e comportamentais que resultam na elevação da temperatura corporal (Murahovschi., 2003; Ricetto e Zambon., 2005).

Em vertebrados homotermos, foi demonstrada a ação da febre nas seguintes etapas da resposta imune:

- a) aceleração da quimiotaxia de neutrófilos e da secreção de substâncias antibacterianas (peróxidos, superóxidos, lisozima e lactoferrina);
- b) aumento da produção e das ações antiviral e antitumoral dos interferons;
- c) estimulação das fases de reconhecimento e sensibilização da resposta imunológica, resultando em uma interação mais eficiente entre macrófagos e linfócitos T e maior proliferação destes últimos. As fases efetoras da resposta imune como a citotoxicidade de linfócitos T e NK, são inalterados ou mesmo deprimidos pelo aumento de temperatura;
- d) diminuição da disponibilidade de ferro, a qual limita a proliferação bacteriana e de alguns tumores. Este fenômeno é causado pela hipotransferrinemia da resposta de fase aguda (RFA), pelo aumento da afinidade do ferro pela lactoferrina intracelular e pela menor produção de proteínas quelantes de ferro pelas bactérias.

A maioria das ações benéficas da febre sobre as defesas orgânicas, mencionadas acima são mediadas, indiretamente, por citocinas de efeito pirogênico secretadas na RFA, principalmente IL-1 e TNF. Entretanto, estas e outras citocinas aliadas a substâncias pró-inflamatórias como as prostaglandinas, produzem várias manifestações adversas, tanto na fase aguda como na fase crônica da reação inflamatória (Voltarelli.,1994).

A febre é um motivo comum para as crianças serem levadas ao atendimento médico. Diante dessa condição, o profissional deve tomar uma série de decisões que podem ser difíceis, particularmente quando a criança é muito pequena. (Sanders *et al.*, 2008; Grossman., 1982).

A resposta do organismo diante de um quadro infeccioso varia bastante de indivíduo para indivíduo e nas crianças essa variação também é dependente da idade. Assim, lactentes menores de 90 dias diferem das crianças mais velhas em vários aspectos importantes. Os lactentes são fisiologicamente menos imunocompetentes e mais susceptíveis a infecções por patógenos como o *Streptococcus* do grupo B, bactérias gram-negativas e menos comumente *Listeria sp*, além das infecções causadas pelo pneumococo, meningococo ou

estafilococo, comuns às outras faixas etárias. Estudos mostram que a febre está associada à infecção bacteriana em 10% dos lactentes de 1 a 3 meses de idade e em 13% dos lactentes menores de 1 mês de idade (Ricetto e Zambon, 2005).

Outra importante característica dessa faixa etária merece atenção especial: sua relativa incapacidade de demonstrar evidência clínica de doença (Ricetto e Zambon, 2005). A anamnese deve focar a faixa etária, intensidade da febre, presença de tremores de frio, alterações evidentes do apetite e comportamento, sintomas locais e duração do episódio febril. Os exames de triagem para investigação da possível etiologia da febre são: hemograma, velocidade de hemossedimentação do sangue (VHS), proteína C-reativa (PC-R), análise do sedimento urinário e, eventualmente, líquido e hemocultura (Murahovschi., 2003). Apesar dos inúmeros avanços na prática médica, a avaliação de uma criança com febre continua sendo desafiadora. A avaliação global da febre pode ser dispendiosa, demorada e invasiva (Hsiao e Baker.,2005).

1.3- Leucograma/Leucocitose

Várias alterações hematológicas são observadas nos quadros infecciosos, dependendo do agente etiológico, extensão e local da infecção. As possíveis alterações observadas ao hemograma quanto à composição e morfologia dos leucócitos correspondem à cinética e função das células envolvidas nos processos de defesa contra um determinado agente infeccioso. Assim, os neutrófilos têm ação microbicida importante contra bactérias, enquanto os macrófagos e linfócitos T agem contra agentes intracelulares (vírus, protozoários e bactérias intracelulares). Os eosinófilos, por sua vez, têm ação citotóxica contra helmintos (Grotto., 2009).

A leucocitose é definida como o aumento no número de leucócitos circulantes que em geral acompanha a inflamação aguda. Os polimorfonucleares

(PMN) são quase sempre as células predominantes (neutrofilia) (Rubin e Farber., 1999; Bain., 2004).

A produção de neutrófilos é de aproximadamente $0,85 \times 10^9$ / kg/dia. São mediadores da proliferação e liberação medulares dos granulócitos a IL-1 e TNF- α produzidos por monócitos ativados, entre outros. Esses mediadores agindo na célula do estroma vão promover a liberação de IL-6 e de fatores de crescimento celulares (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) que vão atuar nos precursores granulocíticos, aumentando sua proliferação e liberações medulares (Hoffbrand *et al.*, 2004).

Sua meia-vida na circulação é de seis a oito horas, quando ocorre sua migração aos tecidos. A medula óssea é o órgão onde ocorre à maturação de mieloblasto a neutrófilos segmentados, onde os granulócitos ocupam dois compartimentos :

- a) Compartimento mitótico, constituído de mieloblastos, promielócitos e mielócitos com capacidade de proliferação celular;
- b) Compartimento pós-mitótico, constituído de metamielócitos, bastonetes e segmentados, cujas células perderam a capacidade proliferativa, mas continuam o processo de maturação.

Na corrente sanguínea, há dois conjuntos (ou “pools”) de células, que permanecem em equilíbrio e em constante troca de posições:

- “Pool” circulante, cujos neutrófilos são quantificados pelo hemograma.
- “Pool” marginal, não incluído no hemograma, e correspondente aos neutrófilos aderidos ao endotélio dos vasos.

Aproximadamente 2/3 do compartimento pós-mitótico pode ser rapidamente recrutado da medula óssea para a circulação, quando houver estímulos, tais como;

- Neutropenia;
- Infecção;
- Inflamação;

- Endotoxinas;
- Administração de corticosteróides;
- Administração de fatores de crescimento (G-CSF, GM-CSF) (Santis.,1999 e Hoffbrand *et al.*,2004).

O início do processo inflamatório se dá pela migração dos neutrófilos e macrófagos ao local da infecção. A mobilização intensa dos neutrófilos, inclusive dos estoques medulares na defesa contra as bactérias, explica a frequência do aparecimento da neutrofilia no hemograma de pacientes infectados por bactérias gram-positivas como pneumococos, estafilococos ou estreptococos (Grotto., 2009).

O hemograma completo é um dos testes mais utilizados na avaliação de crianças febris. O número elevado de glóbulos brancos (GB) e de bastonetes está associado à infecção bacteriana, e deve ser avaliado levando-se em conta fatores importantes, tais como: a idade do paciente, os achados clínicos, principalmente a presença de febre (Todd., 1974; Rasmussen e Rasmussen., 1982; Jaffe e Fleisher., 1991).

A contagem diferencial de leucócitos é freqüentemente usada na prática clínica para diagnosticar a possível origem das infecções. Segundo Todd (1974), crianças doentes com número de neutrófilo maior que $10 \times 10^9 / l$ e de bastonetes maior que $0,5 \times 10^9 / l$ tem 80% de chance de ter uma infecção bacteriana grave.

Estudos têm mostrado resultados inconsistentes sobre a utilização da contagem global e diferencial de leucócitos no diagnóstico de apendicite. Embora a maioria dos estudos mostre uma associação com a presença dessa patologia, a sensibilidade das 2 medidas varia entre 50% e 80% (Bower et al., 1981; Rothrock e Pagane., 2000).

A neutrofilia algumas vezes é acompanhada de febre resultante da liberação de pirogênios dos leucócitos. Outros aspectos característicos da neutrofilia reacional podem incluir (a) “desvio à esquerda”, isto é, aumento do número de bastonetes e presença de células mais primitivas, como metamielócitos e mielócitos, (b) presença de granulação tóxica e corpúsculos de

Dohle no citoplasma e (c) aumento do escore de fosfatase alcalina dos neutrófilos (Hoffbrand *et al.*, 2004).

Alguns autores consideram valores de neutrófilos superiores a $10.000/\text{mm}^3$ ou a presença de neutrófilos jovens em número acima de $500/\text{mm}^3$ como associados com a doença bacteriana. Outros valorizam a relação neutrófilos imaturos/neutrófilos total maior do que 0,12 ou 0,2 como indicativas de infecção (Baker *et al.*, 1993).

No período neonatal, a relação células imaturas/número de neutrófilos totais é especialmente indicativa de infecção bacteriana. Monroe e cols consideram como normal a relação inferior a 0,16 nas primeiras 24 horas de vida, diminuindo para 0,12 após o terceiro dia, mantendo-se neste valor até o fim do primeiro mês, e quando for maior do que 0,2 como indicativo de infecção (Marcondes *et al.*, 2003).

Num estudo com 44 pacientes com contagem normal de leucócitos e presença de desvio à esquerda definido como a presença de mais do que 6% de bastões foi observada uma correlação de 100% com a presença de infecção ou doença inflamatória aguda (Mathy e Koepke ., 1974).

A leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda, eosinopenia e linfopenia sugere a presença de um processo infeccioso agudo; já a presença de eosinófilos, neutrófilos segmentados e monócitos sugerem tratar-se de fase de recuperação. Os valores leucocitários excessivamente altos ou a presença de uma leucopenia associada ao desvio à esquerda e presença de granulações tóxicas são sinais de mau prognóstico (Smith.,1973).

Os vírus caracterizam-se por serem patógenos intracelulares e por usarem a maquinaria da célula infectada para se reproduzirem. Para a destruição dos vírus é necessária a interação dos linfócitos T com as células portadoras dos antígenos. O grande comprometimento da resposta imune mediada por células na reação aos vírus, explica porque a linfocitose é tão comum nos processos infecciosos virais agudos. Embora a linfocitose seja a alteração mais comum nos

processos virais, a linfopenia não afasta a possibilidade desse diagnóstico (Grotto., 2009).

1.4- Leucopenia

Define-se leucopenia como a diminuição absoluta no número de leucócitos circulantes, que pode ser ocasionalmente encontrada nos casos de inflamação crônica em especial nos pacientes desnutridos ou nos que apresentam patologia crônica debilitante como neoplasia disseminada (Rubin e Farber., 1999; Bain., 2004).

1.5- Resposta de fase aguda (RFA)

Dentro do espectro de reações sistêmicas à inflamação duas respostas fisiológicas, em particular, são consideradas como estando associados com a inflamação aguda. A primeira envolve a alteração do “setpoint” da temperatura no hipotálamo e geração da resposta febril. A segunda está relacionada a alterações no metabolismo. O fígado é o principal alvo dos mediadores inflamatórios sistêmicos e também é o órgão responsável por determinar o nível de metabólitos essenciais ao organismo durante as etapas críticas do estresse (Baumann e Gauldie., 1994).

A RFA é, no sentido mais amplo, a resposta do organismo à inflamação ou lesão tecidual, caracterizada por uma reação fisiológica bem coordenada. No sentido mais estrito, a RFA refere-se a alterações na concentração de um grande número de proteínas plasmáticas, predominantemente em decorrência de mudanças na sua síntese pelos hepatócitos (Marcondes *et al.*, 2003).

A presença de macrófagos ou monócitos está comumente associada ao início da cascata de eventos durante a RFA. Uma vez ativados, os macrófagos

liberam um amplo espectro de mediadores, pró e antiinflamatórios. Citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6, TNF- α , interferon- γ (IFN- γ) e IL-8, são importantes para o início de uma série de reações, que afetarão a concentração sanguínea de diversas proteínas de fase aguda (PFA), entre elas, as opsoninas e a proteína C reativa (PC-R) (Baumann e Gauldie., 1994 e Gabay e Kushner., 1999).

A RFA pode causar uma grande variedade de alterações que incluem febre, aumento da permeabilidade vascular, mudanças nas concentrações de esteróides, outros hormônios e metais, alterações no metabolismo lipídico e em particular o aumento da síntese e catabolismo de um grande número de proteínas (Schultz e Arnold.,1990).

As chamadas citocinas pró-inflamatorias ou “de alerta” (IL-1, TNF e IL-6) desencadeiam uma série de reações humorais e celulares, tanto no sítio da inflamação quanto à distância (Baumann e Gauldie., 1994). A ativação das células do estroma (como fibroblastos e células endoteliais) pela IL-1 e TNF provoca a secreção de uma segunda onda de citocinas que amplifica a resposta tecidual ao estímulo inflamatório. Nessa fase observa-se também a liberação de outras citocinas, tais como IL-8 e MCP, que são quimiotáticas para neutrófilo e células mononucleares, respectivamente. Enquanto isso, células endoteliais começam a expressar moléculas de adesão (ICAM-1 e integrinas, entre outros), vitais para a passagem transendotelial e migração dos leucócitos circulantes para o local de inflamação. Após a migração, essas células iniciam a síntese e liberação de seu próprio arsenal de citocinas dentro do tecido lesado (Lloyd e Oppenheim.,1992).

As citocinas liberadas no local da lesão agem sistemicamente, interagindo com receptores específicos da membrana dos hepatócitos, onde estimulam a síntese das PFA. O hepatócito responde a quatro tipos de mediadores da resposta inflamatória: 1) Citocinas do tipo IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , TNF- β) que estimulam a produção hepática da PC-R, do componente C3 do complemento, haptoglobina, amiloide sérico A (SAA) e a glicoproteína ácida, constituindo as

PFA do tipo 1; 2) citocinas do tipo IL-6 (IL-6, IL-11, fator inibitório de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM) e fator neurotrófico ciliar (CNTF), que estimulam pelo receptor gp 130 a maioria das PFA do tipo 1 e, mais especificamente, o fibrinogênio, haptoglobina e as antiproteases α_1 -antiquimiotripsina, α_1 -antitripsina, α_2 -macroglobulina e a ceruloplasmina, constituindo as PFA do tipo 2; 3) glicocorticóides: agem sinergicamente com as citocinas do tipo IL-1 e IL-6 estimulando a produção de algumas PFA, principalmente a glicoproteína ácida. Entretanto, a ação mais importante dos glicocorticóides na RFA é a de inibir a produção de citocinas pelos macrófagos e células endoteliais, impedindo que sua ativação continuada tenha conseqüências lesivas aos tecidos; 4) fatores de crescimento: juntamente com os glicocorticóides hormonais, como a insulina, os fatores de crescimento do hepatócito (HGF) e do fibroblasto (FGF) e o fator de crescimento transformador (TGF- β) modulam a resposta hepática (Baumann e Gauldie., 1994). A insulina inibe a estimulação, via IL-1 e IL-6, da maioria dos genes das PFA, enquanto o TGF- β suprime a estimulação de IL-1, aumentando os efeitos da IL-6 sobre os genes das PFA do tipo 2 (Campos e Baumann.,1992). Embora a maioria das PFA seja produzida pelos hepatócitos, algumas (como a ferritina) podem ser secretadas por outras células, como monócitos, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos (Kushner., 1982).

1.6- Proteínas de fase aguda (PFA)

As PFA são glicoproteínas liberadas na circulação em resposta a situações de estresse, como na vigência de processos inflamatórios agudos (Carvalho e Filho., 2003; Rubin e Farber, 1999; Baumann e Gauldie., 1994).

As alterações na concentração das PFA estão relacionadas às mudanças em sua produção pelos hepatócitos, quando estimulados pela IL-6, produzida pelos monócitos, fibroblastos e células endoteliais. O aumento das PFA pode

variar de 50-100% no caso da PC-R e da SAA (Henry *et al*, 1995; Gabay e Kushner., 1999).

As PFA desempenham importante papel na defesa do hospedeiro, tais como: neutralização direta dos agentes inflamatórios, redução da extensão do dano tecidual local, participação no reparo e regeneração do tecido. Além disso, a ativação das proteínas do complemento resulta na migração de neutrófilos, macrófagos e proteínas plasmáticas, que participam na destruição de agentes infecciosos, na depuração de restos celulares de microrganismos e do próprio hospedeiro. A ativação da cascata de coagulação fornece elementos essenciais à cicatrização da lesão, enquanto inibidores das proteinases, como a α_1 -antitripsina, neutralizam as hidrolases lisossomais liberadas a partir de neutrófilos e macrófagos ativados, bloqueando, assim, a atividade das enzimas pró-inflamatórias (Steel e Whitehead., 1994).

A rapidez e a magnitude do aumento da concentração de cada PFA depende da proteína em questão e do tipo de estímulo inflamatório. Isso provavelmente está relacionado com a quantidade de cada proteína que é necessária para participar efetivamente na RFA (Serra., 1997).

Dessa forma, a análise das PFA nas doenças tem lugar de destaque na determinação da presença e o grau da inflamação, permitindo, através de dosagens seriadas, a monitorização da gravidade e progresso da doença bem como da resposta terapêutica.

1.7- Velocidade de hemossedimentação (VHS)

A história desse teste remonta à Grécia, de onde vêm os primeiros registros de observações a respeito. A VHS era um meio de detectar a presença de certos “humores” corporais nocivos (Wyler., 1977; Ropes *et al.*, 1939).

Em 1918, o estudante alemão Fahraeus definiu quase todas as características do exame: estabeleceu que a sedimentação dependia da capacidade do plasma em diminuir a carga eletrostática da superfície das hemácias. Ele quantificou a capacidade aglutinante de algumas proteínas plasmáticas e demonstrou que o fibrinogênio apresentava maior capacidade de aglutinação do que as globulinas e as globulinas eram mais aglutinantes que a albumina (Bedell e Bush., 1985).

Em 1924, Alf Westergren desenvolveu uma técnica para a determinação da VHS que continua praticamente a mesma desde então e é considerada a melhor para a realização do exame. Consiste na colocação de uma amostra de sangue em um tubo vertical em repouso onde os eritrócitos tendem a descer em direção ao fundo. A VHS mede a distância em mm que os eritrócitos percorrem em direção ao fundo do tubo em um determinado intervalo de tempo, que hoje está padronizado em 60 minutos (Henry., 1995).

O segundo método mais utilizado para determinação da VHS é o método de Wintobre que utiliza um tubo de 100 mm de altura onde o sangue será colocado. Não requer nenhuma diluição e pode ser mais sensível que o método de Westergren em VHS normais e discretamente elevadas (Olshaker e Jerrard., 1997).

Os mecanismos físico-químicos da sedimentação baseiam-se na agregação e conseqüente formação em *rouleaux* dos eritrócitos. A formação do *rouleaux* é limitada pela carga negativa dos eritrócitos que se repelem e não se agregam. O efeito repulsivo dessa carga de superfície é modificado pelas proteínas plasmáticas circundantes. O fibrinogênio e as gamaglobulinas exercem influência desproporcionalmente grande. Logo, quando as concentrações dessas proteínas

séricas aumentam, elas diminuem o potencial *zeta* entre os eritrócitos, permitindo maior formação em *rouleaux*, resultando numa VHS mais acelerada (Ballas., 1975; Bedell e Bush., 1985; Lanzara *et al.*, 2001).

Os valores da VHS aumentam a partir de 48 horas do início do quadro infeccioso, ocorrendo pico de elevação entre três e cinco dias, retornando ao valor normal aproximadamente três semanas depois de iniciado o tratamento adequado. O caráter tardio no aparecimento de modificações na VHS representa uma desvantagem diagnóstica (Lanzara *et al.*, 2001).

VHS é uma medida indireta da reação de fase aguda. O seu valor reside no fato de que se trata de um teste laboratorial simples e barato para avaliar a inflamação. A maioria dos estudos recentes tende a favorecer a PC-R, principalmente devido ao fato do VHS ser afetada por uma multiplicidade de fatores. Apesar da elevada sensibilidade, a VHS tem baixa especificidade e aumentos importantes podem ser encontrados em inúmeras situações (Andriollo e Carrazza., 2007).

A VHS determinada por micrométodo é um exame fácil de ser realizado e barato. Os valores normais aumentam com a idade pós-natal e são aproximadamente iguais aos dias de vida mais 3 mm por hora, com um valor máximo de 15mm por hora. Ela é menos sensível que a PC-R e se mostra falsamente positiva em crianças com doenças hemolíticas e falso-negativa na coagulação intravascular disseminada, devido ao consumo de fibrinogênio. Trabalhos sobre VHS mostraram valor preditivo negativo de 94% a 97%, sensibilidade de 25% a 50%, especificidade de 83% a 97% e valor preditivo positivo de 44% (Vaz *et al.*, 1998).

McCarthy *et al.*, (1997), mostraram que a contagem de GB $> 15.000/\text{mm}^3$ e/ou VHS pelo método de Wintrobe $> 30\text{mm/h}$, foram mais úteis do que a contagem de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e/ou bastonetes na avaliação de crianças menores de 2 anos com temperatura $> 40^\circ\text{C}$ por bacteremia ou pneumonia, as duas doenças mais graves em crianças com febre alta.

Peltola *et al*, (1986), observaram que 51% dos pacientes com apendicite na faixa etária pediátrica considerada até 16 anos apresentaram VHS aumentada após 24 horas do início dos sintomas.

A VHS apresenta uma série de desvantagens que o afastam de ser o marcador ideal: exige sangue recentemente colhido (não pode ser armazenado); tanto a elevação como o retorno ao valor de normalidade são lentos e o valor do teste é bastante influenciado pelo tamanho, forma, número de hemácias e anormalidades nas proteínas plasmáticas. Oshaker e Jerrard (1997) em uma revisão sobre o assunto apontam diferentes causas de redução na VHS, condições como: policitemia, anemia falciforme, anemia hemolítica, esferocitose hereditária, hipofibrinogemia, altas doses de salicilatos e cortisona hiperviscosidade como na macroglobulinemia de Waldenstrom. Sugerem ainda alguns usos específicos da VHS como tendo valor diagnóstico: artrite temporal, artrite séptica, osteomielite aguda e na diferenciação de doença inflamatória pélvica (PID) e apendicite. Apesar dessas considerações a simplicidade técnica e o baixo custo garantem à VHS uma posição extremamente privilegiada dentre as provas de fase aguda, sendo, ainda atualmente, o exame mais utilizado como indicador da presença e do grau de atividade de processos inflamatórios (Andriolo e Carrazza., 2007).

1.8- Proteína C reativa (PC-R)

A PC-R é uma proteína de fase aguda produzida no fígado e sua síntese é modulada por citocinas, principalmente IL-6, IL-1 β e TNF- α (Chalmers *et al.*, 2008). Foi identificada em 1930 por Tillet e Francis, quando observaram que o soro de pacientes com doença aguda precipitava a fração polissacarídea C do *Streptococcus pneumoniae*. Em 1951 a PC-R já havia sido detectada em mais de 70 doenças, envolvendo processos bacterianos agudos, virais e outras infecções,

além de doenças não infecciosas como o infarto agudo do miocárdio e em doenças reumáticas (Jaye e Waites, 1997).

Posteriormente a PC-R foi considerada uma “proteína de fase aguda”, ou seja, um indicador primário de infecção ou inflamação. Desde esta descoberta, a PC-R tem sido empregada como um teste de triagem em processos inflamatórios e um marcador de atividade de diversas doenças (Clyne e Olshaker., 1999).

É formada por um complexo de cinco subunidades polipeptídicas sintetizadas pelo fígado, ligadas não covalentemente, com peso molecular aproximado de 115 KDa a 140 KDa (Hokama e Nakamura., 1987).

Os níveis de PC-R começam a elevar cerca de 6 horas após um estímulo, como por exemplo, cirurgia, infecção ou infarto agudo. A partir daí as concentrações duplicam a cada 8h, e atingem o pico por volta das 50h. Com estímulos muito intensos a concentração da PC-R pode ultrapassar os 500 mg/l, ou seja, 1000 vezes superior ao valor basal. Após a suspensão ou término do estímulo os níveis da PC-R diminuem rapidamente. As elevadas concentrações de PC-R persistem enquanto o estímulo existir (Jaye e Waites.,1997).

A rápida cinética do metabolismo da PC-R parece estar intimamente relacionada ao grau da lesão e reparação, reforçando assim, o seu valor como uma medida da atividade da doença, superior ao aumento de outros reagentes da fase aguda que são mais lentos. A PC-R se liga a resíduos de fosfocolina e galactose, outros polissacarídeos e peptidopolissacarídeos encontrados em bactérias, fungos e parasitas. Após essa ligação a PC-R ativa a via clássica do complemento e atua como uma opsonina. A PC-R e componentes do complemento são as únicas proteínas de fase aguda diretamente envolvidas na eliminação de microrganismos (Pepys e Baltz., 1983).

A PC-R tem diversas funções na resposta inflamatória: participa do “clearance” de material nuclear derivado de necrose tecidual, como também na fixação do complemento, quimioatração e estímulo à fagocitose (Marcondes *et al.*, 2003). Estudos “in vitro” sugerem que a PC-R ativa os neutrófilos, inibe a agregação plaquetária, inicia a degranulação de plaquetas, pode otimizar a

atividade de células (NK), facilita as reações citotóxicas celulares contra as células infectadas e estimula a atividade anti-tumoral dos monócitos-macrófagos (Pepys e Baltz., 1983; Pepys., 1983).

Ao contrário da VHS os níveis de PC-R não são afetados pela anemia, policitemia, alterações nas proteínas plasmáticas, idade ou sexo do paciente (Pizzini *et al.*, 2000).

A literatura sobre potenciais aplicações da quantificação de PC-R no diagnóstico de doenças infantis tem crescido substancialmente na última década. Novos procedimentos laboratoriais permitem que quantifiquem essa proteína seja quantificada com rapidez e alta precisão. A concentração de PC-R no soro indica o curso da resposta de fase aguda, inflamação ou necrose tecidual; portanto, a sua determinação pode fornecer valiosas informações em muitas doenças, incluindo processos infecciosos, bem como em condições não infecciosas.

Como citado anteriormente, é comum a dificuldade clínica na diferenciação doenças causadas por bactérias ou vírus. Em geral, a elevação da PC-R tende a ser de 150-350 mg/L em uma infecção bacteriana aguda. A infecção bacteriana sem a elevação dos níveis da PC-R é rara, mas pode ser encontrada dependendo de quando a amostra foi coletada. Por outro lado, em muitas infecções virais, os valores de PC-R tendem a serem baixos (< 20-40 mg/L) embora valores acima de 100 mg/l possam ocorrer em infecções causadas por adenovirus, citomegalovirus, influenza, entre outras (Deodhar., 1989).

Em crianças com osteomielite aguda hematogênica foi observado que a PC-R eleva-se e diminui mais rapidamente do que o VHS, refletindo a eficácia do tratamento e predizendo a recuperação com maior sensibilidade do que o VHS e a contagem de leucócitos (Unkila-Kallio *et al.*, 1994).

Berger *et al* (1995), demonstraram que durante os primeiros 3 dias de vida os níveis aumentados da PC-R, a leucopenia e a neutropenia são úteis para a detecção da sepse neonatal e que após o terceiro dia de vida a PC-R foi o melhor teste diagnóstico. Além disso, a determinação seqüencial da PC-R permitiu a

confirmação ou exclusão de infecção e o monitoramento da eficiência do tratamento com antibióticos.

Alguns estudos sugerem que valores de PC-R entre 8 e 40 mg/l seriam indicativos de otite média bacteriana (Tejani *et al.*, 1995; Karma *et al.*, 1987), enquanto outros autores observaram baixa especificidade e baixo valor preditivo negativo para esse teste (Principi *et al.*, 1986).

Em crianças é muito importante a diferença entre pneumonias causadas por vírus ou por *Streptococcus pneumoniae*. Na difícil identificação do agente etiológico específico da pneumonia, atualmente são utilizados os parâmetros inflamatórios, não específicos, e o tipo de infiltrado pulmonar observado na radiografia torácica. Nestes casos a concentração da PCR parece ser mais útil do que a contagem convencional de leucócitos e a VHS (Korppi *et al.*, 1997).

Outras condições onde a determinação dos níveis de PC-R foi útil no diagnóstico e evolução das patologias foram a fibrose cística (Watkin *et al.*, 1994), a meningite (Peltola e Valmari., 1985) e a pielonefrite (Clyne e Olshaker., 1999).

Na prática pediátrica, a maior importância residiria no seu caráter preditor em níveis primários e de urgência em particular, naqueles pacientes geralmente menores de dois anos, no qual o problema a resolver é determinar se a causa de uma síndrome febril é bacteriana ou não, na ausência de infecções focais clinicamente identificáveis (Herrera e Duffau., 2005).

A PC-R pode ser determinada por diversos métodos imunológicos, sendo a nefelometria a técnica mais rotineiramente utilizada. A formação de agregados de PC-R com anticorpos específicos fornece resultados bastante precisos dentro de 15 a 30 minutos, utilizando pequena quantidade de soro (Jaye e Waites., 1997).

A determinação da PC-R pode ser realizada por imunoturbidimetria acoplada a um contador hematológico convencional e utilizando a mesma amostra de sangue colhida para a realização do hemograma. Além de apresentar baixo custo o resultado é obtido em poucos minutos, o que é especialmente interessante em situações emergenciais (Grotto *et al.*, 2002).

1.9- Amilóide sérico A (SAA)

A amilóide sérico A (SAA) possui uma única cadeia polipeptídica, não glicosilada de 12.000 Da. A molécula apresenta estruturas combinadas, hidrofóbicas e hidrofílicas, que proporcionam características de apolipoproteína e é sintetizada por hepatócitos em resposta a citocinas, especialmente IL-1 e TNF- α produzidos por monócitos e macrófagos (Serra., 1997; Marcondes *et al.* 2003).

A proteína SAA é uma PFA, tem uma grande sensibilidade diagnóstica e vem sendo apontada como um marcador precoce de atividade inflamatória. Entretanto, na rotina do laboratório clínico o seu uso ainda não está totalmente difundido (Serra., 1997).

A concentração de SAA pode aumentar de 3 a 100 mg/l em 24 a 48 horas após um estímulo inflamatório agudo e mantém-se em níveis altos na inflamação crônica (Marcondes *et al.*, 2003).

Uma das funções atribuídas a SAA seria a interferência no metabolismo do colesterol. Durante a RFA, a SAA associa-se à 3ª fração da HDL (HDL3), tornando-se a apolipoproteína predominante. Através da interação com a HDL3 ocorre redirecionamento do transporte do colesterol, a partir dos hepatócitos para os macrófagos que, então, fagocitam o colesterol e os restos lipídico dos sítios de necrose. Assim, o excesso de colesterol seria excretado ou poderia ser redistribuído para uso no reparo tecidual (Coetzee *et al.*, 1986).

A SAA é um potente estimulador da liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos leucócitos (Ribeiro *et al.*, 2003; Hatanaka *et al.*, 2004). Outras funções atribuídas à SAA seriam a inibição da febre induzida por IL-1 β e TNF α (via PGE2) em camundongos; inibição da ativação de trombina induzida por plaquetas; e a inibição do pico oxidativo de neutrófilos, que poderia ajudar a evitar a destruição oxidativa do tecido (Linke *et al.*, 1991). Estudos recentes têm sugerido que a SAA de fase aguda (SAA-A) teria função quimiotática para neutrófilos, monócitos e células T (Badolato *et al.*, 1994). Portanto, a SAA não

seria apenas um marcador para a inflamação, mas estaria também envolvida na patogênese desse processo (Serra, 1997).

A avaliação dos níveis circulantes de SAA parece ser de grande valor no diagnóstico de infecções bacterianas, assim como no monitoramento da eficácia do tratamento de infecções do trato urinário, infecções bacterianas em pacientes neutropênicos e em pacientes com fibrose cística e infecção associada (Marhaug *et al.*, 1983).

Devido à rápida elevação dos níveis séricos após baixos estímulos durante a resposta de fase aguda, a SAA tem sido proposta como um marcador mais sensível do que a PC-R na identificação e controle de infecções bacterianas, mesmo em recém-nascidos (Lannergard *et al.*, 2008).

O aumento da concentração de SAA foi relatado em infecções virais agudas como influenza, rinovírus, rubéola, citomegalovírus e varicela zoster (Nakayama *et al.*, 1993).

A vantagem da determinação da SAA sobre o PC-R ainda não está totalmente esclarecida. Em um estudo relacionando SAA e PC-R em pacientes com infecção, foi observada uma correlação moderada entre ambos. Como o SAA foi mais sensível que a PC-R para a detecção de estímulos inflamatórios menores, como na infecção viral com PC-R pouco elevada, os autores sugerem o uso desse marcador em infecções virais e em fases precoces de infecções bacterianas (Lannengard *et al.*, 2003).

Embora as concentrações de SAA e PC-R elevem-se paralelamente em muitas doenças, Maury., (1985) investigou se as determinações de SAA poderiam fornecer informações adicionais aos testes de PC-R. Rejeições de transplante renal puderam ser detectadas através da dosagem de SAA, mas permaneceram negativos para PC-R. Marhaug *et al.*, (1983) relataram também que a SAA foi mais sensível como indicador de infecção bacteriana pulmonar do que PC-R.

A intensidade de aumento da SAA, bem como a variação em seus níveis após um estímulo inflamatório, é similar ao observado para a PC-R e, como esta, seria um indicador sensível da lesão tecidual causada por agentes inflamatórios.

Eventualmente, podem ser observadas discrepâncias nos níveis das duas proteínas, talvez refletindo o diferente papel da citocinas em sua regulação (Serra., 1997).

Como o desempenho de cada marcador individualmente pode sofrer limitações em seu poder discriminatório, cada vez mais tem sido preconizada a associação de marcadores a fim de que se possa garantir uma acurácia diagnóstica mais elevada.

1.10- Interleucina -6 (IL-6)

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina de aproximadamente 26 Kda. A forma funcional da IL-6 é um homodímero, com cada subunidade formando um domínio com quatro α -hélices. É uma citocina pleiotrópica envolvida em muitos aspectos da resposta inflamatória. É produzida por monócitos, fibroblastos e células endoteliais em resposta direta a estímulos microbianos e indiretamente pelo fator de necrose tumoral e produção de IL-1 (Abbas e Lechtaman.,2005; Heney *et al.*,1992).

Em geral, a função da IL-6 no decurso da resposta de fase aguda é de suprimir o nível de citocinas proinflamatórias sem comprometer o nível de citocinas antiinflamatórias. Além disso, estimula a produção de receptor antagonista de IL-1, que é um mediador antiinflamatório. Por isso, a IL-6 pode ter um efeito protetor (Gabay., 2006).

Dadas as ações da IL-6 para restabelecer o estado homeostático, é evidente que a IL-6 funciona no controle do grau de resposta inflamatória tecidual. Nas infecções crônicas e tumores, a IL-6 participa tanto na resposta celular como na resposta humoral contra a reinfecção (Gabay.,2006).

A primeira evidência de IL-6 como um indutor da resposta de fase aguda veio de trabalhos com células humanas. Foi demonstrado que células Hep G2 sintetizam maiores quantidade de proteínas como fibrinogênio, α_1 - glicoproteína ácida e fator β do complemento após a estimulação com IL-6. Do mesmo modo a

indução das proteínas de fase aguda, PC-R e SAA, pode ser observada após o estímulo das células HepG2 ou Hep3B pela IL-6 (Heinrich *et al.*, 1990).

O receptor para IL-6 consiste em uma proteína de ligação à citocina e de uma subunidade transdutora de sinal, e ambas pertencem à família dos receptores de citocinas tipo I. As células alvo da IL-6 expressam em sua superfície seu receptor de baixa afinidade (IL-6R). O complexo IL-6-IL-6R induz a homodimerização do componente para o sinal de transdução (gp130) (Romano *et al.*, 1997). Quando duas moléculas do receptor são unidas pela ligação de uma molécula de citocina, as enzimas denominadas Janus-cinase (JAKs) associadas ao receptor se tornam ativadas através de transfosforilação. Elas também fosforilam resíduos de tirosina nas porções citoplasmáticas dos receptores agrupados. Algumas dessas metades são reconhecidas por domínios SH2 dos fatores de transcrição chamados transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STATs), os quais são fosforilados pelas JAKs associadas ao receptor. O domínio SH2 é capaz de se ligar a resíduos fosfotirosina de outra STATs. Como resultado, duas proteínas STATs se ligam uma à outra e se dissociam do receptor. Os dímeros de STATs migram para o núcleo, onde se ligam a seqüência de DNA nas regiões promotoras dos genes respondedores às citocinas e ativam a transcrição gênica (Abbas e Lichtman., 2005, Heinrich *et al.*, 1990).

Em um trabalho realizado por Heney *et al* (1992), a IL-6 mostrou ser um marcador preditivo mais sensível que a PC-R e ajudou a diferenciar no diagnóstico de grupos de crianças com neutropenia febril.

A quantificação sérica de citocinas poderá proporcionar para o clínico um entendimento fisiopatológico mais completo do processo inflamatório do que a proporcionada pelas PFA, auxiliando o diagnóstico e, principalmente, a aplicação de terapêuticas específicas dirigidas aos efeitos desta citocinas (Voltarelli., 1994).

Diante do exposto acima, fica evidente a complexidade da resposta de fase aguda, a variedade de elementos envolvidos e a complexa rede de ativação e inibição que coordena todo esse processo.

Na prática clínica a procura é por marcadores suficientemente sensíveis, específicos, de preferência de rápida execução e de baixo custo, que possam ser auxiliares no diagnóstico e na avaliação da intensidade do quadro. Na pediatria alia-se a preocupação em adotar-se medidas diagnósticas o menos invasivas possíveis.

A investigação de alguns desses marcadores motivou a realização desse trabalho com o objetivo maior de fornecer informações que possam contribuir no atendimento de crianças num serviço de emergência.

2- OBJETIVOS

2.1- Gerais: Avaliar o desempenho de alguns biomarcadores na detecção da presença de processo inflamatório/infeccioso em crianças.

2.2- Específicos:

- Testar e comparar diferentes métodos que avaliam a resposta aguda e determinar a acurácia dos mesmos como indicadores do processo inflamatório/infeccioso;
- Verificar se existe diferenças entre os grupos de pacientes com processo predominantemente inflamatório ou infeccioso quanto às determinações dos parâmetros laboratoriais (HMG, PC-R, VHS, SAA, IL-6);
- Verificar o desempenho da contagem diferencial leucocitária e a detecção do desvio à esquerda obtidas por automação e a possibilidade de substituição da contagem microscópica de células;
- No grupo infeccioso, verificar se existe diferenças entre os sub-grupos bacteriano e viral quanto as determinações dos parâmetros laboratoriais testados;
- Verificar se as dosagens de SAA e IL-6 são superiores às medidas utilizadas (HMG, VHS e PC-R) na rotina diagnóstica no reconhecimento da resposta de fase aguda;
- Avaliar alterações dos parâmetros laboratoriais na Dengue em crianças.

3-CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Local do estudo e procedência dos pacientes

O estudo foi desenvolvido na divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas (HC) da UNICAMP e os pacientes foram selecionados no serviço de Pediatria da Unidade de Emergência Referenciada (UER) do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

3.2- Pacientes

De março de 2007 a maio de 2008 foram selecionados para esse estudo 90 crianças entre 0 e 10 anos, de ambos os sexos. As crianças foram atendidas pelos médicos pediatras da UER/HC/UNICAMP, que a partir da história e exame físico fizeram a hipótese diagnóstica da presença de processo inflamatório/infeccioso de variadas origens. Seguindo os critérios da instituição, foram solicitados exames laboratoriais para esclarecimento diagnóstico. A partir da mesma punção venosa foram colhidas as amostras para esse estudo. Num segundo momento foram revistos os prontuários dos pacientes e com a colaboração dos mesmos pediatras da UER, foram definidos ou sugeridos os diagnósticos dos pacientes.

3.3- Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes que usavam antiinflamatórios e antibióticos no momento ou período da coleta.

3.4- Aspecto ético

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (anexo 1). Os responsáveis pelas crianças que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

3.5- Tipo de estudo: Prospectivo.

3.6- Métodos

3.6.1- Coleta das amostras

Os pacientes foram submetidos à punção venosa usando seringas plásticas e agulhas descartáveis. Foram colhidos 8 ml de sangue, distribuídos em dois tubos: um tubo com EDTA (para realização do hemograma, determinações da VHS e PC-R), e um com gel ativador de coágulo (para avaliação da PC-R, SAA e IL-6). O hemograma, a VHS e PC-R foram processados no dia da coleta. O soro foi preparado por centrifugação (1.500 g/minutos) e estocado a -80°C para posterior análise.

3.6.2- Análises realizadas

3.6.2.1 - Hemograma completo: foi realizado em três equipamentos hematológicos automatizados:

a. Contador automatizado Micros CRP 200 (Horiba Medical, Japão): Os parâmetros hematológicos determinados de sangue total são: número de leucócitos, hemácias e plaquetas por impedância e concentração de hemoglobina determinada através do método fotométrico. O diferencial de leucócitos é realizado em três partes: monócitos, linfócitos e granulócitos (neutrófilos segmentados, eosinófilos e basófilos).

b. Contador automatizado Pentra DX 120 (Horiba Medical, Japão). Os parâmetros hematológicos determinados de sangue total são: número de leucócitos, hemácias e plaquetas por impedância e concentração de hemoglobina determinada através do método fotométrico. O diferencial de leucócitos é realizado em cinco partes: monócitos, linfócitos, neutrófilos segmentados, eosinófilos e

basófilos. O aparelho libera alarmes (*flags*) indicativos da presença de desvio à esquerda.

c. Contador automatizado Sysmex XE 2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japão). Este aparelho realiza análises hematológicas de acordo com o método de detecção de RF/CC por pulsos elétricos para construir uma distribuição biodimensional (diagrama de dispersão) do tamanho das células sanguíneas e de sua densidade interna, focalização hidrodinâmica (Detecção CC) que aumenta a reprodutibilidade da contagem do sangue, método de citometria de fluxo (usando um laser semiconductor) para analisar células e partículas enquanto elas passam através de fluxo extremamente reduzidos e método SLS-hemoglobina. As células são classificadas de acordo com suas características e intensidade de luz difundida. O canal GB-diff é criado a partir de populações de GB: linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos.

d. Contagem diferencial de leucócitos por método manual: Foi realizada em esfregaço sangüíneo corado com May-Grünwald-Giemsa e observado à microscopia (2 lâminas/paciente; 200 células contadas pelo mesmo observador).

3.6.2.2- VHS:

Método automatizado (MicroTest 1X, Alifax-SPA, Itália): O método para leitura baseia-se em fotometria e capilaridade interrompida por análise da cinética sendo uma modificação do método de Westergren (De Jonge *et. al.*, 2000).

3.6.2.3 – PC-R: realizada em 2 sistemas distintos, mas que utilizaram a mesma reação para a dosagem-imunoturbidimetria:

a. Equipamento automatizado Micros CRP (Horiba Medical, Japão). A concentração da PC-R é determinada pela absorbância no comprimento de onda 850 nm após a reação de aglutinação com a formação do complexo antígeno-anticorpo. O ensaio compreende três fases: na primeira ocorre lise das hemácias

pela adição do reagente R1, então com a adição do reagente R2 ocorre a inibição dos possíveis interferentes e na terceira com a adição do reagente R3 que contém anticorpos anti-PC-R ligados à partículas de látex ocorre a formação do complexo antígeno-anticorpo. Os aglutinados de PC-R e látex são medidos através de espectrofotometria (Manual Micros CRP). Essa reação é realizada com o mesmo material em que é feito o hemograma e o resultado é fornecido em 4 minutos.

b. Equipamento automatizado Roche /Hitachi Modular, utilizando o kit CRPLX Tina-quant C-Reactive Protein (Roche Diagnostics, Germany). Os anticorpos anti-PC-R unidos com micropartículas de látex reagem com o antígeno da amostra para formar um complexo antígeno-anticorpo, submetido a leitura por espectrofotometria.

3.6.2.4- SAA:

A reação de nefelometria foi realizada em equipamento automatizado BN 100, (Dade Behring, Germany) utilizando o kit N Latex SAA (Siemens Healthcare Diagnostics, USA). As partículas de poliestireno carregadas de anticorpos contra SAA humano, ao serem misturadas com amostras contendo SAA, formam agregados que dispersam a luz. A intensidade da luz difusa depende da concentração da respectiva proteína na amostra. A interpretação é feita por comparação com um padrão de concentração conhecida.

3.6.2.5-IL-6:

A reação de ELISA para determinação da concentração de IL-6 foi realizada utilizando KIT da marca R&D Systems (Duo Set, RD Systems, EUA). Sucintamente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio, submetidas à incubação com as amostras e diluições do padrão recombinante do Kit. Em seguida, houve a incubação com anticorpos de detecção.

A incubação seguinte ocorre com uma solução de streptoavidina conjugada a peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB) e interrupção da reação ocorreu com a adição de H₂O₄ 2N. A leitura foi realizada em 450 nm.

Todos os equipamentos hematológicos foram calibrados segundo as normas dos fabricantes e o controle de qualidade dos resultados foi feito segundo o protocolo adotado pela Seção de Hematologia da Divisão de Patologia Clínica do HC/UNICAMP. Do mesmo modo, as determinações feitas com Kits comerciais seguiram rigorosamente as especificações e controle de qualidade recomendados pelos fabricantes.

3.7- Validação dos métodos:

a. Para verificação do nível de concordância entre as contagens hematológicas fornecidas pelos equipamentos, foram comparadas as contagens diferenciais dos leucócitos obtidas pela automação com a análise microscópica e a presença de granulócitos imaturos observadas à microscopia com emissão de alarmes pelos equipamentos.

b. Foi verificado o nível de concordância entre os valores de PC-R obtidas pelos 2 equipamentos usados no estudo.

c. Correlação Clínico-laboratorial: em todos os pacientes foram testados as positivities dos parâmetros laboratoriais na detecção do processo inflamatório/infeccioso.

Foram considerados como concordantes com a presença de processo inflamatório/infeccioso os seguintes valores:

- Presença de leucocitose de acordo com a idade (Andriolo e Carrazza., 2007), relação neutrófilos imaturos/neutrófilos totais > 0,2, de acordo com a contagem diferencial manual.

- VHS > 10,0mm (1ª hora)
- PC-R > 5,0 mg/L
- SAA > 6,4 mg/L

3.8- Análise Estatística:

- Estatística descritiva: média, desvio-padrão, valores mínimo, mediana e máximo.
- Para a comparação das medidas contínuas ou ordenáveis entre 2 grupos: foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Quando necessário ajuste para idade foi utilizada a ANOVA com transformação por postos.
- Comparação de proporções: foi utilizado o teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher, quando necessário.
- Concordância entre métodos foi aplicado o coeficiente de correlação intraclass (ICC). Valores acima de 0,70 são considerados como apresentando forte concordância.
- O teste Q de Cochran foi utilizado para comparar as proporções de positividade entre os métodos.
- Para verificar a concordância entre a positividade dos métodos e a presença do processo inflamatório/infeccioso foi utilizado o coeficiente Kappa. A magnitude é definida como: valores = 0,75 indicam excelente concordância, valores entre 0,75 e 0,40 indicam boa concordância e valores = 0,40 não indicam concordância.
- Apresentação gráfica através de box-plot do tipo esquemático onde são apresentados os valores descritos na figura abaixo.

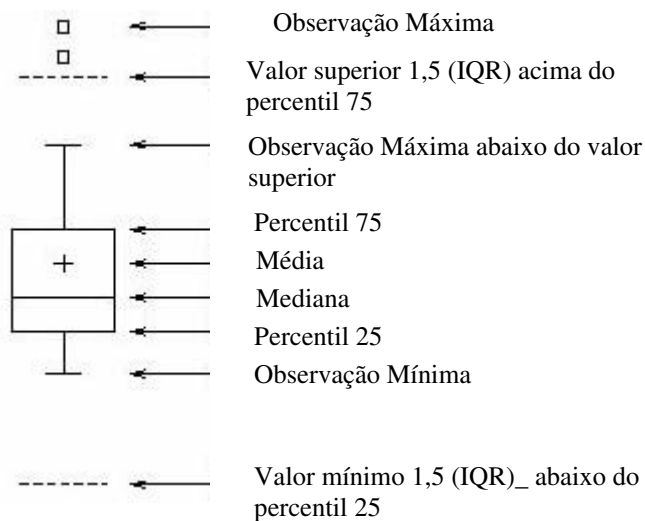


Figura 1- Apresentação esquemática do box plot.

- O nível de significância adotado para os testes foi de 5% ou $p = 0,05$.
- Os programas computacionais utilizados foram: SAS System for Windows (Statistical Analysis System) versão 9.1.3 Service Pack 3. SAS Institute INC, 2002-2003, Cary, NC, USA e SPSS for Windows, versão 10.0 SPSS Inc, 1989-1999, Chicago, Illinois, USA.
- Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo Serviço de Bioestatística da Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

4-RESULTADOS

4.1. Descrição da população

Foram estudadas 90 crianças de ambos os sexos (43 meninos e 47 meninas) com idade média de 24 meses com variação entre 1-120 meses. Sessenta e quatro crianças apresentaram febre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ no momento da coleta. Os diagnósticos foram agrupados em sistemas: nas doenças respiratórias (n=25) foram incluídos pacientes com pneumonia, bronquiolite e também pacientes com insuficiência respiratória aguda ou crônica agudizada. Nas doenças do trato gastrointestinal (n=17) foram descritos os episódios de vômitos, diarreia, dor abdominal, apendicite, além de hepatopatias. Nas doenças ósteo-articulares (n=7) foram incluídos os pacientes com piodartrites e doenças reumatológicas. Nas causas externas (n=3) constataram os traumas, ingestão e aspiração de corpo estranho. Nas outras doenças (n=31), foram incluídos os pacientes com febre sem foco, celulites e outras infecções. Em 7 pacientes não foi possível classificar o agente causador devido à insuficiência de dados (Tabela 1).

No anexo 2 estão resumidos os dados individuais das 90 crianças estudadas.

Tabela 1- Distribuição dos pacientes pediátricos atendidos na UER/HC UNICAMP de acordo com sexo, idade, presença de febre e diagnóstico de março de 2007 a Maio de 2008.

Variável	n	%
<u>Sexo</u>		
Feminino	47	52,22%
Masculino	43	47,77%
<u>Idade</u>		
< 5 anos	65	72,22%
> 5 anos	25	27,77%
<u>Febre</u>		
+	64	71,11%
-	26	28,88%
<u>Sistemas/Doenças*</u>		
Respiratório	25	27,77%
Gastrointestinal	17	18,88%
Ósteo Articular	7	7,77%
Causas Externas	3	3,33%
Outras doenças	31	34,44%

* Sete pacientes sem diagnóstico

4.2. Validação dos métodos

4.2.1. Contagem Global

As amostras de sangue de todos os pacientes foram processadas nos 3 equipamentos e foi observada uma forte concordância entre os métodos automatizados no que diz respeito às contagens globais do hemograma (Tabela 2) (Figuras 1.A-C).

Tabela 2-: Valores de mediana (mínimo e máximo) das contagens globais do hemograma e resultados das análises de concordância entre os métodos automatizados de pacientes pediátricos atendidos na UER/HC UNICAMP de março de 2007 a Maio de 2008.

Parâmetros/Métodos	Micros CRP 200	Pentra DX 120	XE 2100
<u>HGB (g/dL)</u>	11,30 (5,50-16,20)	11,50 (5,80-14,90)	12,00 (6,10-15,30)
ICC*		0,877	
IC		(0,82-0,91)	
<u>PLT (10³/μL)</u>	326,15 (94,0-754,0)	339,50 (99,0-853,0)	309,0 (93,0-729,0)
ICC*		0,949	
IC		(0,88-0,97)	
<u>GB (10³/μL)</u>	10,85 (0,70-32,40)	11,10 (2,70-32,20)	10,73 (2,80-32,8)
ICC*		0,975	
IC		(0,96-0,98)	

*Valores ICC acima de 0,70 são considerados como apresentando forte concordância.

HBG: Hemoglobina, PLT: plaquetas, GB: contagem de leucócitos, ICC: coeficiente de correlação intraclases, IC: intervalo de confiança.

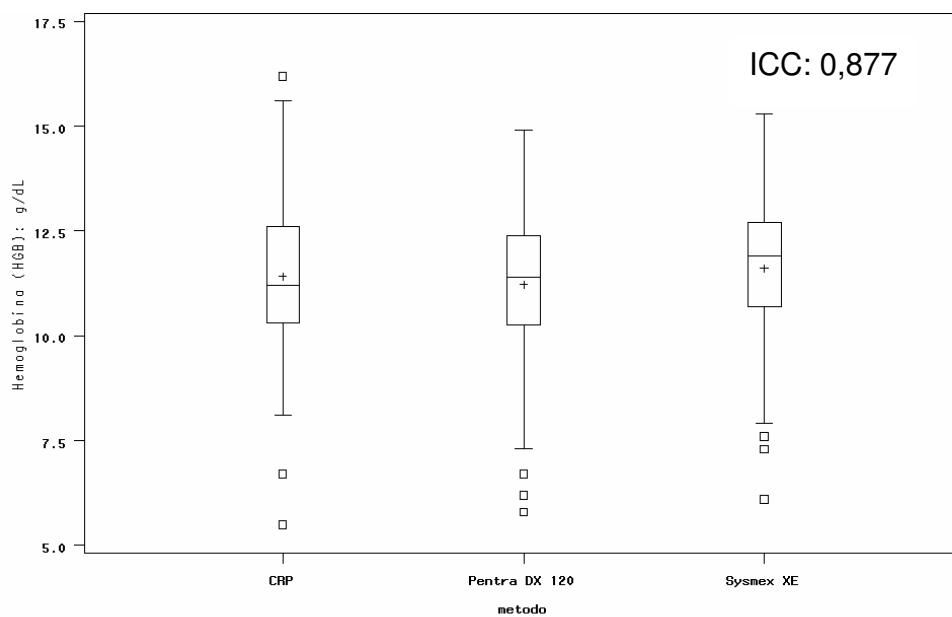


Figura 1.A-: Box plot dos valores de hemoglobina realizados pelos equipamentos Micros CRP 200, Pentra DX 120 e XE 2100.

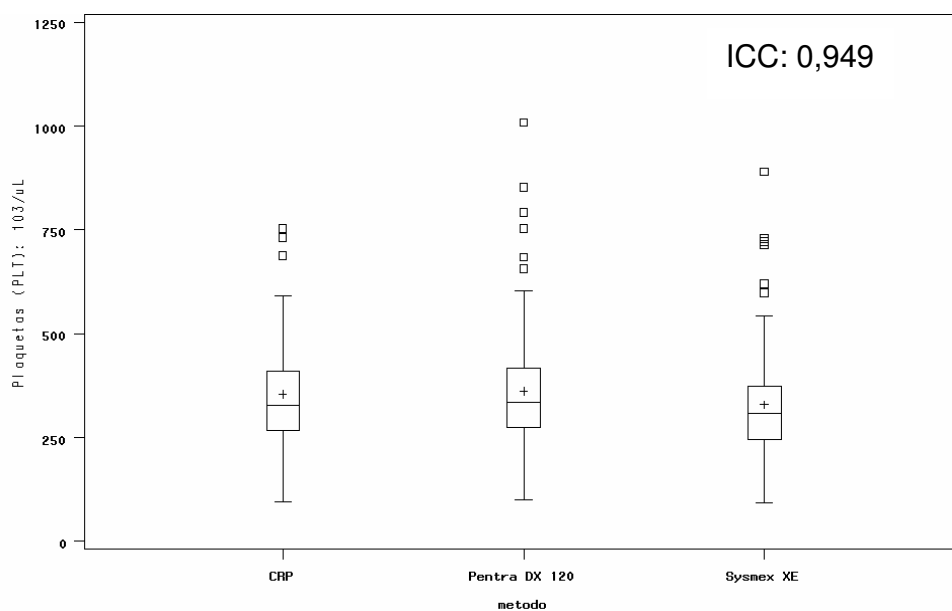


Figura 1.B-: Box plot das contagens de PLT realizadas pelos equipamentos Micros CRP 200, Pentra DX 120 e XE 2100.

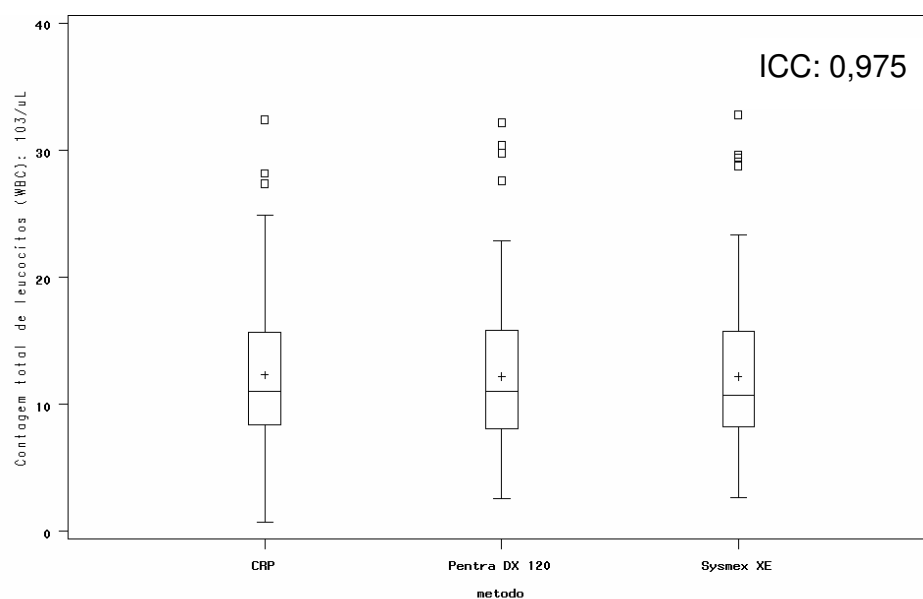


Figura 1.C-: Box plot das contagens de leucócitos realizados pelos equipamentos Micros CRP 200, Pentra DX 120 e XE 2100.

4.2.2. Contagem diferencial de leucócitos

As amostras de sangue foram submetidas à contagem diferencial leucocitária automatizadas e manual. Na tabela 3 encontram-se os valores das contagens dos métodos manuais (2 lâminas por pacientes/contadas 200 células pelo mesmo observador) e automatizados (Micros CRP 200, Pentra DX 120 e XE 2100). O diferencial de leucócitos realizado pelo Micros CRP 200 classificou as células em 3 tipos: monócitos, linfócitos e granulócitos (compreende os bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos e basófilos). Os outros métodos automatizados (Pentra DX 120 e XE 2100) realizam o diferencial em 5 classes: monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. As figuras 2 A-C mostram as distribuições dos valores fornecidos pelos diferentes equipamentos e contagem manual. Como pode ser observada na tabela 4 a melhor concordância entre os métodos foi obtida nas contagens de neutrófilos (ICC 0,892), seguidas das contagens de eosinófilos (ICC:0,801) e linfócitos (ICC 0,797). As contagens de monócitos e basófilos não alcançaram valor de ICC aceitável (0,130 e 0,269 respectivamente).

Tabela 3-: Valores de mediana (mínimo e máximo) da contagem diferencial de leucócitos determinados pelos três métodos automatizados e método manual de pacientes pediátricos atendidos na UER/HC UNICAMP de março de 2007 a Maio de 2008.

Métodos	Linfócitos %	Monócitos %	Neutrófilos %	Eosinófilos %	Basófilos %
Micros CRP 200	29,20 (0,70-62,70)	6,00 (1,40-16,90)	#	#	#
Pentra DX 120	34,00 (4,40-89,70)	11,90 (3,60-55,50)	50,00 (5,60-91,10)	0,80 (0-10,90)	0,30 (0-7,90)
XE 2100	33,70 (3,10-68,10)	9,30 (2,80-25,40)	53,70 (14,40-93,20)	0,60 (0-15,30)	0,30 (0-3,60)
Manual	33,00 (2,00-74,00)	5,50 (0-17,00)	57,00 (18,00-90,50)	0,00 (0-18,00)	0,00 (0-2,00)

aparelho não apresenta contagem diferencial em cinco partes.

* Valor máximo não deve ser considerado já que o equipamento não validou a contagem.

Tabela 4-: Resultados das análises de concordância entre os métodos na contagem diferencial de leucócitos de pacientes pediátricos atendidos na UER/HC UNICAMP de março de 2007 a Maio de 2008.

Métodos		ICC*	IC 95% Limite Inferior	IC 95% Limite Superior
LIN	Micros X Pentra X Sysmex X Manual	0,797	0,691	0,869
MON	Micros X Pentra X Sysmex X Manual	0,130	0,032	0,252
NEUT	Pentra X Sysmex X Manual	0,892	0,819	0,933
EOS	Pentra X Sysmex X Manual	0,801	0,732	0,857
BASO	Pentra X Sysmex X Manual	0,269	0,140	0,406

* Valores de ICC acima de 0,70 são considerados como apresentando forte concordância. LIN: linfócitos, MON: monócitos, NEUT: neutrófilos, EOS: eosinófilos, BASO: basófilos, ICC:coeficiente de correlação intraclasses, IC: intervalo de confiança.

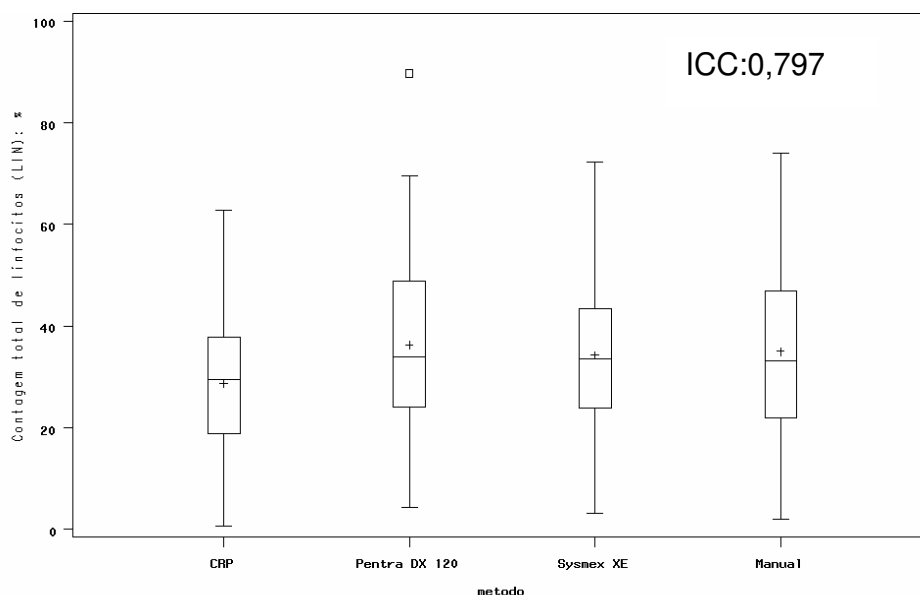


Figura 2.A-: Box plot das contagens de linfócitos realizado pelos equipamentos Micros CRP 200, Pentra DX 120, XE 2100 e pelo método manual.

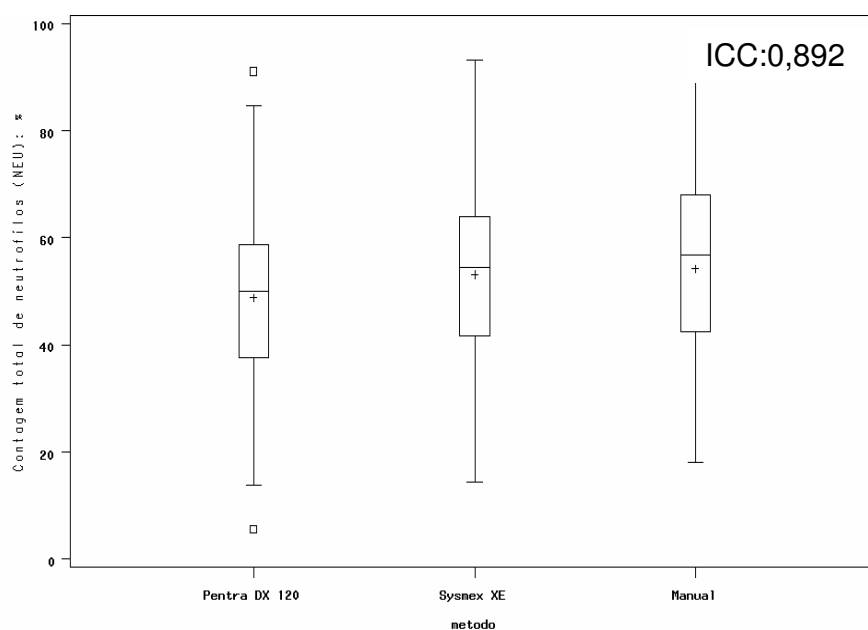


Figura 2.B- Correlações das contagens de neutrófilos realizadas pelos equipamentos Pentra DX 120, XE 2100 e pelo método manual.

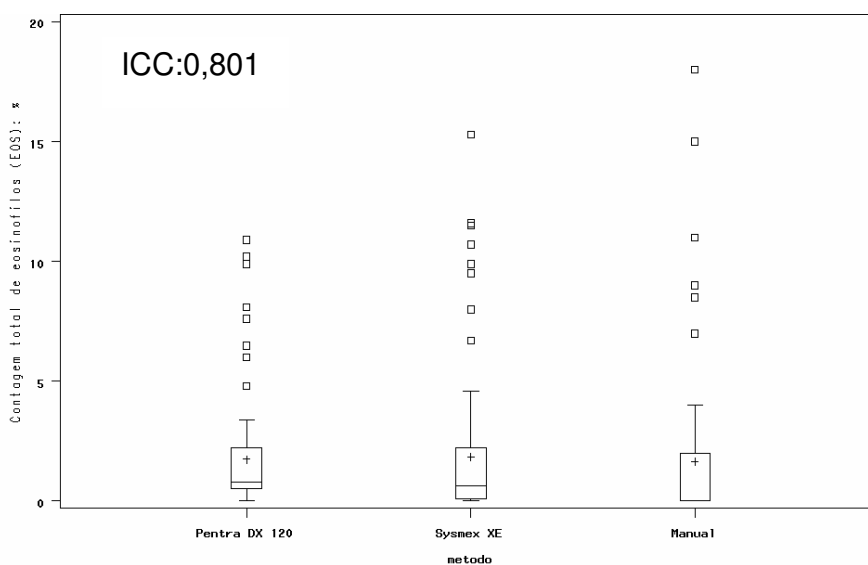


Figura 2.C- Correlações das contagens de eosinófilos realizado pelos equipamentos Pentra DX 120, XE 2100 e pelo método manual.

4.2.3 Acurácia dos sistemas automatizados em relação à detecção da presença de granulócitos imaturos.

Tendo como referência a contagem manual foi testada a acurácia dos equipamentos na emissão de alarmes indicativos da presença de granulócitos imaturos. O sistema XE 2100 mostrou melhor acurácia do que o Pentra DX 120, mas ambas abaixo do desejado, com pouca especificidade (Tabela 5).

Tabela 5- Valores da acurácia dos alarmes em relação ao desvio à esquerda em pacientes pediátricos atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008.

	XE 2100	Pentra DX 120
Sensibilidade	85,71	92,86
Especificidade	56,58	33,33
VP+	26,67	20,63
VP-	95,56	96,15
Acurácia	61,11	42,10

4.2.4- Comparação entre métodos de determinação da PC-R

Quanto aos marcadores de resposta inflamatória foram analisadas as concordâncias entre os métodos de dosagem de PC-R por 2 equipamentos (Micros CRP 200 e Modular/Hitachi) onde pôde ser observada uma forte concordância entre os níveis de PC-R dosados no soro X sangue pelo mesmo equipamento Micros CRP 200 (ICC=0,986), PC-Rsoro Micros CRP 200 X PC-Rsoro Modular/Hitachi (ICC=0,987) e também PC-Rsangue Micros CRP 200 X PC-Rsoro Modular/Hitachi (Tabela 6 e figuras 3 A-C).

Tabela 6-: Resultados das análises de concordância entre os métodos para dosagem de PC-R de pacientes pediátrico atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008.

Métodos		ICC*	IC 95% Limite Inferior	IC 95% Limite Superior
PC-Rso X PC-Rsa	Micros CRP 200	0,986	0,977	0,991
PC-Rso X PC-Rso	Micros CRP 200 X Modular	0,987	0,980	0,992
PC-Rsa X PC-Rso	Micros CRP X Modular	0,871	0,802	0,917

PCRso: Proteína C reativa dosada no soro, PCRs: Proteína C reativa dosada no sangue, ICC: coeficiente de correlação intraclasse, IC: intervalo de confiança.

* Valores de ICC acima de 0,70 são considerados como apresentando forte concordância

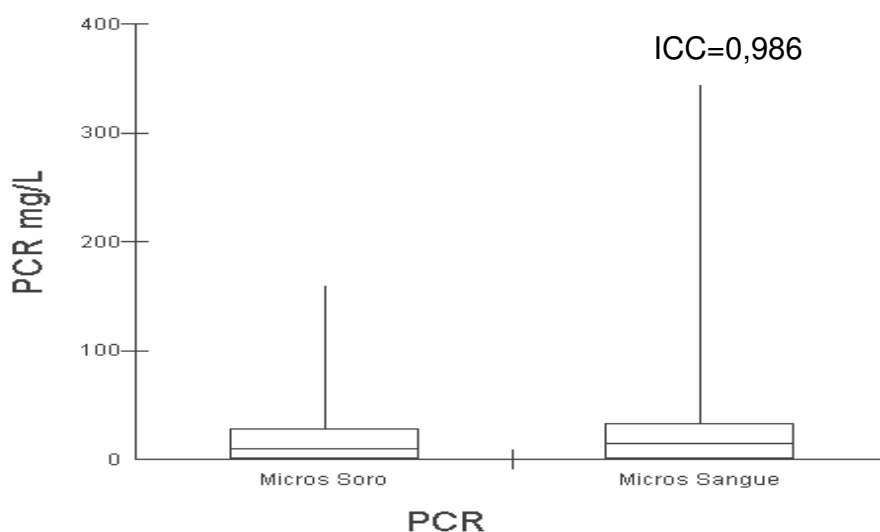


Figura 3.A-: Box-plot das dosagens de PC-R realizadas no soro e sangue pelo equipamento Micros CRP 200.

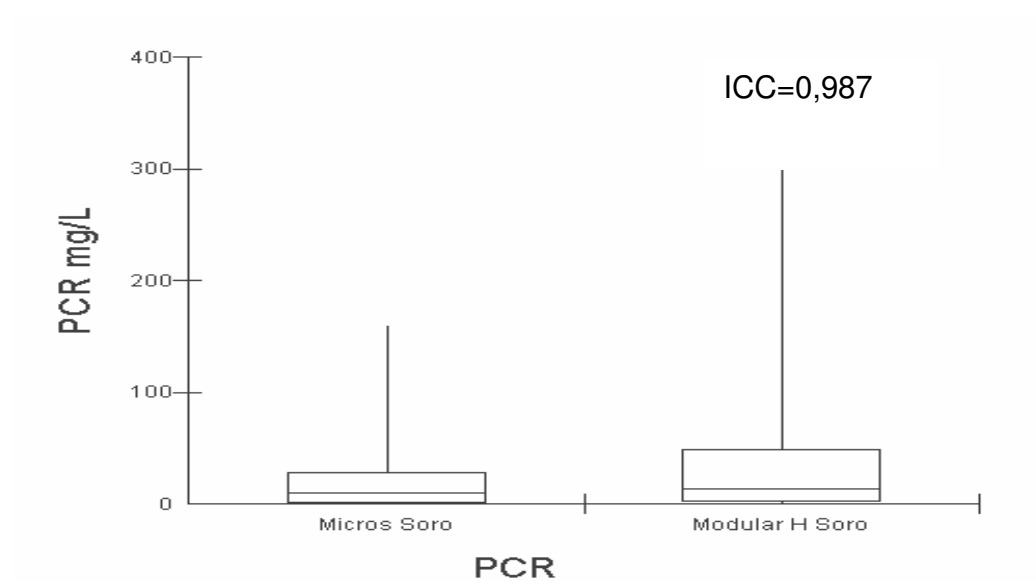


Figura 3.B-: Box-plot das dosagens de PC-R realizadas no soro nos equipamentos Micros CRP 200 e Modular/Hitachi.

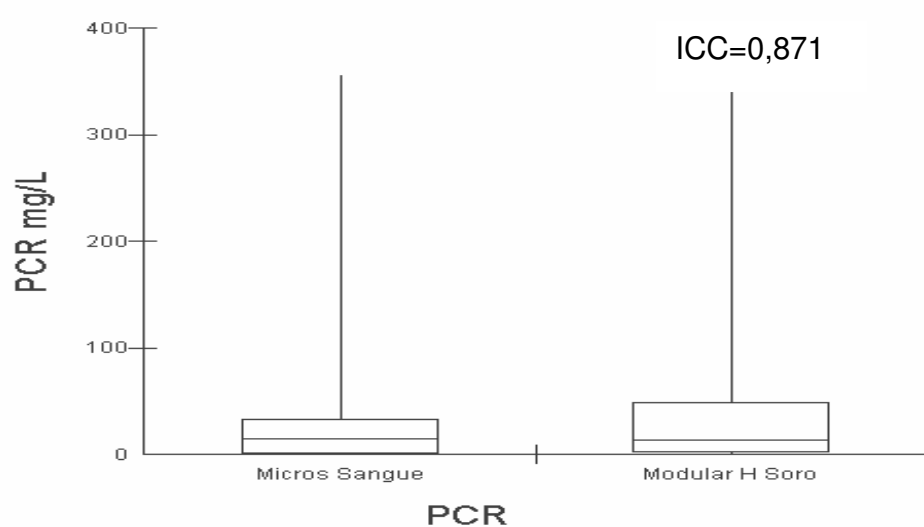


Figura 3.C-: Box-plot das dosagens de PC-R realizadas no sangue no Micros CRP 200 e no soro pelo equipamento e Modular/Hitachi.

4.3. Avaliação dos parâmetros laboratoriais nos grupos com inflamação e infecção.

A tabela 7 mostra os valores de mediana (mínimo-máximo) de parâmetros do hemograma e diferencial de leucócitos obtidos pelos 3 equipamentos e pela contagem diferencial de leucócitos manual de todos os pacientes estudados.

Tabela 7-: Valores de mediana (mínimo e máximo) dos parâmetros hematológicos fornecidos por 3 equipamentos e observação microscópica (n=90)

	Micros 200	CRP	Pentra DX 120	XE 2100	Manual
HGB (g/dL)	11,30 (5,50-16,20)		11,50 (5,80-14,90)	12,00 (6,10-15,30)	
PLT (10³/μL)	326,150 (94,00-754,00)		339,50 (99,00-853,00)	309,00 (93,00-729,00)	
GB (10³/μL)	10,85 (0,70-32,40)		11,10 (2,70-32,20)	10,73 (2,88-32,80)	
LINFO %	29,20 (0,70-62,70)		34,00 (4,40-89,70)	33,70 (3,10-68,10)	33,00 (2,00-74,00)
MONO %	6,00 (1,40-16,90)		11,90 (3,60-55,50)	9,30 (2,80-25,40)	5,50 (0,00-17,00)
NEUTRO %	#		50,00 (5,60-91,10)	53,70 (14,40-93,20)	57,00 (18,00-90,50)
EOSINO %	#		0,80 (0,00-10,90)	0,60 (0,00-15,30)	0,00 (0,00-18,00)
BASO %	#		0,30 (0,00-7,90)	0,30 (0,00-3,60)	0,00 (0,00-2,00)

HGB:Hemoglobina, PLT:plaquetas, GB: contagem total de leucócitos, Linfo: linfócitos, Mono:monócitos, Neutro: neutrófilos, Eosino:eosinófilos, Baso: Basófilos.

Na tabela 8 encontram-se os valores das dosagens de PC-R, SAA, IL-6 e determinações de VHS no grupo de crianças estudadas (n=90), onde pode ser observado que os valores das medianas de todos os parâmetros estão acima do normal e o intervalo entre valores mínimo e máximo está bastante alargado, evidenciando a grande diversidade dos resultados.

Tabela 8-: Valores mediana (mínimo e máximo) dos marcadores da resposta inflamatória de pacientes pediátrico atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008(n=90).

Marcadores	Mediana (Mínimo-Máximo)
PC-R so (mg/l) Micros CRP 200	10,00 (0,00-159,90)
PC-R sa (mg/l) Micros CRP 200	15,00 (0,00-350,60)
PC-R so (mg/l) Modular/Hitachi	14,00 (0,00-330,90)
SAA (ml/L)	43,00 (0,70-1610,00)
VHS (mm)	22,00 (2,00-120,00)
IL-6 (pg/ml)	32,845 (20,704-242,967)

PC-Rso:proteína C reativa dosado no soro, PC-R as: proteína C reativa dosado no sangue, SAA: amilóide sérico A, VHS: velocidade de hemossedimentação e IL-6: interleucina-6.

4.3.1 Comparação entre os grupos inflamatório e infeccioso

Ao comparar o grupo inflamatório (n=17) e infeccioso (n=66) observou-se que não houve diferença significativa entre os parâmetros: contagem de GB, concentração de HGB e o número de PLT obtido nos 3 equipamentos (Tabela 9).

Tabela 9- Valores de mediana (mínimo e máximo) das contagens globais do hemograma nos grupos inflamatório e infeccioso de pacientes pediátricos atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008.

Variável	n	Infeccioso	n	Inflamatório	p
GB Micros CRP 200 ($10^3/\mu\text{L}$)	55	11,10 (0,70-32,40)	13	10,10 (5,40-16,80)	0,2715
GB Pentra DX 120 ($10^3/\mu\text{L}$)	66	12,37 (2,60-32,20)	16	9,20 (4,65-16,70)	0,0743
GB XE 2100 ($10^3/\mu\text{L}$)	66	11,84 (2,69-32,80)	17	9,37 (4,5-17,50)	0,1334
HGB Micros CRP 200 (g/dL)	54	11,05 (5,50-16,20)	13	10,30 (6,70-14,90)	0,2772
HGB Pentra DX 120 (g/dL)	66	11,32 (5,80-14,90)	16	11,72 (6,70-13,80)	0,9254
HGB XE 2100 (g/dL)	66	11,75 (6,10-15,30)	17	11,90 (7,30-14,70)	0,5496
PLT Micros CRP 200 ($10^3/\mu\text{L}$)	55	331,00 (94,00-754,00)	13	308,00 (132,50-555,00)	0,2009
PLT Pentra DX 120 ($10^3/\mu\text{L}$)	66	332,25 (99,00-1009,00)	16	309,00 (127,00-793,00)	0,1920
PLT XE 2100 ($10^3/\mu\text{L}$)	66	309,00 (93,00-891,00)	17	300,00 (123,50-715,00)	0,3072

* Valores que apresentaram $p \leq 0,05$ são estatisticamente diferentes segundo teste de Mann Whitney

GB: contagem total de leucócitos, HGB: Hemoglobina, PLT: plaquetas.

Resultados semelhantes foram observados quanto à contagem diferencial de leucócitos (Tabela 10).

Tabela 10-: Valores de mediana (mínimo e máximo) das contagens diferenciais de leucócitos nos grupos inflamatório e infeccioso de pacientes pediátricos atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008.

Variável	Infeccioso		Inflamatório		p
	n		n		
Linfo Micros CRP 200 %	54	27,50 (0,70-62,70)	13	30,70 (13,90-41,60)	0,8243
Linfo Pentra DX 120 %	66	33,60 (4,40-89,70)	16	32,42 (13,00-50,20)	0,4646
Linfo XE 2100 %	66	31,35 (3,10-72,20)	17	33,40 (13,00-51,30)	0,7478
Linfo Manual %	66	30,25 (2,00-74,00)	17	34,00 (18,50-51,00)	0,7012
Mono Micros CRP 200 %	54	5,75 (1,40-16,90)	13	6,90 (4,00-10,50)	0,5156
Mono Pentra DX 120 %	66	12,70 (3,60-55,50)	16	9,70 (6,90-22,80)	0,0486
Mono XE 2100 %	66	9,45 (2,30-25,40)	17	8,60 (6,70-17,10)	0,4133
Mono Manual %	66	5,50 (0,00-17,00)	17	5,00 (2,50-15,00)	0,5340
Neutro Pentra DX 120 %	62	44,90 (5,60-91,10)	16	55,60 (37,10-76,10)	0,0990
Neutro XE 2100 %	66	54,50 (14,40-93,20)	17	56,90 (35,10-78,20)	0,6640
Neutro Manual %	66	57,75 (18,00-90,50)	17	56,00 (34,00-72,00)	0,9012
Eosino Pentra DX 120 %	66	0,60 (0,00-10,20)	16	1,50 (0,20-9,90)	0,0576
Eosino XE 2100 %	66	0,30 (0,00-11,50)	17	1,30 (0,00-11,60)	0,1288
Eosino Manual %	66	0,00 (0,00-18,00)	17	0,50 (0,00-9,00)	0,6799
Baso Pentra DX 120 %	66	0,30 (0,00-7,90)	16	0,30 (0,10-1,30)	0,4705
Baso XE 2100 %	66	0,30 (0,10-2,80)	17	0,30 (0,00-3,60)	0,7361
Baso Manual %	66	0,00 (0,00-2,00)	17	0,00 (0,00-1,00)	0,1785

Linfo:Linfócito, Mono:Monócito, Neutro:Neutrófilo, Eosino:Eosinófilo e Baso:Basófilo.

* Valores que apresentaram $p \leq 0,05$ são estatisticamente diferentes segundo teste de Mann Whitney

4.3.2. Comparação dos valores dos marcadores de fase aguda entre os grupos inflamatório e infeccioso

Não houve diferença significativa entre os parâmetros: VHS, concentrações séricas de PC-R, SAA e IL-6 entre os grupos inflamatório e infeccioso. Na tabela 11 encontram-se os resultados dessas determinações.

Tabela 11-: Valores de mediana (mínimo e máximo) dos marcadores do processo inflamatório/infeccioso de pacientes atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008.

Parâmetro	Infeccioso		Inflamatório		p
	n		n		
VHS (mm)	58	22,50 (2,00-120,00)	16	22,00 (2,00-120,0)	0,4578
PC-Rso Micros CRP 200 (mg/l)	58	9,70 (0,00-150,90)	16	8,25 (0,00-154,10)	0,5029
PC-Rsa Micros CRP 200 (mg/l)	54	14,30 (0,00-350,58)	13	25,00 (0,00-204,90)	0,7743
PC-Rso Modular/Hitachi (mg/l)	66	14,65 (0,20-330,91)	17	10,30 (0,00-201,80)	0,2474
SAA (ml/L)	66	46,80 (0,70-1610,00)	17	39,70 (0,70-591,00)	0,6557
IL-6 (pg/mL)	58	32,35 (20,70-242,96)	17	33,25 (23,25-395,46)	0,4984

VHS: Velocidade de hemossedimentação, PC-Rso:Proteína C Reativa soro, PC-Rsa:Proteína C Reativa sangue, SAA:Soro Amilóide A e IL-6:Interleucina-6.

Ao comparar os subgrupos bacteriano e viral foram observados valores significativamente superiores no grupo com infecção bacteriana nos seguintes parâmetros: contagem de leucócitos Pentra DX 120, contagem de leucócitos XE 2100, PC-Rsa Micros CRP 200, PCR-so Modular/Hitachi e SAA (Tabela 12 e figuras 4. A-E).

Tabela 12-: Valores de mediana (mínimo e máximo) e comparações dos parâmetros avaliados no grupo infeccioso subdivididos em bacteriano e viral de pacientes pediátricos atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008.

Marcador	n	Infeccioso		p
		Bacteriano	n Viral	
Leuco Micros CRP 200 (10 ³ /μL)	18	16,10 (0,70-32,40)	35 10,60 (3,10-23,10)	0,1042
Leuco Pentra DX 120 (10 ³ /μL)	21	16,60 (4,80-32,20)	43 9,93 (2,60-22,90)	0,0082
Leuco XE 2100 (10 ³ /μL)	21	15,86 (4,92-32,80)	43 10,20 (2,69-23,35)	0,0128
VHS >(mm)	17	33,00 (2,00-12,00)	39 18,00 (2,00-120,00)	0,1209
PC-Rso Micros CRP 200 (mg/l)	15	18,10 (0,00-145,50)	41 8,50 (0,00-159,00)	0,2915
PC-Rsa Micros CRP 200 (mg/l)	17	23,30 (0,00-355,80)	35 8,40 (0,00-209,50)	0,0200
PC-Rso Modular/Hitachi (mg/l)	21	22,30 (0,20-339,10)	43 7,60 (0,50-293,00)	0,0055
SAA (ml/L)	21	149,00 (0,70-1610,00)	43 27,40 (0,70-754,00)	0,0314
IL-6 (pg/mL)	15	31,69 (20,70-242,96)	41 32,13 (20,76-161,70)	0,9116

Leuco: Contagem total de leucócitos, VHS: Velocidade de hemossedimentação, PC-Rso:Proteína C Reativa soro, PC-Rsa:Proteína C Reativa sangue, SAA:Soro Amilóide A e IL-6:Interleucina-6.

* Valores que apresentaram $p \leq 0,05$ são estatisticamente diferentes segundo teste de Mann Whitney.

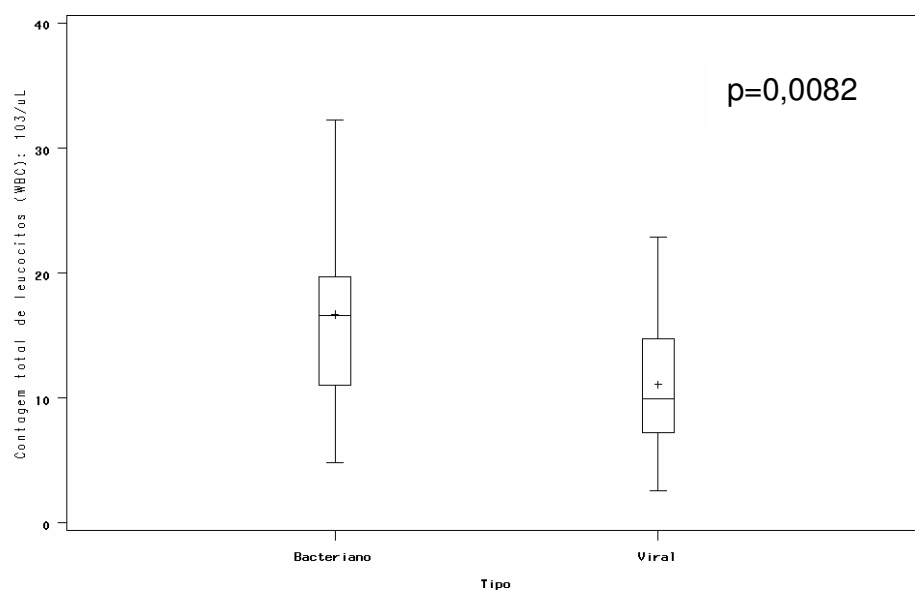


Figura 4. A-: Box plot das contagens de leucócitos pelo equipamento Pentra DX 120 nos subgrupos bacteriano e viral

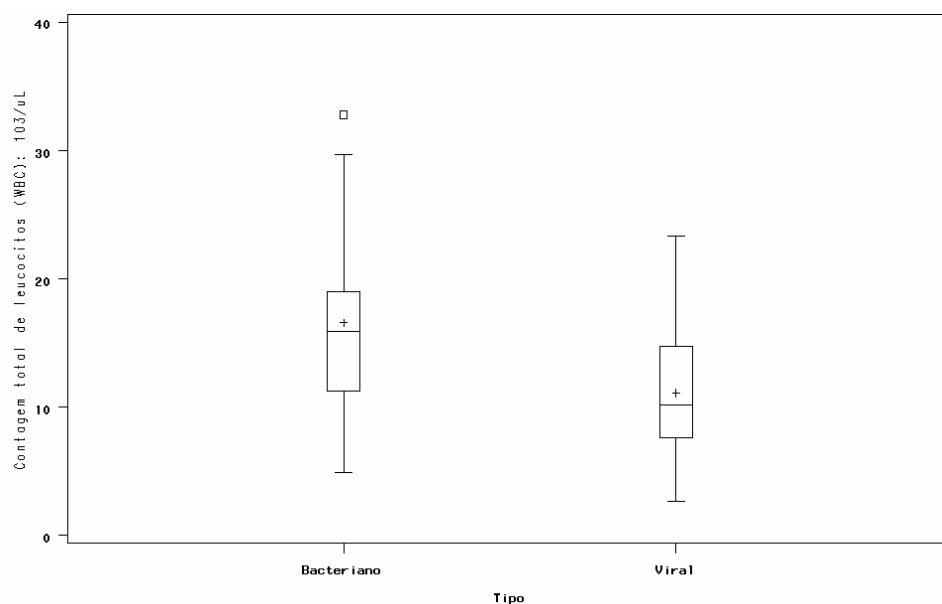


Figura 4.B-: Box plot das contagens de leucócitos pelo equipamento XE 2100 nos subgrupos bacteriano e viral.

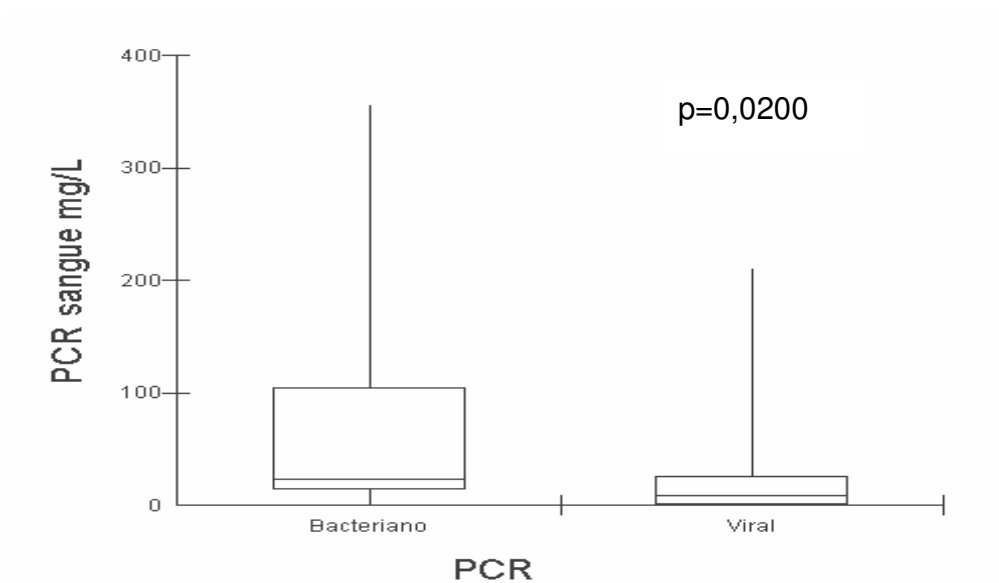


Figura 4.C-: Box plot da determinação de PC-R dosado no sangue pelo equipamento Micros CRP 200 nos subgrupos bacteriano e viral.

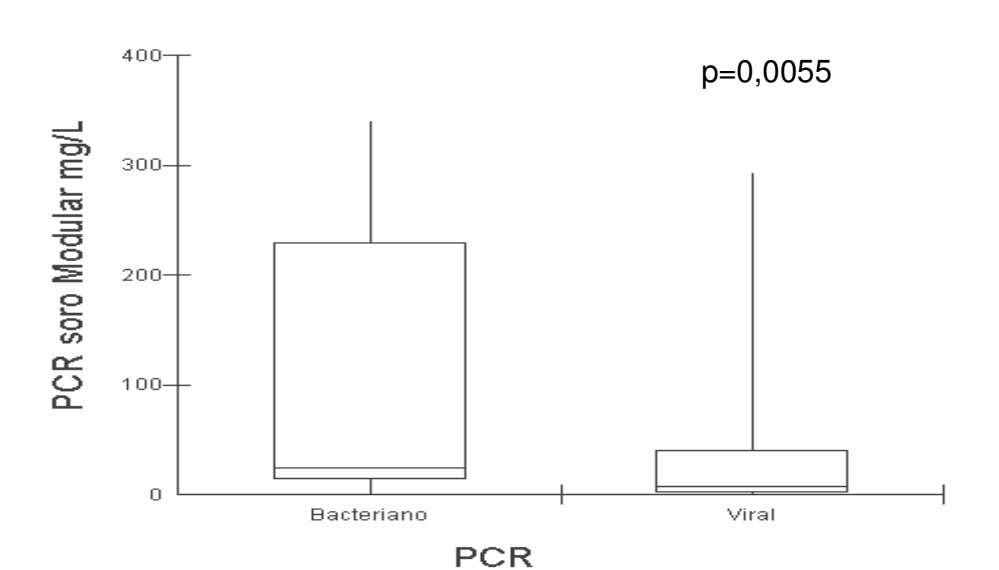


Figura 4.D-: Box plot da determinação de PC-R dosado no soro pelo equipamento Modular/Hitachi nos subgrupos bacteriano e viral.

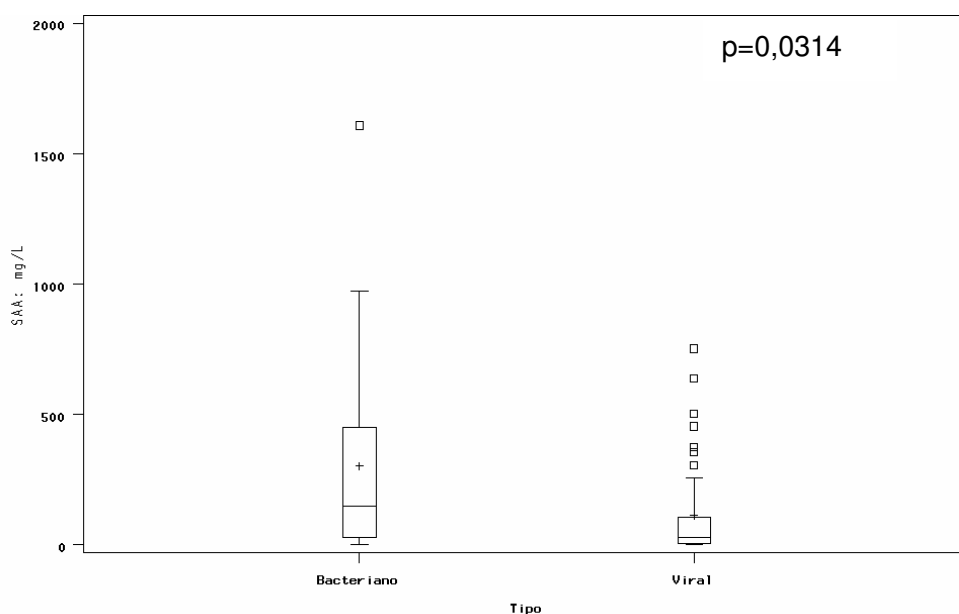


Figura 4. E-: Box plot da determinação de SAA nos subgrupos bacteriano e viral.

4.4. Eficiência dos diversos parâmetros laboratoriais na identificação da presença de processo inflamatório/infeccioso.

Considerando os parâmetros leucocitose, relação de neutrófilos imaturos/neutrófilos totais $> 0,2$, VHS $> 10,0$ mm, PC-R $> 5,0$ mg/L e SAA $> 6,4$ mg/L como indicativos da presença de processo inflamatório/infeccioso, foi verificada a concordância da positividade dos métodos (coeficiente Kappa). Como pode ser observado na tabela 13, o melhor coeficiente de concordância foi obtido com as dosagens de PC-R, seguidas das determinações da VHS e SAA. O pior desempenho foi mostrado pela relação neutrófilos imaturos/neutrófilos totais.

Tabela 13-: Frequência da positividade dos marcadores da resposta inflamatória nos pacientes pediátricos com processo inflamatório/infeccioso atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008.

Marcador	Frequência		IC Kappa	IC 95%
	n	%		
Leucocitose Micros CRP 200 ($10^3/\mu\text{L}$)	15	20,55%	0,20	0,11-0,31
Leucocitose Pentra DX 120 ($10^3/\mu\text{L}$)	17	19,10%	0,19	0,11-0,28
Leucocitose XE 2100 ($10^3/\mu\text{L}$)	19	21,11%	0,21	0,13-0,30
VHS >10 (mm)	57	72,15%	0,72	0,60-0,81
PC-Rso Micros CRP 200 > 5,0 mg/l	66	80,49%	0,80	0,70-0,88
PC-Rsa Micros CRP 200 > 5,0 mg/l	60	80,00%	0,80	0,69-0,88
PC-Rso Modular/Hitachi > 5,0 mg/l	80	89,89%	0,89	0,81-0,95
SAA >6,4ml/L	65	73,03%	0,73	0,62-0,81
Relação Neutro Imaturo/Total >0,2	2	2,22%	0,02	0,00-0,07

VHS:Velocidade de hemossedimentação, PC-Rso:Proteína C Reativa soro,PC-Rsa:Proteína C Reativa sangue, SAA:Soro Amilóide A,

Quando o grupo com processo inflamatório/infeccioso foi dividido em pacientes com infecção e inflamação foi observada maior frequência de positividade nos valores de PC-R obtido pelo equipamento Modular/Hitachi no grupo de pacientes com infecção, os demais marcadores não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela 14).

Tabela 14-: Frequência dos marcadores da resposta inflamatória nos grupos inflamatório e infeccioso em pacientes atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008.

Marcador	Infeccioso (n=66)		Inflamatório (n=17)		p
	n	%	n	%	
Leucocitose Micros CRP 200 ($10^3/\mu\text{L}$)	14	25,45	1	7,69	0,2692
Leucocitose Pentra DX 120 ($10^3/\mu\text{L}$)	16	24,24	1	6,25	0,1714
Leucocitose XE 2100 ($10^3/\mu\text{L}$)	16	24,24	3	17,65	0,7501
VHS >10 (mm)	43	74,14	9	64,29	0,5131
PCRso Micros CRP 200 (mg/l)	51	85,00	10	66,67	0,1380
PCRsa Micros CRP 200 (mg/l)	46	83,64	9	64,29	0,1393
PCRso Modular/Hitachi (mg/l)	62	93,94	12	75,00	0,0429
SAA > 6,4 (ml/L)	50	75,76	12	75,00	1,0000
Relação Neutro Imaturo/Total	2	3,03	0	0,00	-

Leuco: Contagem total de leucócitos, VHS: Velocidade de hemossedimentação, PCRso: Proteína C Reativa soro, PCRsa: Proteína C Reativa sangue, SAA: Soro Amilóide.

P=valor de p (teste de Fisher)

4.5. Análise dos pacientes com Dengue

Dos sessenta e seis pacientes do grupo com infecção, onze tinham suspeita clínica de Dengue. Analisando esse conjunto de pacientes observamos que o grupo com suspeita de dengue apresentou valores significativamente inferiores nas contagens de plaquetas e de leucócitos, o que manteve após o ajuste conforme a idade dos pacientes (Tabela 15 e figuras 5 A-D).

Tabela 15-: Valores de mediana (mínimo e máximo) dos parâmetros relacionados ao hemograma avaliados no grupo de pacientes pediátricos atendidos na UER/HC UNICAMP com suspeita de Dengue comparando com o restante do grupo com infecção (n=11) no período de Março de 2007 a Maio de 2008.

Variável	n	Infeccioso		p
		Sem Dengue	Dengue	
Leuco Micros CRP 200 ($10^3/\mu\text{L}$)	30	11,35 (3,80-23,10)	5 8,30 (3,10-9,60)	* 0,0359 ** 0,1098
Leuco Pentra DX 120 ($10^3/\mu\text{L}$)	32	12,72 (3,80-22,90)	11 7,20 (2,60-13,40)	* 0,0012 ** 0,0006
Leuco XE 2100 ($10^3/\mu\text{L}$)	32	12,28 (3,71-23,35)	11 7,62 (2,69-13,62)	* 0,0012 ** 0,0054
HGB Micros CRP 200 (g/dL)	29	10,70 (5,50-16,20)	5 12,60 (10,70-120,00)	* 0,0718
HGB Pentra DX 120 (g/dL)	32	11,12 (5,80-14,70)	11 12,30 (9,60-14,60)	* 0,0232 ** 0,1637
HGB XE 2100 (g/dL)	32	11,35 (6,10-14,90)	11 12,50 (9,60-14,40)	* 0,0331 ** 0,2322
PLT Micros CRP 200 ($10^3/\mu\text{L}$)	30	356,50 (195,00-754,00)	5 267,00 (94,00-300,00)	* 0,0284 ** 0,0968
PLT Pentra DX 120 ($10^3/\mu\text{L}$)	32	386,25 (227,50-1009,00)	11 204,50 (99,00-395,00)	* 0,0002 ** 0,0006
PLT XE 2100 ($10^3/\mu\text{L}$)	32	350,50 (213,00-891,00)	11 185,50 (93,00-445,50)	* 0,0008 ** 0,0025

Leuco: Contagem total de leucócitos, HGB: Hemoglobina, PLT: plaquetas.

* Valores que apresentaram $p \leq 0,05$ são estatisticamente diferentes segundo teste de Mann Whitney. ** Anova com transformação por postos ajustados para a idade.

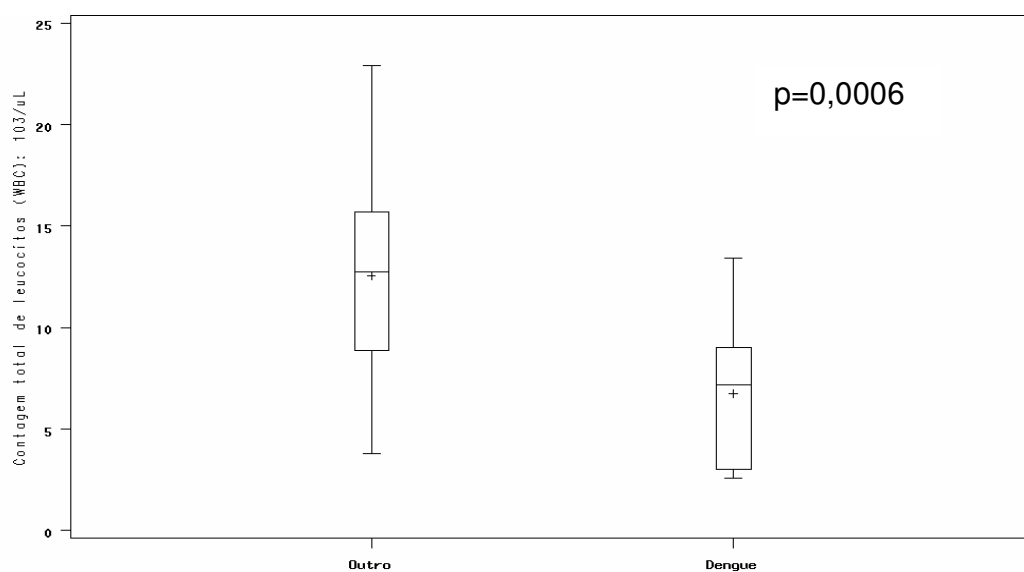


Figura 5. A-: Box plot das contagens de leucócitos pelo equipamento Pentra DX 120 nos pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

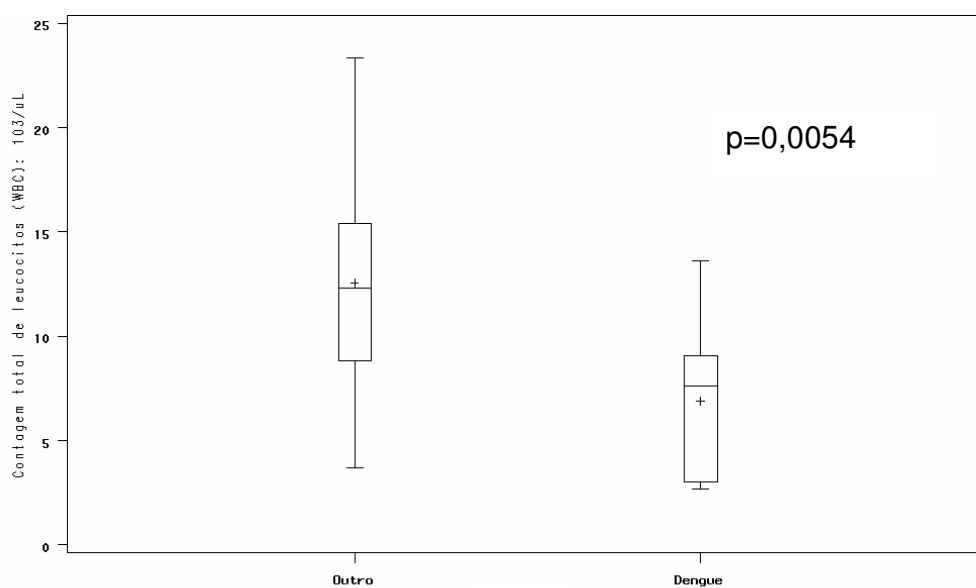


Figura 5.B-: Box plot das contagens de leucócitos pelo equipamento XE 2100 nos pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

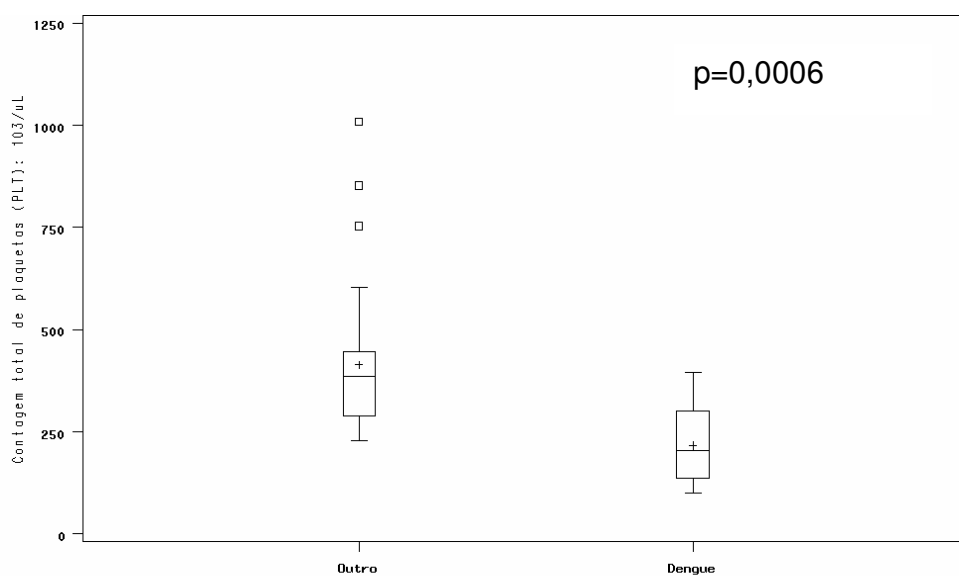


Figura 5.C-: Box plot das contagens de plaquetas pelo equipamento Pentra DX 120 nos pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

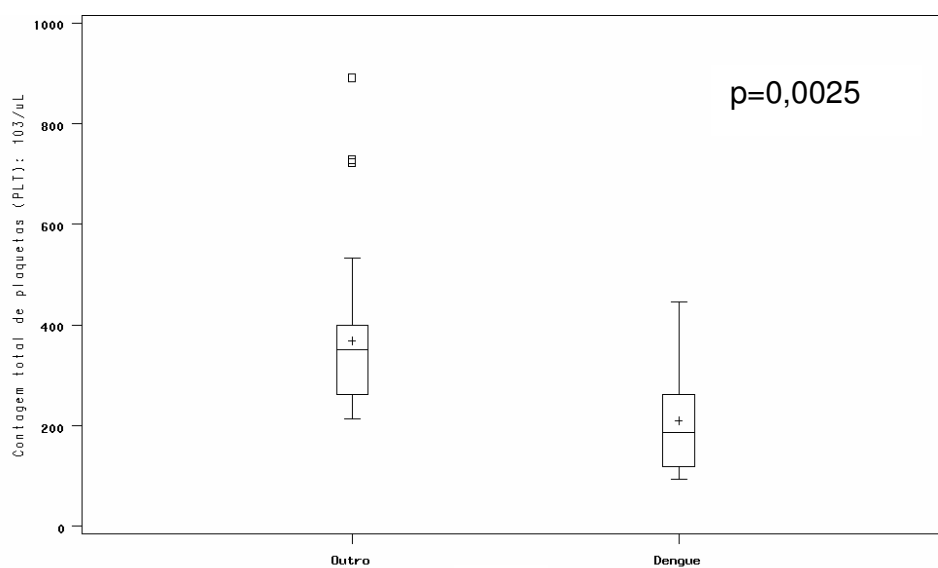


Figura 5.D-: Box plot da contagem de plaquetas pelo equipamento XE 2100 nos pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

Ao comparar os pacientes com dengue com os demais indivíduos com processo infeccioso, não foi observada diferença nos valores dos marcadores séricos de inflamação, com exceção da VHS que foi inferior nos pacientes com dengue (Tabela 16 e figura 6).

Tabela 16-: Valores de mediana (mínimo e máximo) dos marcadores do processo inflamatório/infeccioso avaliado nos grupos de pacientes pediátricos com e sem Dengue atendidos na UER/HC UNICAMP de Março de 2007 a Maio de 2008.

Variável	n	Infeccioso		p
		Sem Dengue	Dengue	
VHS (mm)	29	21,00 (2,00-120,00)	10 7,50 (2,0-53,00)	* 0,0310 ** 0,0210
PCRso Micros CRP 200 (mg/l)	30	8,00 (0,00-159,00)	11 9,40 (0,10-95,70)	0,5861
PCRsa Micros CRP 200 (mg/l)	30	7,90 (0,00-209,50)	5 9,00 (1,80-30,90)	0,9060
PCRso Modular/Hitachi (mg/l)	32	7,40 (0,50-293,00)	11 8,60 (0,60-79,20)	0,7807
SAA (ml/L)	32	36,45 (0,70-754,00)	11 16,00 (2,4-376,00)	0,7807
IL-6 (pg/mL)	30	30,33 (20,76-161,70)	11 33,02 (21,08-360,22)	0,2962

VHS: Velocidade de hemossedimentação, PCRso:Proteína C Reativa soro, PCRsa:Proteína C Reativa sangue, SAA:Soro Amilóide A e IL-6:Interleucina-6.

* Valores que apresentaram $p \leq 0,05$ são estatisticamente diferentes segundo teste de Mann Whitney

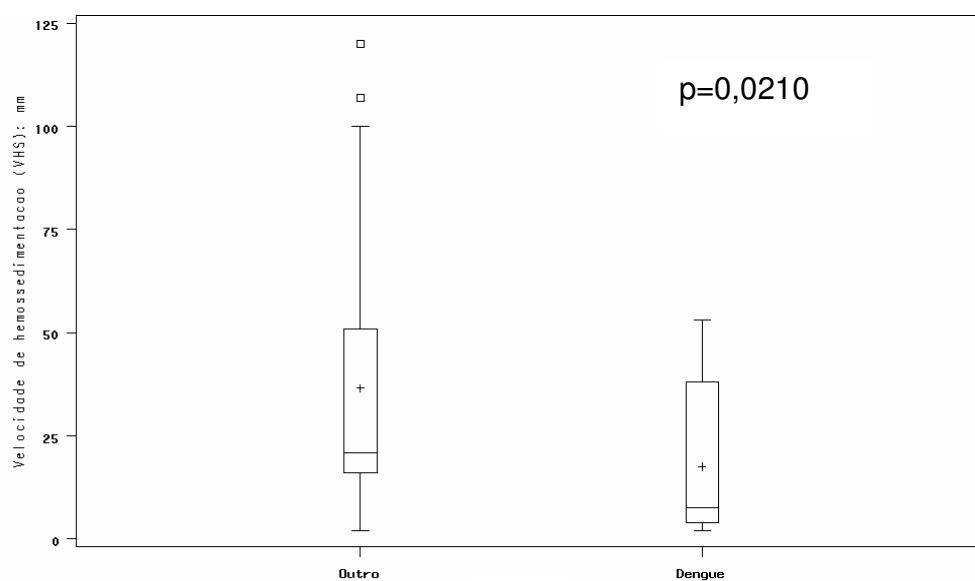


Figura 6: Box plot da determinação de VHS no grupo de pacientes com suspeita de dengue e no restante do grupo com infecção.

5-DISSCUSSÃO

Os principais efeitos sistêmicos de uma reação inflamatória consistem em febre, leucocitose e aumento de concentração sérica de PFA, que são largamente utilizadas na clínica para detecção e monitoramento da resposta inflamatória. O presente trabalho teve como objetivo avaliar alguns marcadores da resposta inflamatória e determinar a sensibilidade e especificidade do leucograma, VHS, PC-R e SAA na detecção da inflamação/infecção em crianças atendidas num serviço de urgência. O nosso grupo de estudo foi constituído na maior parte de pacientes menores de cinco anos e, dentro dessa faixa etária, 42,22% tinham entre 1 mês e 1 ano de idade.

Inicialmente foi feita uma validação dos métodos. As contagens globais (HGB, PLT e GB) foram realizadas em três equipamentos que mostraram um bom coeficiente de correlação, o que nos permite dizer que os três sistemas podem ser utilizados para a obtenção desses parâmetros. Em relação à contagem diferencial automatizada dos leucócitos os três métodos foram comparados com a contagem diferencial manual realizada à microscopia. A melhor correlação com a contagem manual foi observada nas contagens pelos equipamentos Pentra DX 120 e XE 2100, o que era esperado já que esses dois sistemas separam os leucócitos em 5 classes, enquanto o Micros CRP 200 fornece uma contagem diferencial parcial. No que diz respeito à verificação da presença de granulócitos imaturos (desvio à esquerda), a acurácia dos alarmes em detectar essa anormalidade foi abaixo do desejado, principalmente às custas da baixa especificidade dos métodos automatizados. Assim, embora a contagem automatizada de GB seja bastante útil na agilização da rotina laboratorial, sua utilização é especialmente indicada para

selecionar as amostras com nenhuma ou pouca alteração. A observação morfológica das células não deve ser substituída pela automação, principalmente nos hemogramas anormais. Na investigação da presença de desvio à esquerda, a revisão microscópica dos esfregaços sanguíneos deve ser realizada sempre que o equipamento emitir alarmes, a fim de confirmar ou não a presença de células imaturas.

Na avaliação da determinação da PC-R utilizamos dois equipamentos (Micros CRP 200 e Modular/Hitachi) que utilizam o método de imunoturbidimetria e obtivemos correlações significativas entre eles quando a dosagem foi feita tanto no soro como no sangue. A dosagem de PC-R é avaliada em diversas doenças e sua utilização tem sido ampliada na prática clínica. No mercado diagnóstico as empresas constantemente estão lançando novos ensaios ou sistemas que possam incrementar ou melhorar a qualidade dos resultados. A facilidade de operacionalização, a utilização de pequeno volume de sangue (18µL) e uma rápida resposta (< 5 minutos para CBC e PC-R) são características que tornam o Micros CRP 200 instrumento útil nas áreas da pediatria, UTI e doenças infecciosas e ainda tem a vantagem de utilizar o mesmo sangue coletado tanto para a dosagem de PCR como para a análise hematológica (Davis e Bigelow., 2001, Grotto *et al.*, 2002). De acordo com a recomendação dos fabricantes, a PC-R determinada pelo Micros CRP 200 deve ser feita no sangue total enquanto no equipamento Hitachi as dosagens são realizadas no soro. Assim comparamos os resultados obtido pelo Micros CRP 200 no sangue e no soro com os valores fornecidos pelo Hitachi para verificarmos se haveria diferenças dependendo do

tipo de material analisado. Embora, em geral, a concordância entre os métodos tenha sido forte, melhores coeficientes foram observados com as medidas obtidas a partir do soro. No conjunto, os nossos resultados mostraram que a utilização desse sistema pode ser interessante num Serviço de Urgência Pediátrica, uma vez que rapidamente podem ser obtidas as contagens hematológicas globais e os níveis de PC-R. Esses dados podem ser importantes para a abordagem inicial do paciente e para o direcionamento na requisição de novos exames subsidiários que auxiliem no esclarecimento diagnóstico.

A partir da validação dos métodos, procedemos à análise da eficácia dos mesmos em um grupo de crianças que apresentavam características clínicas sugestivas da presença de processo inflamatório/infeccioso. Os parâmetros avaliados foram: leucograma, VHS, dosagem de PC-R, SAA, IL-6 e a relação neutrófilos imaturos/neutrófilos totais.

Várias alterações hematológicas são observadas nos quadros infecciosos, dependendo do agente etiológico, extensão e local da infecção. As possíveis alterações observadas ao hemograma quanto à composição e morfologia dos leucócitos correspondem à cinética e função das células envolvidas nos processos de defesa contra um determinado agente infeccioso (Grotto., 2009). Os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos exercem sua ação microbicida de forma mais ampla contra vários tipos de agentes e são células importantíssimas para a defesa do hospedeiro (Machado *et al.*, 2004). A mobilização intensa dos neutrófilos, inclusive dos estoques medulares na defesa contra as bactérias, explica a frequência do aparecimento da neutrofilia no hemograma de pacientes infectados por bactérias

gram-positivas e dependendo do grau de estímulo, células mais jovens podem ser liberadas precocemente da medula óssea, caracterizando o “desvio à esquerda”. Por outro lado, infecções causadas por bactérias gram-negativas, particularmente aquelas que resultam em bacteremia, cursam com neutropenia, provavelmente em decorrência de uma maior aderência dos neutrófilos ao endotélio dos vasos ou uma maior utilização no local da infecção. O grande comprometimento da resposta imune mediada por células na reação aos vírus, explica porque a linfocitose é tão comum nos processos infecciosos virais agudos, mas a linfopenia não afasta a possibilidade desse diagnóstico (Grotto., 2009). Além disso, na infecção viral a contagem de neutrófilos pode ser normal, reduzida ou pouco elevada (Beutler *et al.*, 2001). Portanto, a contagem de leucócitos tem de ser interpretada no contexto clínico. Embora ela seja aceita e amplamente utilizada, é importante salientar que não é específica nem muito sensível (Pfafflin e Schleicher., 2009).

Os resultados obtidos no nosso trabalho reforçam esse conceito, uma vez que mostraram a limitada contribuição da contagem de leucócitos para o diagnóstico das doenças inflamatórias ou infecciosas. A heterogeneidade na resposta leucocitária pode explicar o grande intervalo de variação nas contagens de leucócitos observadas nesse estudo e a pouca eficácia desse parâmetro na detecção da presença da doença, em concordância com outros dados da literatura (Póvoa *et al.*, 2005, Silvestre *et al.*, 2009, Lannergard *et al.*, 2003, Davis., *et al* 2006, Cardall *et al.*, 2004). Bonsu *et al.*, (2003) num estudo em que foi testada a acurácia da contagem de leucócitos periféricos na identificação de crianças febris com bacteremia com até 89 dias de idade, sugerem que o modesto desempenho

da contagem de leucócitos pode ser devido aos patógenos causadores da bacteremia ou à imaturidade do sistema imune das crianças nessa faixa de idade. Embora no nosso grupo a média de idade tenha sido superior (24 meses), as hipóteses sugeridas pelos autores podem ser por nós também consideradas.

Quanto aos marcadores séricos a elevação dos níveis de PC-R foi registrado em mais de 80% do pacientes com processo inflamatório/infeccioso, com valores entre 0 e 355,80 mg/l, níveis já descritos em outros estudos (Deodar., 1989; Santolaya *et al.*, 1994). Quando o grupo com infecção foi subdividido em bacteriano e viral, níveis significativamente superiores de PC-R foram observados no grupo bacteriano, em concordância com dados da literatura (Tejani *et al.*, 1995, Del Baccaro *et al.*, 1992). No estudo de Borgnolo *et al.* (1996) foi relatado que além dos valores de PC-R diferiram significativamente entre as infecções bacteriana e viral, esse índice foi melhor do que a determinação da VHS na distinção etiológica da gastroenterite infantil. Entretanto esta distinção não é absoluta; níveis altos de PC-R podem ocorrer em infecções causadas por adenovírus, citomegalovírus, gripe, sarampo, caxumba e outras viroses. Nas doenças bacterianas a elevação acentuada da PCR pode significar maior destruição tecidual (Hansson *et al.*, 1993; Clarke e Cost., 1983). Assim, embora a PCR não possa ser usada para classificar com precisão a etiologia microbiana, pode ser valiosa se analisada em conjunto com outros testes e dados clínicos, tanto no diagnóstico como na avaliação da resposta terapêutica (Jaye e Waites., 1997).

A elevação da VHS foi observada em 72,15% dos nossos pacientes, mas os valores de mediana foram igualmente elevados nos grupos inflamatório e infeccioso, assim como entre os grupos infecciosos bacteriano e viral, conforme descrito anteriormente por outros autores (Nohynek *et al.*, 1995). Apesar de ainda ser utilizado rotineiramente na prática clínica, o exame apresenta poucas indicações precisas devido à baixa sensibilidade e especificidade, além de ser influenciada por vários fatores como: variação diurna, sexo, idade, alimentação, e alterações no número, tamanho e forma das hemácias (Kushner.,1982). Tem a vantagem de ser um teste de fácil execução, rápido e de baixo custo, mas de eficiência limitada.

O mecanismo pelo qual estímulos inflamatórios induzem os hepatócitos a sintetizar a SAA e outras proteínas de fase aguda tem sido objeto de intensa investigação nos últimos anos. Segundo Pizzini *et al.*, (2000) a SAA tem uma elevação mais rápida e acentuada que a PC-R. A SAA é mais sensível a estímulos menores, o que acontece nas infecções virais, ao contrario da PC-R que apresenta níveis séricos similares tanto na infecção bacteriana como na viral. Assim é sugerido que a SAA seja um marcador mais sensível do que a PC-R na detecção dessas infecções (Lannergard *et al.*, 2003). No nosso estudo observamos uma correlação significativa entre os níveis de SAA e PC-R ($r=0,776$), mas a porcentagem de resultados positivos de SAA foi de 73,03 % , enquanto que a porcentagem de resultados positivos de PC-R foi de 80,00 a 89,89% dependendo do método utilizado. Não houve diferença de frequência de positividade na SAA entre os grupos inflamatório e infeccioso, o que foi observado

com as medidas de PC-R. No entanto, quando o grupo infeccioso foi subdividido em bacteriano e viral a SAA seguiu a mesma tendência da PC-R, tendo os maiores níveis no grupo bacteriano para ambas as medidas. Resultados semelhantes foram relatados por Nakayama *et al.*, (1993) em um trabalho sobre monitoramento de marcadores de doenças infecciosas, em que foi observado que tanto a PC-R como a SAA tiveram níveis mais elevados em infecções bacterianas do que nas virais. Os mecanismos responsáveis por esses diferentes padrões de resposta são ainda desconhecidos, mas pode-se supor que as citocinas sintetizadas durante a infecção viral possam exercer efeitos diferentes sobre a síntese de PC-R e SAA (Miwata *et al.*, 1993; Maury., 1985). Além da utilização desses dois biomarcadores no diagnóstico das infecções foi testada a possibilidade dos mesmos serem úteis na avaliação da gravidade das doenças infecciosas em crianças (Huttunen *et al.*, 2003). Foi observado pelos pesquisadores uma correlação significativa entre as medidas de PC-R e SAA. Adicionalmente, a relação SAA/PC-R variou significativamente de acordo com a gravidade dos quadros infecciosos, sendo menor nos pacientes mais graves.

Os nossos resultados sugerem que a determinação dos níveis de SAA não acrescentam informação além das fornecidas pela PC-R, com a desvantagem do custo por reação ser bastante elevado e ser um teste ainda não implantado na rotina laboratorial.

A IL-6 desempenha um papel fundamental na regulação da fase aguda (Castell *et al.*, 1989). Essa interleucina é produzida por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B e células

endoteliais. Tem ação multifuncional e interativa, e está envolvida em uma série de eventos fisiológicos e fisiopatológicos, tais como estimulação da hematopoiese, ativação e diferenciação de linfócitos T, maturação de linfócitos B em plasmócitos, além de importante atuação nos processos inflamatórios (Le e Vilcek, 1989). A principal ação da IL-6 no processo inflamatório/infeccioso é o estímulo da produção de outros componentes da resposta aguda, o que ocorre na fase mais precoce da agressão. A partir desse estágio, o que fica mais evidente é o aumento das proteínas sintetizadas em resposta a IL-6, como o fibrinogênio, PC-R e SAA (Abbas e Lichtman., 2005).

No nosso estudo não houve diferença significativa nos níveis séricos de IL-6 entre os grupos inflamatório e infeccioso, e entre os com infecção não houve diferença entre os grupos bacteriano e viral. Semelhantemente, Toikka *et al.*, (2000) relataram que os níveis séricos de procalcitonina, PC-R e IL-6 tiveram pouco valor na diferenciação da pneumonia bacteriana e viral em crianças. No entanto, diversos trabalhos na literatura apontam para a possibilidade da IL-6 ser útil na diferenciação do tipo de infecção causadora da febre. Em um estudo com crianças febris e neutropênicas foi observado que níveis séricos de IL-6 foram significativamente mais elevados no grupo infectado por bactérias gram-negativas do que por bactérias gram-positivas e ambos os grupos superiores ao grupo com febre de origem indeterminada. Além disso, a IL-6 foi um marcador de infecção mais sensível do que a PC-R (Heney et al 1992). Resultados semelhantes foram relatados em crianças neutropênicas com câncer (Lehrnbecher *et al.*, 1999, Spasova *et al.*, 2005). A aparente controvérsia nos resultados provavelmente é

conseqüente ao momento em que foi feita a coleta do sangue nos diferentes trabalhos. Como a IL-6 é um marcador precoce, que tem sua síntese aumentada no início do processo agudo, os seus níveis serão mais elevados quanto mais precocemente o sangue for colhido. Outras dificuldades da determinação da IL-6 plasmática devem-se à meia-vida da citocina que é bastante curta e à presença de fatores bloqueadores que poderiam interferir nas dosagens. Assim, apesar da evidente elevação dos níveis de IL-6 em muitas doenças inflamatórias/infecciosas, aparentemente sua determinação não apresenta vantagens adicionais à medida da PC-R (Gabay e Kushner., 1999). Além disso, tem o custo da reação, ainda bastante alto para um exame de rotina.

Dentro do grupo por nós investigado tivemos onze crianças com suspeita clínica de dengue. Infelizmente o diagnóstico de certeza obtido pela sorologia não foi estabelecido. No entanto, algumas considerações podem ser feitas a partir de alguns resultados que obtivemos. A dengue, uma doença febril aguda resultante da infecção pelo vírus da família de Flaviridae transmitido predominantemente pelo mosquito *Aedes aegypti* (Henchal e Putnak., 1990), tornou-se endêmica em regiões tropicais e subtropicais e apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, desde uma febre indiferenciada até dengue grave e a síndrome do choque da dengue. No grupo suspeito por nós estudado observamos níveis inferiores de leucócitos e plaquetas. A leucopenia ($< 4,0 \times 10^9 /L$) é a anormalidade hematológica mais comumente observada e pode ser causada pela indução do vírus sobre a destruição ou inibição das células mielóides progenitoras. A trombocitopenia, com valores inferiores a $50 \times 10^9 /L$ está presente em

aproximadamente 50 a 65% dos casos e as possíveis causas são a depressão medular durante a fase aguda da infecção, infecção direta do megacariócito pelo vírus ou a presença de anticorpos direcionados contra as plaquetas, destruindo-as (Grotto., 2009, Lin *et al.*, 1989).

Quanto aos marcadores séricos a VHS apresentou valores significativamente inferiores no grupo de pacientes com suspeita de dengue, provavelmente conseqüente à hemoconcentração e hipoalbuminemia que esses pacientes apresentam. O extravasamento do plasma para os tecidos parece ser o responsável pelo estado de hemoconcentração (Souza *et al.*, 2008). Isso contrasta com o perfil de VHS em pacientes com doenças bacterianas e pode ser auxiliar no diagnóstico diferencial. Por outro lado, as medidas de PC-R, SAA e IL-6 não apresentaram diferenças significativas entre o grupo com suspeita de dengue e o grupo com outras infecções. A elevação dos níveis de IL-6 foi relatada em outros estudos com pacientes com dengue e foi observado que maiores valores estiveram relacionados com as formas mais graves da infecção (Juffrie *et al.*, 2001). Em outro trabalho realizado em pacientes colombianos não foram observadas diferenças entre as formas clínicas, mas os níveis de IL-6 foram significativamente superiores no grupo com dengue comparado com o grupo controle (Restrepo *et al.*, 2008).

Quanto à PC-R, resultados semelhantes aos nossos foram relatados por Juffrie *et al.*, (2001) onde não houve diferenças entre o grupo com dengue e o grupo de pacientes com outras infecções.

Vale ressaltar que no nosso estudo existe a possibilidade de alguns pacientes inicialmente diagnosticados como tendo infecção pelo *Aedes aegypti* na verdade apresentassem outra patologia, uma vez que não foi feito o exame sorológico para confirmação. Assim, os nossos resultados devem ser avaliados com cautela e merecem uma investigação mais detalhada, com maior número de pacientes e com exame sorológico comprobatório. Uma abordagem mais completa seria interessante para um melhor entendimento da participação desses biomarcadores na dengue.

Várias considerações devem ser ressaltadas antes de se utilizar marcadores da resposta de fase aguda como instrumentos de diagnóstico. Elas incluem o fato de que nem todos os microrganismos induzem uma resposta de fase aguda e que as infecções virais podem estar associados com uma diminuição ao invés de um aumento na intensidade da resposta aguda (Rotstein *et al.*, 2002). Além disso, crianças desnutridas podem não responder com uma intensa resposta inflamatória, a despeito da patogenicidade do microrganismo infectante. Certas bactérias patogênicas, como o pneumococo, irão provocar um maior grau de inflamação do que outras bactérias, tais como patógenos anaeróbicos ou oportunistas (Urbach *et al.*, 2004). É consenso que a utilidade de um único biomarcador poderá não ser suficiente para o diagnóstico, porque a intensidade e o tempo da resposta de cada marcador tem uma característica própria diante de um mesmo estímulo (Gabay e Kushner., 1999).

Algumas ressalvas devem ser feitas referentes à execução desse trabalho, que podem ter interferido ou limitado a interpretação dos resultados encontrados.

A primeira delas diz respeito ao diagnóstico das crianças estudadas, que foi baseado em dados clínicos e laboratoriais, mas cuja confirmação microbiológica não foi feita em todas elas, o que pode ter levado a possíveis equívocos na classificação de alguns pacientes. A segunda refere-se ao período entre a instalação do processo e a coleta do sangue. É possível que quadros inflamatórios e infecciosos de diferentes idades tenham ocasionado resultados não esperados, levando-se em conta que as proteínas de fase aguda e os leucócitos tem dinâmicas próprias durante as diversas fases da resposta aguda, e de diferentes intensidades dependendo do agente etiológico, local acometido e gravidade do quadro.

6- CONCLUSÕES

Podemos concluir através desse estudo que:

- A contagem diferencial de leucócitos obtida pelos equipamentos hematológicos automatizados testados não substitui a contagem manual à microscopia, quando houver suspeita da presença de granulócitos imaturos;
- A leucocitose não foi um bom biomarcador de resposta aguda;
- Embora a VHS tenha mostrado valores elevados na maioria dos pacientes, não foi capaz de diferenciar o grupo inflamatório do infeccioso, assim como os grupos com infecção bacteriana do viral;
- A concordância entre os métodos para determinação de PC-R mostrou que o sistema Micros CRP pode ser utilizado num serviço de urgência com a vantagem de fornecer os resultados rapidamente e a um baixo custo;
- A determinação da SAA embora tenha mostrado bons níveis de positividade não acrescentou informações além das fornecidas pela PC-R;
- Entre os biomarcadores estudados, a PC-R foi a que mostrou melhor desempenho na detecção da presença da inflamação/infecção, como a SAA foram observados níveis séricos significativamente superiores no grupo com suspeita de infecção bacteriana;
- A elevação dos níveis séricos das proteínas de fase aguda é altamente sugestivo da presença do processo inflamatório/infeccioso, mas resultados normais não afastam o diagnóstico. A associação da utilização de diferentes biomarcadores poderá melhorar a acurácia na identificação da resposta aguda.
- Nos pacientes com suspeita clínica de dengue foram encontradas contagens inferiores de leucócitos e plaquetas. Quanto aos marcadores séricos a VHS apresentou valores significativamente inferiores. As determinações PCR, SAA e IL-6 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos com suspeita de dengue e com outras infecções.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A.K; Lichtman, A.H. Citocinas. In:_ Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: 5ª ed., Elsevier, 2005, cap. 11, p.251-282.
2. Andriolo, A; Carrazza,F.R. Diagnóstico Laboratorial em Pediatria. 2ª Edição. São Paulo:Editora Sarvier:2007.
3. Badolato, R; Wang, J.M; Murphy, W.J; Lloyd, A.R; Michiel, D.F; Bausserman, L.L; Kelvin, D.J;Oppenheim, J.J. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med. 1994; 180(1):203-9.
4. Bain, B.J. Células Sanguíneas. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed;2004,cap.6,p.208-31.
5. Ballas, S.K. The erythrocyte sedimentation rate, rouleaux formation and hyperviscosity syndrome. Theory and fact. Am J Clin Pathol 1975, 63:45-8.
6. Baker, M.D; Bell, L.M; Avner, J.R.Outpatient Management without antibiotics of fever in selected infants. New Engl J Med 1993; 329:1437-41.
7. Baumann, H; Gauldie, J. The acute phase response. Immunol Today 1994; 15(2):74-80.
8. Bedell, S.E.; Bush, B.T. Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts. Am J Med 1985, 78:1001-9.

9. Berger, C.; Uehlinger, J.; Ghelfi, D.; Blau, N., Fanconi, S. Comparison of C-reactive protein and white blood cell count with differential in neonates at risk for septicemia. *Eur J Pediatr* 1995; 154:138-44.
10. Beutler, E.; Lichtman, M.A.; Coller, B.S.; Kipps, T.J.; Seligsohn, U. *William's Hematology*. 6ª edição. New York: McGraw-Hill Medical publishing Division, 2001; cap 7.
11. Bonsu BK, Chb M, Harper MB. Identifying febrile young infants with bacteremia: is the peripheral white blood cell count an accurate screen? *Ann Emerg Med*. 2003 Aug;42(2):216-25.
12. Borgnolo, G.; Barbone, F.; Guidobaldi, G.; Olivo, G. C-reactive protein in viral and bacterial gastroenteritis in childhood. *Acta Paediatr*. 1996; 85(6): 670-4.
13. Bower, R.J.; Bell, M.J.; Ternberg, J.L. Controversial aspects of appendicitis management in children. *Arch Surg*. 1981; 116(7):885-7.
14. Campos, S.P.; Baumann, H. Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase plasma protein genes. *Mol Cell Biol*. 1992; 12(4): 1789-97.
15. Cardall, T.; Glasser, J.; Guss, D.A. Clinical value of the total white blood cell count and temperature in the evaluation of patients with suspected appendicitis. *Acad Emerg Med*. 2004; 11(10):1021-7.
16. Carvalho, B.R; Filho, A.D. Leucograma, proteína C reativa, Alfa-1 glicoproteína ácida e velocidade de hemossedimentação na apendicite aguda. *Arquivos de Gastroenterologia* 2003,40: 25-30.

- 17.Castell, J.V; Gómez-Lechón, M.J.; David, M.; Andus, T.; Geiger, T.; Trullenque, R.; Fabra, R.; Heinrich, P.C. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. FEBS Lett. 1989; 242(2):237-9.
- 18.Chalmers, J.;D, Singanayagam, A.; Hill, A.T. C-reactive protein is an independent predictor of severity in community-acquired pneumonia. Am J Med. 2008 Mar; 121(3):219-25.
- 19.Clarke, D.; Cost, K. Use of serum C-reactive protein in differentiating septic from aseptic meningitis in children. J Pediatr 1983; 102:718-20.
- 20.Clyne, B; Olshaker, J. S. The C-reactive protein. The Journal of Emergen Med 1999, 17:1019-125.
- 21.Coetzee, G.A.; Strachan, A.F.; van der Westhuyzen, D.R; Hoppe, H.C; Jeenah, M.S; de Beer, F.C. Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. J Biol Chem. 1986; 261(21):9644-51.
- 22.Davis, B. H; Bigelow, N.C. Performance Evaluation of the ABX Micros CRP: The First Instrument Reporting a Complete Blood Count, 3-Part Leukocyte Differential, and C-Reactive Protein Quantitation. Labor Hematol.2001; 7(2):69 – 74.
- 23.Deodhar, S.D. C-reactive protein: the best laboratory indicator available for monitoring disease activity. Cleve Clin J Med. 1989; 56(2):126-30.

24. Del Beccaro, M.A.; Mendelman, P.M.; Inglis, A.F.; Richardson, M.A.; Duncan, N.O.; Shugerman, R.P. Acute-phase reactants and acute bacterial otitis media. *Am J Dis Child* 1992; 146:1037-9.
25. Faria, J.L. *Patologia geral: fundamentos das doenças, com aplicações clínicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
26. Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 2:S3.
27. Gabay, C.; Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New Engl J Med* 1999; 11:448-53.
28. Grossman, M. Febrile Infants: A commentary. *W J Med* 1982;137 (1):60.
29. Grotto, H.Z.W. *Interpretação Clínica do Hemograma*. São Paulo: Atheneu, 2009.
30. Grotto, H.Z.W.; Borba, R.; Noronha, J.F.A.; Bertozzi, L.C. Measurement of C-reactive protein by Micros CRP: Its use in an Emergency Department. *Labor Hematol* 2002, 8: 17-21.
31. Gyssens, I.C. Preventing postoperative infections: current treatment recommendations. *Drugs* 57(2): 175, 1999.
32. Hansson, L.O.; Axelsson, G.; Linne, T.; Aurelius, E.; Lindquist, L. Serum C-reactive protein in the differential diagnosis of acute meningitis. *Scand J Infect Dis* 1993; 25:625-30.

33. Hatanaka, E.; Furlaneto, C.J.; Ribeiro, F.P.; Souza, G.M.; Campa, A. Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human neutrophils. *Immunol Lett.* 2004; 91(1): 33-7.
34. Heinrich, P.; Castell, J.V.; Andus, T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990; 265(3):621-36.
35. Henchal, E.A.; Putnak, J.R. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990 ;(4):376-96.
36. Heney, D.; Lewis, I.J.; Evans, S.W.; Banks, R.; Bailey, C.C.; Whicher, J.T. Interleukin-6 and its relationship to C-reactive protein and fever in children with febrile neutropenia. *J Infect Dis.* 1992; 165(5):886-90.
37. Henry, J.B. Diagnóstico Clínico & Tratamento- Por Métodos Laboratoriais. 18ª ed. São Paulo: Manole; 1995, p.1543.
38. Herrera, P.; Duffau, G. Usefulness of C-reactive protein for the diagnosis of bacterial infections in children. *Rev Med Chil.* 2005; 133(5): 541-6. Epub 17.
39. Hoffbrand, A.V; Pettit, J.E; Maus, P.A. H. Fundamentos em Hematologia. 4ª ed. São Paulo: 2004 cap 9, p.121-33.
40. Hokama, Y.; Nakamura, R.M. C-reactive protein: current status and future perspectives. *J Clin Lab Anal* 1987; 1:115-27.

41. Hsiao, A.L.; Baker, M.D. Fever in the new millennium: a review of recent studies of markers of serious bacterial infection in febrile children. *Curr Opin Pediatr.* 2005; 17(1): 56-61.
42. Huttunen, T.; Teppo, A.M.; Lupisan, S.; Ruutu, P.; Nohynek, H. Correlation between the severity of infectious diseases in children and the ratio of serum amyloid A protein and C-reactive protein. *Scand J Infect Dis.* 2003; 35(8):488-90.
43. Jaffe, D.M.; Fleisher, G.R. Temperature and total white blood cell count as indicators of bacteremia. *Pediatrics.* 1991; 87(5):670-4.
44. Jaye, D. L.; Waites, K.B. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 1997, 16:735-47.
45. Juffrie, M.; Meer, G.M.; Hack, C.E.; Haasnoot, K.; Sutaryo Veerman, A.J.; Thijs, L.G. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(1):70-5.
46. Karma, P.; Sipila, M.; Koskela, M.; Pelotola, H. C –reactive protein in acute otitis media. *Acta Oto-laryngol* 1987; 103:395-99.
47. Korppi, M.; Kosma, T. H.; Leinonen, M. White blood cells, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in pneumococcal pneumonia in children. *Eur Respir J* 1997, 10:1125-29.
48. Kushner, I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci.* 1982; 389:39-48.

- 49.Lannergård, A.; Larsson, A.; Friman, G.; Ewald, U. Human serum amyloid A (SAA) and high sensitive C-reactive protein (hsCRP) in preterm newborn infants with nosocomial infections. *Acta Paediatr.* 2008; 97(8):1061-5. Epub 2008; 29.
- 50.Lannergård, A.; Larsson, A.; Kragstjerg, P.; Friman, G. Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases. *Scand J Clin Lab Invest.* 2003;63(4):267-72.
- 51.Lanzara, G. A; Provenza, J.R., Bonfiglioli, R. Velocidade de hemossedimentação (VHS) de segunda hora: qual o seu valor? *Rev Bras Reumatol* 2001; 41(4): 237-41.
- 52.Le, J.M.; Vilcek, J. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest.* 1989 61(6):588-02.
- 53.Lehnbecher, T.; Venzon, D.; de Haas, M.; Chanock, S.J.; Kühl, J. Assessment of measuring circulating levels of interleukin-6, interleukin-8, C-reactive protein, soluble Fc gamma receptor type III, and mannose-binding protein in febrile children with cancer and neutropenia. *Clin Infect Dis.* 1999; 29(2): 414-9.
- 54.Lin, S.F.; Liu, H.W.; Chang, C.S.; Yen, J.H.; Chen, T.P. Hematological aspects of dengue fever. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi.* 1989;5(1):12-6.
- 55.Linke, R.P.; Bock, V.; Valet, G.; Rothe, G. Inhibition of the oxidative burst response of N-formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid-A protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 176(3):1100-5.

56. Lloyd, A.R, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today*. 1992 May;13(5):169-72.
57. Machado, P. R. L.; Araújo, M.I. A. S; Carvalho, L & Carvalho, E.M; Mecanismos de resposta imune às infecções. *Rev Bras Dermatol* 2004; 79(6): 647-64.
58. Marcondes, E; Vaz, F.A. C; Ramos, J.L. A; Okay, Yassuhiko. *Pediatrics Básica*. 9ª ed. São Paulo: Sarvier; 2003, cap. 1, p. 8-9.
59. Marhaug, G.; Permin, H.; Husby, G. Amyloid-related serum protein (SAA) as an indicator of lung infection in cystic fibrosis. *Acta Paediatr Scand*. 1983; 72(6): 861-6.
60. Maury, C.P. Comparative study of serum amyloid A protein and C-reactive protein in disease. *Clin Sci (Lond)*. 1985; 68(2):233-8.
61. Mathy, K.A.; Koepke, J.A. The clinical usefulness of segmented vs. stab neutrophil criteria for differential leukocyte counts. *Am J Clin Pathol*. 1974 Jun; 61(6):947-58.
62. McCarthy, P.L.; Klig, J.E.; Kahn, J.S.; Shapiro, E.D.; Baron, M.A. Ever without apparent source on clinical examination, lower respiratory infections in children, other infectious diseases, and acute gastroenteritis and diarrhea of infancy and early childhood. *Curr Opin Pediatr*. 1997; 9(1):105-26.
63. Miwata, H.; Yamada, T.; Okada, M.; Kudo, T.; Kimura, H.; Morishima, T. Serum amyloid A protein in acute viral infections. *Arch Dis Child*. 1993; 68(2):210-4.

64. Montenegro, M. R.; Franco, M. Patologia: processos gerais. São Paulo: Atheneu, 2004.
65. Morens, D.M. WBC count and differential. Value in predicting bacterial diseases in children. Am J Dis Child. 1979;133(1): 25-7.
66. Murahovischi, J. A criança com febre no consultório. Jornal de Pediatria 2003, 79 supl 1.
67. Nakayama, T.; Sonoda, S.; Urano, T.; Yamada, T.; Okada, M. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. Clin Chem. 1993; 39(2):293-7.
68. Nohynek, H.; Valkeila, E.; Leinonen, M.; Eskola, J. Erythrocyte sedimentation rate, white blood cell count and serum C-reactive protein in assessing etiologic diagnosis of acute lower respiratory infections in children. Pediatr Infect Dis J. 1995; 14(6):484-90.
69. Olshaker, J.S.; Jerrard, D.A. The erythrocyte sedimentation rate. Clinical Labor Emerg Med 1997; 15:869-74.
70. Peltola, H.; Ahlqvist, J.; Rapola, J.; Räsänen, J.; Louhimo, I.; Saarinen, M.; Eskola, J. C-reactive protein compared with white blood cell count and erythrocyte sedimentation rate in the diagnosis of acute appendicitis in children. Acta Chir Scand. 1986; 152:55-8.
71. Peltola, H.; Valmari, P. Serum C-reactive protein as detector of pretreated childhood bacterial meningitis. Neurology. 1985; 35(2):251-3.

72. Pepys, M.B.; Baltz, M.L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.* 1983; 34:141-12.
73. Pepys, M.B. C-reactive protein: the role of an ancient protein in modern rheumatology. *Clin Exp Rheumatol.* 1983 Jan-Mar;1(1):3-7.
74. Pfäfflin A, Schleicher E. Inflammation markers in point-of-care testing (POCT). *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393(5): 1473-80.
75. Pizzini, C.; Mussap, M.; Plebani, M.; Fanos, V. C-reactive protein and serum amyloid A protein in neonatal infections. *Scand J Infect Dis.* 2000;32(3):229-35.
76. Póvoa, P.; Coelho, L.; Almeida, E.; Fernandes, A.; Mealha, R.; Moreira, P.; Sabino, H. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11(2): 101-8.
77. Principi, N.; Marchisio, P.; Bigall, L.; Massironi, E. C- reactive protein in acute otitis media. *Pediatric Infections Disease* 1986; 5:525-7.
78. Rasmussen, N.H.; Rasmussen, L.N. Predictive value of white blood cell count and differential cell count to bacterial infections in children. *Acta Paediatr Scand.* 1982 ;71(5):775-8.
79. Restrepo, B.N.; Isaza, D.M.; Salazar, C.L.; Ramírez, R.; Ospina, M.; Alvarez, L.G. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(1):6-10.

80. Ribeiro, F.P.; Furlanerto, C.J.; Hatanaka, E. mRNA expression and release of interleukin-8 induce by serum amyloide A in neutrophils and monocytes. *Mediators Inflammation*. 2003;12(3):173-178.
81. Riccetto, A. G.L; Zambon, M .P. Manual de Urgências e Emergências Pediátricas. In: Reis, M.C.; França, A.M.A. Febre em Menores de 90 Dias. Rio de Janeiro: Revinter; 2005, cap.63, p.351-55.
82. Romano, M.; Sironi, M.; Toniatti, C.; Polentarutti, N.; Fruscella, P.; Ghezzi P.; Faggioni, R.; Luini, W.; van Hinsbergh, V.; Sozzani, S.; Bussolino, F.; Poli, V.; Ciliberto, G.; Mantovani, A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. 1997; (3):315-25.
83. Ropes, M.W.; Rossmeisl, E.; Bauer, W. The relationship between the erythrocyte sedimentation rate and the plasma proteins. *J Clin Invest*. 1939; 18(6):791-8.
84. Rothrock, S.G.; Pagane, J. Acute appendicitis in children: emergency department diagnosis and management. *Ann Emerg Med*. 2000; 36(1):39-51.
85. Rotstein, R.; Kassirer, M.; Zeltser, D.; Maharshak, N.; Mardi, T.; Avitzour, D.; Shapira, I.; Justo, D.; Arber, N.; Berliner, S. Capillary and venous leukocyte adhesiveness/aggregation to differentiate between viral and bacterial infection. *Infection*. 2002; 30(6):365-72.
86. Rubin, E. Farber, J.L. Patologia. 3ª ed. São Paulo: Koogan; 1999, cap. 2, p.36-73.

- 87.Sanders, S.; Barnett, A.; Correa-Velez, I.; Coulthard, M.; Doust, J. Systematic review of the diagnostic accuracy of C-reactive protein to detect bacterial infection in nonhospitalized infants and children with fever. *J Pediatr*. 2008; 153(4): 570-4.
- 88.Santis, G.C. Granulocyte transfusion. *Medicina, Ribeirão Preto* 1999; 32:470-77.
- 89.Santolaya,M.E.; Cofre, J.; Beresi, V. C-reactive protein: a valuable aid for the management of febrile children with cancer and neutropenia. *Clin Infect Dis*. 1994; 18(4):589-95.
- 90.Schultz, D.R.; Arnold, P.I. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum*. 1990; 20(3):129-47.
- 91.Smith, C.H. *Hematologia pediátrica*. 1ª ed.Barcelona:Salvat;1973,cap 18,p.418-52
- 92.Silvestre, J.;, Póvoa, P.; Coelho, L.; Almeida, E.; Moreira, P.; Fernandes, A.; Mealha, R.; Sabino, H. Is C-reactive protein a good prognostic marker in septic patients? *Intensive Care Med*. 2009; 35(5):909-13. Epub 2009 24.
- 93.Souza,k. L.J.; Reis, A.F.;, de Almeida, F.C.; Souza, L.A.;, Abukater, M.; Gomes, M.A.; Abicair, O.A.; Gonçalves, P.A. Alteration in the erythrocyte sedimentation rate in dengue patients: analysis of 1,398 cases. *Braz J Infect Dis*. 2008; 12(6):472-5.

94. Spasova, M.I.; Terzieva, D.D.; Tzvetkova, T.Z.; Stoyanova, A.A.; Mumdzhev, I.N.; Yanev, I.B.; Genev, E.D. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, and C-reactive protein in febrile neutropenia in children with malignant diseases. *Folia Med (Plovdiv)*. 2005;47(3-4):46-52.
95. Steel, D.M.; Whitehead, A.S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today*. 1994 ;15(2):81-8.
96. Serra, C.R.B. Role of acute phase proteins in monitoring rheumatic diseases. *Rev Bras Reumatol*. 1997 Mai/Jun (37) 3:152-58.
97. Tejani, N.R.; Chonmaitree, T.; Rassin, D.K.; Howie, V.M.; Owen, M.J.; Goldman, A. S. Use of C-reactive protein in differentiation between acute bacterial and viral otitis media. *Pediatrics* 1995;95:664-69.
98. Todd, J.K. Childhood infections. Diagnostic value of peripheral white blood cell and differential cell counts. *Am J Dis Child*. 1974 ;127(6):810-6.
99. Toikka, P.; Irjala, K.; Juvén, T.; Virkki, R.; Mertsola, J.; Leinonen, M.; Ruuskanen, O. Serum procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-6 for distinguishing bacterial and viral pneumonia in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 ;19(7):598-02.
100. Unkila-Kallio, L.; Kallio, M.J., Peltola H. The usefulness of C-reactive protein levels in the identification of concurrent septic arthritis in children who have acute hematogenous osteomyelitis. A comparison with the usefulness of the erythrocyte sedimentation rate and the white blood-cell count. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(6):848-53.

101. Urbach J, Shapira I, Branski, D.; Berliner, S. Acute phase response in the diagnosis of bacterial infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 ;23(2):159-60.
102. Vaz, F.A.; Ceccon, M.E; Diníz, E.M.; Valdetaro, F. Immunological indicators (IgM and C-reactive protein) in neonatal infections. *Rev Assoc Med Bras*. 1998 ;44(3):185-95.
103. Voltarelli, J.C. Febre e Inflamação. *Medina Ribeirão Preto*. 1994 ;27 (1/2):7-48.
104. Watkin, S.L.; Elborn, J.S.; Cordon, S.M.; Hiller, E.J.; Shale, D.J. C-reactive protein is not a useful indicator of intermittent bacterial colonization in early lung disease of patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1994 ;17(1):6-10.
105. Wyler, D.J. Diagnostic implications of markedly elevated erythrocyte sedimentation rate: a reevaluation. *South Med J*. 1977 ;70(12):1428-30.

ANEXOS

Quadro 1 - Resultados individuais (globais, valores de VHS, PC-R, SAA e IL-6) dos pacientes com processo inflamatório/infeccioso.

Nº	Sexo	IDADE	Febre	GB 103/ μ L	HGB g/dL	VCM fL	PLT 103/ μ L	VHS mm	PC-R Modular	SAA mg/L	IL-6 pg/ml	HD
1	M	10 anos	-	9.32	13.60	82.00	327.00	5.00	0.05	0.70	38.519	Apendicite
2	M	10 anos	+	6.79	14.90	77.20	213.00	18.00	0.25	2.47	37.445	Viral Ósteo Articular
3	M	2 anos	+	12.98	13.90	81.60	360.00	2.00	0.05	0.70	37.577	IRA viral
4	M	1 ano	+	12.77	9.70	61.40	475.00	72.00	0.88	14.30	26.670	Viral Gastrointestinal
5	F	10 anos	+	2.88	12.70	81.20	93.00	10.00	0.43	12.60	34.302	Dengue
6	F	1 ano	+	2.69	11.30	70.40	164.00	2.00	0.06	3.81	33.022	Dengue
7	M	2 anos	+	13.62	9.60	64.30	118.00	5.00	7.92	5.89	22.373	Dengue
8	M	9 anos	+	3.00	14.40	82.30	111.00	2.00	0.43	27.40	33.947	Dengue
9	M	7 anos	+	7.62	11.40	80.70	357.00	46.00	7.77	78.80	23.213	Dengue
10	F	10 anos	+	9.25	13.50	87.50	445.50	38.00	2.59	376.00	29.466	Dengue
11	F	4 anos	+	9.21	13.60	76.50	227.00	35.00	4.34	113.00	23.746	Celulite Periorbitária
12	F	1 ano	+	12.65	12.00	79.30	331.00		1.62	174.00	338.290	IVAS
13	M	1 ano	+	6.30	12.40	77.40	185.50		0.86	16.00	21.086	Dengue
14	F	2 anos	+	11.33	11.90	80.40	599.00	74.00	3.35	1.34	21.029	
15	M	5 meses	+	10.33	9.60	80.30	306.00	29.00	2.16	39.70	35.026	APLV (diarréia sanguinolenta) +CIC
16	F	1 mês	-	8.70	12.60	96.90	729.00	23.00	3.35	42.10		PNM Viral
17	M	1 ano	-	17.11	11.50	68.30	200.00	67.00	1.83	194.00	20.751	Infecções recorrentes e atopia
19	F	5 anos	+	4.92	13.20	82.10	140.50	8.00	2.23	3.73	26.281	PMN
20	M	4 meses	-	13.29	10.70	69.20	891.00		0.09	1.00	36.276	IRA (Bronquiolite)
21	F	6 meses	-	17.50	10.50	70.70	715.00	110.00	1.03	9.88	25.980	Osteomelite (joelho)
22	F	10 anos	-	6.63	15.30	82.70	307.50	14.00	0.06	1.40	38.112	Pancreatite Aguda
23	F	8 meses	-	10.44	11.10	69.80	380.00		0.73	30.80	24.043	IRA mista (Broncoespasmo+PNM)
24	M	1 ano	+	17.57	8.40	61.70	476.00	120.00	2.62	544.00	32.573	Linfonomegalia cervical (PNM 6 dias após)
25	M	8 anos	-	8.62	13.60	79.90	254.50	21.00	0.14	101.00	33.829	Viral Ósteo Articular
26	F	7 anos	+	29.43	13.30	78.50	324.50		27.35	972.00	21.086	Abscesso retrofaringeo e parafaringeo
27	F	2 anos	+	11.25	12.50	76.90	363.00	25.00	2.13	104.00	21.029	PNM + Otite
28	F	6 anos	-	14.62	13.50	83.40	337.50	23.00	0.35	75.70	31.698	Sinovite Transitória
30	M	10 meses	+	19.20	10.40	70.30	366.00	17.00	1.57	86.30	28.535	Viral Infeccioso
31	M	6 anos	-	6.04	12.20	80.80	260.00	9.00	0.05	0.70	39.690	Cisto Branquial ou linfonomegalia
32	F	2 anos	+	8.61	10.20	66.70	270.50	29.00	0.90	66.70	23.258	Viral Infeccioso
33	M	4 anos	+	15.75	11.70	81.60	264.00	75.00	10.54	306.00	98.250	Mononucleose Infecciosa
34	F	6 meses	+	10.03	9.80	69.40	449.00	5.00	0.05	0.70	36.661	IVAS
36	M	1 mês	+	8.48	11.50	91.30	354.00		1.06	29.60	20.704	Diarréia Aguda
37	M	1 ano	+	11.89	12.80	77.00	280.50	22.00	1.51	86.30	31.698	PNM Bacteriana
38	M	1 ano	+	15.86	12.10	74.30	361.50	26.00	2.15	149.00	26.909	PNM
39	M	9 anos	-	4.51	13.80	82.60	260.00	5.00	0.05	2.17	37.978	Pré-Operatório
40	M	7 meses	+	29.65	6.10	58.70	488.50	120.00	25.74	448.00	141.045	PNM Bacteriana
41	M	1 ano	+	18.90	11.30	70.90	310.50	58.00	25.10	573.00		PNM
42	F	3 anos	-	10.48	12.10	80.10	246.00	3.00	0.07	2.40	37.577	Escabiose
43	M	6 meses	-	13.96	11.70	80.20	373.00	16.00	0.19	1.20	24.848	IRA obstrutiva (lactente chiador)
44	F	4 meses	+	13.89	12.10	74.30	410.00	16.00	0.71	24.90	23.697	IRA (Bronquiolite)

45	F	1 ano	-	14.26	11.90	74.40	371.00	8.00	0.10	1.90	37.710	Refluxo gastro-esofágico
46	F	3 meses	+	10.17	8.80	83.60	348.50	39.00	1.42	107.00	27.914	Viral Respiratória
47	M	2 anos	-	16.43	13.60	81.90	621.00	28.00	4.57	80.10	328.940	Descite + Escabiose
48	F	2 anos	+	7.48	12.90	89.40	126.00	21.00	2.29	28.00	32.796	Constipação Intestinal Crônica funcional
49	F	3 anos	+	10.74	11.10	80.30	418.00	83.00	2.32	158.00	33.829	Adenite Primária
50	M	3 anos	+	8.69	12.30	82.10	263.50	33.00	1.15	33.50	24.035	PNM + componente obstrutivo
51	M	1 ano	+	14.70	12.00	68.50	293.00	12.00	0.76	26.10	22.866	Lactente Chiador
52	M	1 ano	+	19.50	9.30	70.60	440.00	100.00	15.80	256.00	161.704	Varicela + Adenite
53	F	1 ano	+	7.02	12.00	70.90	426.00	23.00	0.79	3.32	35.272	Infecção do Trato Urinário
54	F	8 anos	+	4.72	13.60	83.80	189.00	4.00	0.74	168.00	35.770	Dengue
55	M	3 anos	+	12.41	11.50	85.80	280.00	37.00	2.76	94.60		PNM
56	F	1 ano	+	17.25	7.90	67.80	258.50		29.95	26.40		IRA mista (Pneumonia)
57	F	2 anos	+	18.33	10.30	80.70	398.50	103.00	33.91	1610.00		PNM
58	F	10 anos	+	4.51	13.40	86.00	123.50	5.00	0.17	64.80	27.828	Dor abdominal recorrente (DAR funcional)
59	M	1 ano	-	12.46	11.20	80.60	351.00	2.00	0.02	0.70	38.383	Corpo estranho ocular
60	M	8 anos	+	15.48	10.00	80.90	502.00	120.00	20.18	568.00	35.010	Artrite Reativa
61	F	7 anos	+	23.35	11.20	76.50	361.50	120.00	28.47	754.00	37.295	Hepatite Viral
62	F	7 anos	+	5.48	12.40	77.40	267.50	21.00	0.67	26.40	37.050	Viral Infecioso
63	M	7 anos	+	6.25	14.70	78.60	248.00		0.00	7.10	36.920	Miosite
64	M	1 ano	+	14.99	10.80	74.60	352.50	61.00	4.73	503.00	22.956	Varicela
65	F	7 anos	-	9.37	13.20	85.30	202.50	2.00	2.32	187.00	24.597	Trauma abdominal
66	M	5 meses	+	10.77	12.10	70.40	257.50	8.00	0.66	2.90	24.284	Varicela com infecção secundária
67	M	10 anos	+	6.76	7.30	77.70	300.00	2.00	0.00	0.70	33.250	Úlcera duodenal
68	M	1 ano	+	22.15	6.10	58.40	532.50		17.29	456.00	81.114	Hepatoesplenomegalia Febril+Anemia Ferropriva+ CMV
69	M	1 ano	+	3.71	12.40	67.70	213.50	17.00	0.07	5.28	34.183	Viral Infecioso
70	M	4 anos	-	8.75	12.50	75.30	299.00	12.00	0.12	2.60	35.520	Parotidite de repetição
71	F	1 ano	-	14.93	9.50	85.60	190.50	58.00	18.40	591.00	26.348	Osteomelite
72	F	2 anos	-	10.46	11.90	82.00	331.50	4.00	0.06	6.30	29.562	Inflamação Local
73	F	2 anos	+	7.72	11.50	84.30	163.50	8.00	6.73	170.00	21.514	Dengue
74	M	2 anos	+	5.75	12.90	84.10	172.00	31.00	12.63	390.00	34.065	Adenite Mesenterica
75	F	1 ano	+	8.24	11.40	75.40	317.00	19.00	0.73	101.00	31.591	Ingestão de corpo estranho
76	F	4 meses	-	18.57	10.70	83.70	388.50	18.00	0.59	16.20	32.131	Viral Respiratória
77	F	3 anos	+	15.81	11.60	78.00	316.00	15.00	13.34	502.00	242.967	Geca
78	F	7 anos	-	11.80	11.80	98.40	268.50	7.00	0.06	5.91	.	Viral Gastrointestinal
79	M	11 meses	-	19.00	11.90	71.70	543.50	2.00	0.02	0.70		Geca
80	F	2 anos	+	10.20	10.00	70.40	224.50	97.00	29.30	639.00	20.779	Viral Gastrointestinal
81	F	6 anos	+	10.70	13.10	86.70	390.00	71.00	2.58	99.60	34.421	
82	M	5 anos	+	8.95	10.90	89.60	215.50	27.00	0.37	49.70	26.348	Viral Infecioso
83	F	1 ano	+	28.78	10.20	71.80	360.50	79.00	32.87	449.00		PNM
84	F	5 anos	+	32.85	12.40	83.10	286.00	37.00	4.38	151.00	176.654	PNM
85	F	3 anos	+	9.07	12.50	79.50	228.50	53.00	1.39	11.60	36.022	Dengue
86	F	9 anos	+	7.21	12.60	89.80	361.50	107.00	0.10	7.60	36.410	Hepatite A
87	M	7 anos	-	5.41	9.45	85.70	203.00	2.00	0.02	4.60	39.546	Esofagite erosiva e Pangastrite Hemorrágica

88	F	3 anos	+	8.91	12.70	83.20	262.00	7.00	0.18	2.40	33.532	Dengue
89	M	3 meses	-	17.60	7.60	71.80	723.00	35.00	4.98	43.90	26.363	Bronquiolite
90	F	6 anos	+	21.40	12.10	82.40	245.50	58.00	16.50	740.00	75.143	Geca
92	F	5 anos	+	10.59	11.50	81.90	240.50	15.00	1.61	56.60	20.767	Viral Infeccioso
93	F	1 ano	-	15.15	11.20	81.90	337.00	21.00	1.80	95.90	22.703	Bronquiolite
94	M	2 anos	+	16.00	11.90	81.10	281.00	51.00	10.11	356.10		Viral Infeccioso

Nº: Identificação, GB:contagem e leucócitos,HGB:hemoglobina, VCM:volume corpuscular médio, PLT:plaquetas, VHS:velocidade de hemossedimentação, PC-R:proteína C reativa, SAA: amilóide sérico A, IL-6:interleucina-6.

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 12/02/07.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 768/2006 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0621.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "PROPOSTA DA UTILIZAÇÃO DE MARCADORES DE PROCESSO INFLAMATÓRIO/INFECCIOSO UTILIZANDO 2 TÉCNICAS AUTOMATIZADAS EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO PRONTO ATENDIMENTO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Bárbara Lima dos Anjos

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/12/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/01/08 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a especificidade e sensibilidade de algumas variáveis laboratoriais na detecção do processo inflamatório e infeccioso.

III - SUMÁRIO

Trata-se de uma pesquisa clínica prospectiva, na qual serão estudadas crianças de ambos os sexos, com idade entre 0 e 10 anos que estiverem sendo assistidas pelo serviço de Pediatria do PS/ HC- Unicamp. Estes pacientes serão subdivididos em dois grupos principais, de acordo com a idade (Grupo 1: < ou igual a 90 dias e Grupo 2: > 90 dias). O presente estudo não pretende submeter o paciente a nenhuma punção venosa adicional. Assim seguindo a conduta adotada pelo Serviço de Pediatria do PS/ HC, só serão estudados os pacientes que tiverem alguma indicação de coleta de sangue. Nesses casos será coletado sangue em tubo com EDTA e em tubo seco, para as análises sorológicas. Serão analisados: hemograma, determinação de VHS, determinação da PCR (Micros CRP), IL-6, PC-R (nefelometria) e Amilóide sérico A.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

É um estudo relevante, visto ter como objetivo avaliar alguns marcadores da resposta inflamatória obtidos por sistemas automatizados, comparando-os com técnicas laboratoriais já utilizadas na rotina. Quanto aos riscos e benefícios, se for constatado a superioridade de um método em estudo sobre outro, o projeto deverá ser suspenso, oferecendo a todos os sujeitos os benefícios do melhor regime. O presente estudo não pretende submeter os pacientes a nenhuma punção venosa adicional, seguindo a conduta adotada pelo Serviço de Pediatria do PS/ HC, com isso só serão estudados os pacientes que tiverem alguma indicação de coleta de sangue. O TCLE está adequado as normas exigidas pelo CNS-MS.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

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 Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do 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 projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de janeiro de 2007.

Profa. Dra. *Carmen Silvia Bertuzzo*
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do projeto: *"PROPOSTA DA UTILIZAÇÃO DE MARCADORES DE PROCESSO INFLAMATÓRIO/ UTILIZANDO 2 TÉCNICAS AUTOMATIZADAS EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO PRONTO ATENDIMENTO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP"*

Responsável pela condução da pesquisa: Prof^a.Helena Zerlotti Wolf Grotto fone: 35217064

Aluna: Bárbara Lima dos Anjos (fone: 35217589)

Nome do Paciente: _____

Idade: _____ anos No. H.C: _____

Nome do Responsável pelo paciente: _____

Endereço: _____

Esse projeto de pesquisa tem como objetivo estudar alguns aspectos da inflamação/infecção avaliando alguns marcadores da resposta inflamatória, comparando diferentes técnicas laboratoriais.

Para tanto, quando a criança colher os exames regularmente pedidos pelo médico que o assiste, 1 tubo de sangue a mais será colhido, usando a mesma punção, ou seja, não será necessária uma nova coleta.

O benefício esperado para os que voluntariamente participarem não será imediato e não implicará necessariamente numa mudança de tratamento.

Os exames laboratoriais aos quais a criança será submetida em consequência da pesquisa são: hemograma completo e algumas determinações imunológicas. Caso haja necessidade de uma nova coleta o senhor(a) poderia autorizar a criança contribuir quando retomar ao Hospital das Clínicas..

Fica claro que se o responsável que não quiserem que a criança participe da pesquisa não terão qualquer prejuízo no atendimento, cuidado e tratamento por qualquer especialidade do Hospital.

Serão mantidos o sigilo e o caráter confidencial das informações, zelando pela privacidade da criança e garantindo que sua identificação não será exposta nas conclusões ou publicações.

O telefone da Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para os casos de recursos ou reclamações dos pacientes é: (19) 35218936.

Campinas, ____ de _____ de 2008 .

Assinatura do participante

Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto

Bárbara Lima do Anjos

MEASUREMENT OF ACUTE-PHASE RESPONSE IN PEDIATRIC SAMPLES FROM AN EMERGENCY DEPARTMENT: EVALUATION OF METHODS.

Anjos¹ B.L., Alvarenga¹ E.C., Zambon² M.P., Riccetto² A.G.L., Vecina¹ J.F., Grotto¹ H.Z.W.

¹ Clinical Pathology Department, Faculty of Medical Sciences, ² Pediatric Emergency Service University Hospital, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13081-970 Brazil.

E-mail: babi@fcm.unicamp.br

Background. Children with fever are routinely admitted to the Emergency Service. Besides clinical findings, laboratory parameters are requested in order to identify children with infection/inflammation diseases preferably in a short time and using small amount of blood/serum specimens. C-reactive protein (CRP) is an acute-phase protein and its production by hepatocytes is increased in situations as infection and inflammation conditions, trauma, surgery, and advanced cancer. It is considered an early indicator of infectious or inflammatory diseases and has also been used to monitor treatment. Alteration in serum protein concentration during inflammatory response leads to an increased erythrocyte sedimentation rate (ESR), but slower than CRP elevation. The objective of this study was to evaluate CRP measurement by two different methods and to compare the results with ESR values obtained by an automated method in a group of paediatric patients seen at an emergency service.

Patients and Methods. The study was conducted in seventy-two children with fever and infection suspect seen in the Emergency Service at the UNICAMP University Hospital, Campinas, Brazil. The age ranged from 4 months to 10 years old.

CRP measurement was provided by Micros CRP (Horiba-ABX, France), an automated blood cell counter that determines the CRP concentration by a latex turbidimetric immunoassay in the same blood sample used for haematological parameter, with EDTA as anticoagulant. The results were compared with those obtained by an immunoturbidimetry method using the CRP LX- Tina-quant kit (Roche/Hitachi Modular Analyser, Germany). Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was determined by photometry and interrupted capillarity (Microtest 1X. Alifax-SPA, Italy).

Results. Spearman correlation coefficient revealed a good correlation between methods concerning CRP determination: $r = 0.9281$, $p < 0.0001$ between Micros CRP and Hitachi when serum was used in Micros and $r = 0.9932$, $p < 0.0001$ when total blood cells was analysed. Comparing CRP in serum and total blood at Micros CRP the correlation was good too ($r = 0.9176$, $p < 0.0001$). So, although the recommended material for Micros CRP is total blood sample, serum specimen analysis may provide reliable results. When CRP levels were correlated with ESR determinations the correlation coefficients were 0.6498, $p < 0.0001$ for ESR x CRP in serum, 0.7993, $p < 0.0001$ for ESR x CRP in total blood. The correlation between CRP Hitachi and ESR was $r = 0.7140$, $p < 0.0001$.

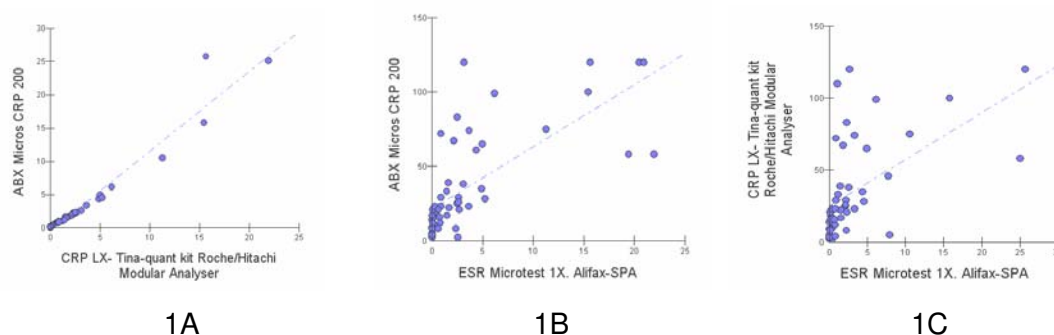


Figure 1: A: Correlation between CRP results obtained with Micros CRP and Roche/Hitachi Modular
 B: Correlation between CRP results obtained with Micros CRP and ESR values;
 C: Correlation between CRP results obtained with Roche/Hitachi and ESR values.

Conclusion. The measurement of ESR recommended by the International Council for Standardization in Haematology is based on Westergreen method. The conventional method is manual and the result is obtained after 1 hour of sedimentation of red cells. In our study we used an automated method whose results are available in approximately 20 min and using a small amount of blood. Although ESR test is non-specific for particular disease, it is useful in an emergency routine. As ESR, CRP measurement is used to assist in diagnosing infectious and inflammatory diseases. In pediatric practice is desirable to collect the smallest amount of blood possible for performing laboratorial tests. According to our results Micros CRP and automated ESR may be useful in an emergency department. The results are reliable and the tests are performed rapidly. An advantage for pediatric patients is the small volume of blood used by the Micros CRP to determine total

WBC count, leukocyte differential count and CRP measurement, which are laboratory tests usually required in the evaluation of febrile infants and young children.

**Evaluation of C-reactive protein and serum amyloid A in the detection of
inflammatory and infectious diseases in children.**

Bárbara Lima dos Anjos and Helena Zerlotti Wolf Grotto

Department of Clinical Pathology. Faculty of Medical Sciences, University of Campinas,
SP, Brazil

Correspondence:

Helena Zerlotti Wolf Grotto

Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas

PO box 6111. ZIP code 13083-970 – Campinas – SP, Brazil.

Fax: +55 19 3521 9434

Tel: +55 19 3521 9445.

email: grotto@fcm.unicamp.br

Summary

Background: Various biomarkers have been proposed to help diagnose inflammatory and infectious diseases. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of some of these markers in children seen in an emergency service and to compare a number of routinely used tests with measurements of serum amyloid A (SAA) and C-reactive protein (CRP) levels.

Methods: 83 children with clinically suspected inflammation (n= 17) or infection (n=66) who had been seen at the Emergency Department. Complete blood count, erythrocyte sedimentation rate (ESR), CRP (using two methods) and SAA measurements were carried out.

Results: There was no difference in the parameters studied between inflammatory and infectious groups. However, when the infectious group was subdivided into bacterial (n=21) and viral infections (n=43), significantly higher leukocyte, CRP and SAA levels were observed in the former group. CRP was the most accurate indicator of inflammatory and infectious processes (Kappa concordance index= 0.89), followed by SAA (KCI= 0.73) and ESR (KCI= 0.73). The worst results were obtained for the immature/total neutrophil ratio (KCI=0.02).

Conclusions: Measurement of CRP was more effective than measurement of SAA in identifying inflammatory and infectious processes in children and should be included in protocols for pediatric assessment in emergency departments.

Introduction

The acute phase response includes a set of physiological and metabolic alterations that take place immediately after infection or tissue damage. A series of reactions takes place to limit the injury, isolate and destroy the invading organism, and activate the repair system that restores the organ's functions [1].

Inflammatory and anti-inflammatory agents are synthesized and released during the process and have been given the generic name of acute phase reactants. This multifunctional group includes components of the complement system, coagulation proteins, protease inhibitors, C-reactive protein (CRP), haptoglobin, serum amyloid A (SAA) and various cytokines [2].

Of all the clinical signs, fever is the most common reason for a child to be seen in an emergency department [3]. This may be caused by infectious or non-infectious processes, and the former may be of viral or bacterial origin. In younger children differential diagnosis is particularly difficult because a detailed description of the symptoms cannot be obtained, and the possibility that the symptoms of bacterial infection may be hidden by what appears to be a viral infection is a cause of concern to the general practitioner because rapid, accurate intervention is required in such cases [4].

The cellular alterations and changes in plasma proteins that occur in the acute phase response can be measured, and these measurements are often requested when inflammation/infection is suspected or when the evolution of an inflammatory/infectious condition is being assessed. A set of laboratory tests is usually requested because a single test is not sufficiently sensitive or specific to make a diagnosis or to assess the severity of the signs and symptoms. As each test has its own particular advantages and limitations, analysis of the results of one test in isolation independently of clinical findings

is unlikely to help clarify a diagnosis [5]. The tests usually requested are a full blood count with a differential white blood cell (WBC) count, erythrocyte sedimentation rate (ESR), urine and/or blood cultures and CRP [4,6,7]. CRP is a member of the pentraxin superfamily, whereas SAA belongs to the apolipoprotein family. Both are synthesized by the liver in response to stimuli by various cytokines, particularly interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor, and there is a marked increase in their concentrations in infectious diseases [8,9]. Reports describing the use of SAA measurements as a new marker of bacterial infection are contradictory. In one study in which the responses of SAA and CRP in the early stages of bacterial and viral infections were compared, the levels of both markers were found to be significantly higher in the group with bacterial infections than in the group with viral infections. In addition, SAA was more sensitive than CRP in detecting weaker inflammatory stimuli, such as those in viral infections [10]. In newborns with sepsis, on the other hand, CRP proved to be more useful than SAA in diagnosing patients and predicting the evolution of the disease [11].

One of the important factors that can influence the course of the disease and the success of treatment is the time that has elapsed between the start of the process and administration of appropriate therapy. It was shown that administration of a specific antimicrobial agent within an hour of hypotension first appearing in patients with septic shock was associated with an 80% increase in the chance of survival [12]. Increasing efforts are therefore being made to discover biomarkers that provide fast, accurate information about the presence and intensity of inflammatory/infectious processes, as these are of great importance when diagnosing children and adults.

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of a number of inflammatory markers in detecting inflammation and/or infection in children seen in an Emergency Department. The effectiveness of routinely used biomarkers, such as

leukocyte count and erythrocyte sedimentation rate, was determined and compared with that of CRP and SAA to establish whether measurement of CRP or SAA levels is more effective in recognizing the acute phase response than measurements used in routine diagnosis.

Materials and Methods

The study population consisted of 83 children (39 boys and 44 girls) between 1 month and 10 years of age who had been seen at the Reference Emergency Department at the Hospital de Clínicas, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil. Patients were examined and had their histories recorded by the pediatrician in the Reference Emergency Department. Only those children who had been referred for blood tests to clarify a diagnosis of infection/inflammation in accordance with the institution's standards were selected. Patients who were using anti-inflammatory drugs or antibiotics when their blood was collected were excluded from the study. A final diagnosis was made with the advice of the pediatrician responsible for the patients after analysis of the patient's clinical evolution and the results of the supplementary tests that had been requested. The group was then divided into an inflammatory (n= 17) and an infectious (n= 66) group, and the latter group was in turn divided into a bacterial (n= 21) and a viral (n= 43) group. In two patients the infection could not be diagnosed.

The study was submitted to and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, and the adults responsible for the children who agreed to take part in the study signed a voluntary informed-consent form.

Tests carried out: a total of 8 mL of blood was collected in two tubes: one with EDTA and one with clot activator and separation gel. The serum was stored at -80°C until the tests were carried out.

- 1 Complete blood count: carried out in a Sysmex XE 2100 automated hematology analyzer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Differential WBC count was carried out using standard automated procedures and by microscopic analysis of May-Grünwald-Giemsa-stained thin blood smears (2 slides/patient; 200 cells observed by the same observer). Using the differential WBC count, the immature/total neutrophil ratio was calculated. The sensitivity, specificity and accuracy of the automated system in detecting a left shift were evaluated using the differential WBC count obtained by microscopic analysis as a reference.
- 2 Erythrocyte sedimentation rate (ESR): automated method (MicroTest 1X, Alifax-SPA, Italy).
- 3 CRP levels were measured by immunoturbidimetry in two systems:
 - Micros CRP automated equipment (Horiba Medical, Japan). CRP concentration is determined by measuring the absorbance at a wavelength of 850 nm after agglutination resulting from an antigen-antibody reaction. The assay consists of three phases: in the first the red blood cells are lysed by the addition of reagent R1; when reagent R2 is added in the second phase, potential interferents are inhibited; and in the third phase, the antigen-antibody complex is formed when reagent R3, which contains anti-CRP antibody coated latex particles, is added. This test is performed with the same material as that used for the complete blood count, and the result is provided in four minutes.
 - Roche /Hitachi modular automated equipment, using the CRPLX kit (Tina-quant C-Reactive Protein, Roche Diagnostics, Germany).

The results provided by the two systems were checked for concordance with each other.

4. SAA levels: by nephelometry, using the N Latex SAA kit (Siemens Healthcare Diagnostics, USA).

The accuracy of the parameters in detecting inflammatory/infectious processes was evaluated according to the following criteria:

- a. The presence of leukocytosis, defined according to the children's ages.
- b. Immature/total neutrophil ratio > 0.2.
- c. ESR > 10.0 mm
- d. CRP > 5.0 mg/L
- e. SAA > 6.4 mg/L

Statistical analysis

- The Mann-Whitney test was used to compare continuous or ordinal measurements between two groups. When an adjustment for age was required, the ANOVA test with rank transformation was used. The Chi-squared test or, when required, the Fisher exact test were used to compare proportions. The ICC (intraclass correlation coefficient) was used to measure concordance between the methods. ICC values greater than 0.7 were considered to indicate strong concordance. Concordance between the frequency of positive results for the different methods was checked using the Kappa coefficient. The values of this coefficient are defined as follows: greater than or equal to 0.75 - excellent concordance; between 0.75 and 0.40 - good concordance; and less than or equal to 0.40 - no concordance. A significance level of 5% was defined for all the statistical tests.
- The following software was used: SAS System for Windows (Statistical Analysis

System), version 9.1.3, Service Pack 3 - SAS Institute Inc., 2002-2003, Cary, NC, USA, and SPSS for Windows, version 10.0 SPSS Inc., 1989-1999, Chicago, Illinois, USA.

Results

First, the performance of the CRP test using the Micros CRP 200 was determined, as only a short time is needed to measure the levels of this protein with this system and the same material as that for the complete blood count can be used. The results were compared with those obtained using the Hitachi system, which is in regular use in our laboratory. A strong concordance between both methods was observed (concordance index = 0.871; 95% CI: 0.802 and 0.917).

The accuracy of the flags provided by the automated system to indicate the presence of a left shift in the neutrophils was also tested using the microscopic observation of thin smears as a reference (band cells > 1500/mm³ and/or the presence of primitive granulocytic cells). The accuracy of the XE 2100 system was 61.11%, the sensitivity 85.71% and the specificity 56.58%.

The median WBC count for the 83 patients in the study was 10.73 x10³/μL. The lowest counts correspond to patients suspected of having dengue fever. Table 1 shows the results of the laboratory measurements in the study population.

When the patients were divided into an inflammatory group (n=17) and an infectious group (n=66), no significant difference in the laboratory parameters studied was observed between the two groups (Table 2).

When the bacterial and viral subgroups were compared, the parameters WBC, CRP and SAA were found to have significantly higher values in the former subgroup (Table 3) (Figures 1. A-C).

Effectiveness of the various laboratory parameters in identifying the presence of inflammatory/infectious processes:

Results satisfying the following criteria were considered indicative of infectious or inflammatory processes: the presence of leukocytosis (determined according to the patient's age); immature/total neutrophil ratio > 0.2 ; ESR > 10.0 mm; and CRP > 5.0 mg/L. CRP was found to have the best performance, with coefficients indicative of excellent concordance, while ESR and SAA had good concordances and yielded very similar results. The Kappa coefficients for leukocytosis and the immature/total neutrophil ratio showed that there was no concordance between these measurements and the presence of an acute response (Table 4).

When the study population was divided into patients with infection and those with inflammation, the percentage of positive results was found to be greater in the infectious group for all the tests, although the only statistically significant difference between the results for the two groups were the CRP measurements obtained with the Modular/Hitachi system (Table 5).

Discussion

A host's response to pathogenic invasion involves various inflammatory cytokines, components of the immune system and a range of different cell types, such as leukocytes,

macrophages and dendritic cells [13]. Leukocytes play a central role in the phagocytosis and destruction of microorganisms, digestion of the remains of necrosed tissue and the production and release of various enzymes involved in tissue lesion and repair [14]. The present study showed the limited contribution made by WBC counts to the diagnosis of inflammatory or infectious diseases. The most common cause of neutrophilia is inflammation or infection, particularly bacterial infection; in viral infections, however, neutrophil count can be normal, reduced or slightly elevated [15]. This variation in cellular response may explain the wide range of results for WBC counts observed in this study and the limited usefulness of this parameter in detecting the presence of the disease, a finding that is in concordance with other data in the literature [10,16,17,18,19]. In a study to test the accuracy of peripheral WBC counts in identifying bacteremia in febrile children aged from 0 to 89 days, Bonsu and Harper [20] suggest that the modest performance of this indicator may be a result of the variation in host response depending on the pathogen causing the bacteremia or the immaturity of the immune system in children in that age group. Although the average age of our study population was higher (24 months), the hypotheses put forward by these authors can usefully be considered in our study.

The presence of immature leukocytes in the circulatory system as a result of activation of the hematopoietic system following infection has traditionally been considered to suggest the presence of bacterial infection. However, band cell count is a nonspecific, imprecise test and is less effective than total WBC or neutrophil counts. It is used to calculate the immature/total neutrophil ratio, an index that is mainly used to diagnose neonatal sepsis but has highly variable performance [21]. Identification of primitive granulocytic cells and absolute neutrophil count appear to be better than band cell count at identifying infection [22]. These findings agree with our results, as the immature/total neutrophil ratio had the worst performance of all the parameters tested.

ESR and measurement of SAA yielded better results than WBC counts and had a concordance of 72.15% and 73.03%, respectively. ESR has been used as an acute phase marker for more than 50 years although it is a nonspecific test and is subject to a number of interfering factors that can delay or accelerate aggregation of red blood cells. Nevertheless, under certain conditions giant cell arteritis, septic arthritis, osteomyelitis, bacterial endocarditis and differentiation between pelvic inflammatory disease and unruptured appendicitis ESR can be an aid to diagnosis [23]. The median ESR values in our study were equally elevated in the inflammatory and infectious groups, as well as in the bacterial and viral infectious subgroups. Despite being of limited use in emergency departments, when used together with other clinical and laboratory data, ESR can help to diagnose and classify the severity of the disease in febrile patients [23]. It has the advantage of being easy to perform, fast and inexpensive.

CRP has been the subject of continuous research in various clinical and surgical situations in an attempt to determine its usefulness as a biomarker for both the diagnosis and prognosis of diseases. The results of this research have been varied. In an assessment of its prognostic value in patients with sepsis, no correlation was found between CRP concentrations and disease severity [17]. In preterm newborns with bacterial infection, high-sensitivity CRP was shown to be more effective than SAA in differentiating between the presence or otherwise of infection, and the concentrations of both were found to be more elevated than in healthy term infants. The authors encourage the use of both measurements for early detection of infection in newborns [24]. Similar performance for CRP was observed in adult patients, and the specificity of the test was improved when the results were used in conjunction with the patients' temperature data [25]. In our study we used two systems for measuring CRP concentrations: a modular system, which carries out various tests at the same time, and a hematology analyzer, which performs a complete

blood count and measures CRP in whole blood. The frequency of positive CRP results in patients with an inflammatory/infectious process was higher in the modular system (89.89%), but the results for the hematology analyzer were quite acceptable (80.0%), suggesting that this equipment could be useful in an emergency department. In addition, the possibility of obtaining full blood count and CRP concentrations for pediatric blood samples at the same time could lead to faster diagnoses. However, in contrast to the modular system, there was no difference in the frequency of positive results between the inflammatory and infectious group.

As synthesis of SAA increases even in the presence of weak stimuli and remains elevated for longer than synthesis of CRP [26], measurement of SAA has been proposed as a more sensitive marker than CRP for the diagnosis of bacterial and viral infections, particularly in children [10,24,27]. The frequency of positive results for SAA was 73.03% in our study, and there was no significant difference between the inflammatory and infectious group. However, like CRP, SAA serum levels were significantly higher in the bacterial group, suggesting that there is a stronger inflammatory response in the presence of bacterial rather than viral agents. Our results indicate that measurement of SAA levels provides no additional information to that provided by CRP; furthermore, the test suffers from the disadvantages that it has a relatively high cost per test and is not yet a routine laboratory test.

A number of limitations regarding this study should be noted. The first of these relates to the diagnoses of the children in the study, which were based on clinical and laboratory data but were not confirmed microbiologically, as a result of which some patients may not have been classified correctly. The second relates to the time that elapsed between the onset of the process and when blood samples were collected and a diagnosis made. Depending on the time that has elapsed since the onset of the process,

inflammatory and infectious signs and symptoms may produce unexpected results, as the levels of leukocytes and each acute-phase protein vary according to the particular phase of the acute response, the etiologic agent, the site affected and the severity of the signs and symptoms.

In conclusion, CRP was the best biomarker of inflammatory/infectious processes in the group of children in this study, and measurement of SAA, whose effectiveness was similar to that of ESR, did not yield additional information to that provided by CRP. These findings highlight the need to use clinical and laboratory data if a more accurate diagnosis is to be achieved.

Funding: This work was supported by FAEPEX (UNICAMP) [grant nº 413/2008] and CNPQ.

Acknowledgments: We would like to express our gratitude to Drs. Adriana G L Ricetto, Mariana P Zambon and Marcelo C dos Reis .for their invaluable help in selecting patients and making the diagnoses and to Taís N Mazzolla, Rômulo T D de Oliveira.and Prof. Maria Heloisa S L Blotta for their help with the ELISA reactions.

References

1. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;15:74-80.
2. Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:735-47.
3. McCaig LF, Nawar EW. National Hospital Ambulatory Medical Care Survey: 2004 emergency department summary. *Adv Data* 2006 Jun 23; (372): 1-29.
4. Ishimine P. The evolving approach to the young child who has fever and no obvious source. *Emerg Med Clin N Am* 2007;25:1087-1115.
5. Pfäfflin A, Schleicher E. Inflammation markers in point-of-care testing (POCT). *Anal Bioanal Chem* 2009;393:1473-80.
6. Jaffe DM, Fleisher GR. Temperature and total white blood cell count as indicators of bacteremia. *Pediatrics* 1991; 87: 670-74.
7. Unlika-Kallio L, Kallio MJT, Peltola H et al. Serum C-Reactive, erythrocyte sedimentation rate, and white blood cell count in acute hematogenous osteomyelitis of children *Pediatrics* 1994; 93:59-62.
8. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994;15:81-8.
9. Schultz DR, Arnold PI. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20:12947.

10. Lannergardf A, Larsson A, Kraghsbjerg P et al. Correlation between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases. Scand J Clin Lab Invest 2003;63:267-72.
11. Ucar B, Yildiz B, Aksit MA et al. Serum amyloid A, procalcitonin, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1beta levels in neonatal late-onset sepsis. Mediators Inflamm 2008;2008:737141. Epub 2008 Nov. 16.
12. Khatib R, Saeed S, Sharma M et al. Impact of initial antibiotic choice and delayed appropriate treatment on the outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006;25:181-5.
13. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003;348:138-50.
14. Warren JS, Ward PA. The inflammatory response. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U (ed). Williams Hematology. New York: McGraw-Hill, 2001, 67-75.
15. Dale DC. Neutropenia and neutrophilia. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U (ed). Williams Hematology. New York: McGraw-Hill, 2001, 823-34.
16. Naseri M. Alterations of peripheral leukocyte count, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein in febrile urinary tract infection. Iran J Kidney Dis 2008;2:137-42.
17. Silvestre J, Póvoa P, Almeida E et al. Is C-reactive protein a good prognostic marker in septic patients? Intensive Care Med 2009; 35: 909-13.
18. Davis BH, Olsen SH, Ahmed E et al. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. Arch Pathol Lab Med 2006;130:654-61.

19. Cardall T, Glasser J, Guss DA. Clinical value of the total white blood cell count and temperature in the evaluation of patients with suspected appendicitis. *Acad Emerg Med* 2004;11:1021-7.
20. Bonsu BK, Harper MB. Identifying febrile young infants with bacteremia: is the peripheral white blood cell count an accurate screen? *Ann Emerg Med* 2003;42:216-25.
21. Cornbleet PJ. Clinical utility of the band count. *Clin Lab Med* 2002;22:101-36.
22. Ardron MJ, Westengard JC, Dutcher TF. Band neutrophil counts are unnecessary for the diagnosis of infection in patients with normal total leukocyte counts. *Am J Clin Pathol* 1994;102:646-9.
23. Olshaker JS, Jerrard DA. The erythrocyte sedimentation rate. *J Emerg Med* 1997; 15:869-874.
24. Lannergard A, Larsson A, Friman G et al. Human serum amyloid A (SAA) and high sensitive C-reactive protein (hsCRP) in preterm newborn infants with nosocomial infections. *Acta Paediatr* 2008;97:1061-5.
25. Póvoa P, Coelho L, Almeida E et al. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:101-8.
26. Jiang SL, Lozanski G, Samols D et al. Induction of human serum amyloid A in Hep3B cells by IL-6 and IL-1 beta involves both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Immunol* 1995;154:825-31.
27. Enguix A, Rey C, Concha A et al. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein and serum amyloid for the early diagnosis of bacterial sepsis in critically ill neonates and children. *Intensive Care Med* 2001;27:211-15.

Table 1. Values of the red cell indices and acute phase markers in children with inflammatory/infectious processes (n= 83).

Parameters	Median (minimum and maximum)
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10.70 (2.69-32.80)
HGB (g/dL)	11.9 (6.10-15.30)
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	306.00 (93.00-891.00)
CRP Micros CRP 200 (mg/L)	14.5 (0.00-355.8)
CRP Modular/Hitachi (mg/L)	14.2 (0.00-339.1)
SAA (mg/L)	43.90 (0.70-1610.00)
ESR (mm)	22.80 (2.00-120.00)

WBC: white blood cell count; HGB: hemoglobin; PLT: platelets; CRP: C-reactive protein; SAA: serum amyloid A; ESR: erythrocyte sedimentation rate.

Table 2: Median, minimum and maximum values of red cell indices and acute phase markers in children with an infectious process (n= 66) and an inflammatory process (n=17).

Parameter	n	Infectious	n	Inflammatory	p
WBC (x10³/μL)	66	11.84 (2.69-32.80)	17	9.37 (4.5-17.50)	0.1334
HGB (g/dL)	66	11.75 (6.10-15.30)	17	11.90 (7.30-14.70)	0.5496
PLT (x10³/μL)	66	309.00 (93.00-891.00)	17	300.00 (123.50-715.00)	0.3072
CRP Micros CRP 200 (mg/L)	54	14.3 (0.00-355.8)	16	25.0 (0.00-204.9)	0.7743
CRP Modular/Hitachi (mg/L)	66	14.6 (0.2-339.1)	17	10.3 (0.00-201.8)	0.2474
SAA (mg/L)	66	46.80 (0.70-1610.00)	17	39.70 (0.70-591.00)	0.6557
ESR (mm)	58	22.50 (2.00-120.00)	16	22.00 (2.00-120.0)	0.4578

HGB: hemoglobin; PLT: platelets; WBC: white blood cell count; CRP: C-reactive protein; SAA: serum amyloid A; ESR: erythrocyte sedimentation rate; p: p value (Mann-Whitney test).

Table 3: Median (minimum and maximum) values of the parameters evaluated in the Infectious group, subdivided into bacterial and viral subgroups.

Parameter	n	Bacterial	n	Viral	p
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	21	15.86 (4.92-32.80)	43	10.20 (2.69-23.35)	0.0128
HGB (g/dL)	21	12.00 (6.10-15.30)	43	11.70 (6.10-14.90)	0.5479
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	21	316.00 (140.50-543.50)	43	281.00 (93.00-891.00)	0.5386
CRP Micros CRP 200 (mg/L)	17	23.3 (0.00-355.8)	35	8.4 (0.00-209.5)	0.0200
CRP Modular/Hitachi (mg/L)	21	22.3 (0.2-339.1)	43	7.6 (0.5-293.0)	0.0055
SAA (mg/L)	21	149.00 (0.70-1610.00)	43	27.40 (0.70-754.00)	0.0314
ESR (mm)	17	33.00 (2.00-12.00)	39	18.00 (2.00-120.00)	0.1209

HGB: hemoglobin; PLT: platelets; WBC: white blood cell count; CRP: C-reactive protein;
SAA: serum amyloid A; ESR: erythrocyte sedimentation rate; p: p value (Mann-Whitney test).

Table 4: Frequency of positive results for inflammatory markers in patients with an inflammatory/infectious process (n=83).

Biomarker	Frequency	%	KCI	95% CI
Leukocytosis	19	21.11%	0.21	0.13-0.30
ESR >10 (mm)	57	72.15%	0.72	0.60-0.81
CRP Micros CRP 200 > 5.0 mg/L	60	80.00%	0.80	0.69-0.88
CRP Modular/Hitachi > 5.0 mg/L	80	89.89%	0.89	0.81-0.95
SAA > 6.4 mg/L	65	73.03%	0.73	0.62-0.81
Immature/Total Neutrophil Ratio > 0.2	2	2.22%	0.02	0.00-0.07

ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; SAA: serum amyloid A;
KCI: Kappa concordance index; CI: confidence interval.

Table 5-Frequency of positive results for markers of inflammatory response in the inflammatory response in the inflammatory and infectious groups.

Biomarker	Infectious (n= 66)		Inflammatory (n=17)		
	Frequency	%	Frequency	%	p
Leukocytosis	16	24.24	3	17.65	0.7501
ESR >10 (mm)	43	74.14	9	64.29	0.5131
CRP Micros CRP 200 (mg/L)	46	83.64	9	64.29	0.1393
CRP Modular/Hitachi (mg/L)	62	93.94	12	75.00	0.0429
SAA > 6.4 (mg/L)	50	75.76	12	75.00	1.0000
Immature/Total Neutrophil Ratio > 0.2	2	3.03	0	0.00	-

ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; SAA: serum amyloid A; p: p value (Fisher)

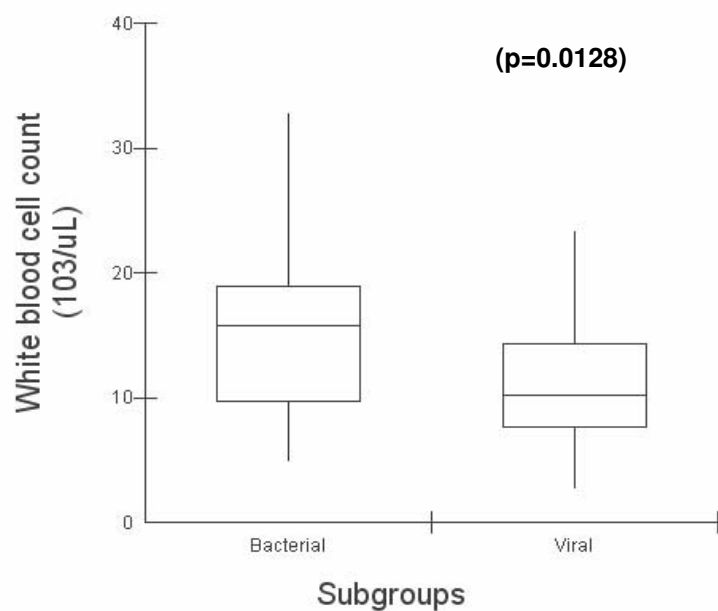


Figure 1A: Box plot of white blood cell counts in the bacterial and viral subgroups.

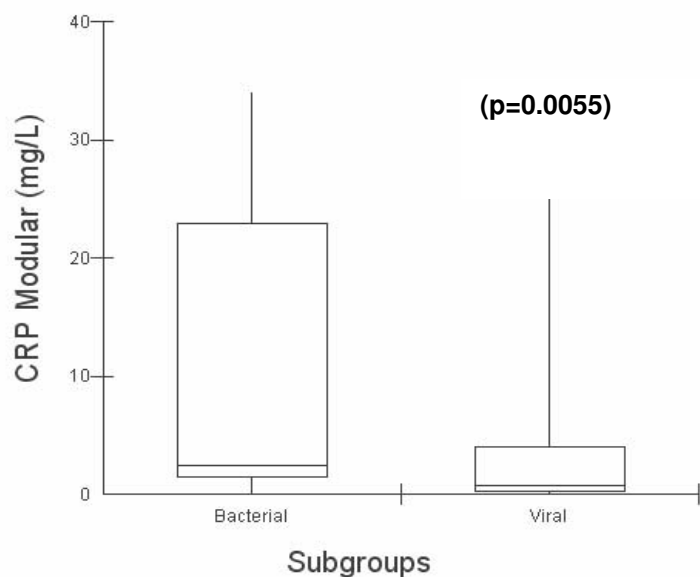


Figure 1B: Box plot of CRP concentrations (Modular-Hitachi) for the bacterial and viral subgroups.

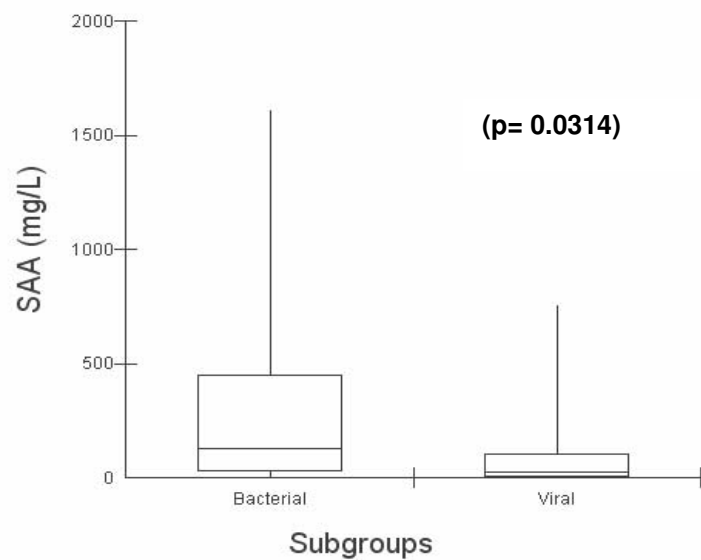


Figure 1C: Box plot of SAA concentrations in the bacterial and viral subgroups.