

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**ESTUDO DOS BIOMARCADORES PROCALCITONINA E
PROTEÍNA C REATIVA EM DOENTES COM INFEÇÕES
BACTERIANAS**

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Mariana Alexandra de Almeida Ribeiro

Orientadores: Dr. José António Carvalho

Prof. Dr. José Albino Alves Dias



Vila Real, dezembro de 2018

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**ESTUDO DOS BIOMARCADORES PROCALCITONINA E
PROTEÍNA C REATIVA EM DOENTES COM INFEÇÕES
BACTERIANAS**

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Mariana Alexandra de Almeida Ribeiro

Orientadores: Dr. José António Carvalho

Prof. Dr. José Albino Alves Dias

Composição do Júri:

Prof. Albino Dias

Prof. Rui Bezerra

Prof^ª. Cristina Antunes

Vila Real, dezembro de 2018

Orientadores

Dr. José António Carvalho

Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (Vila Real)

Prof. Dr. José Albino Alves Dias

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (Vila Real)

Prof. Cristina Antunes

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (Vila Real)

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação de mestrado em Biologia Clínica
Laboratorial.

As doutrinas apresentadas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.

“ O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”

José de Alencar

Agradecimentos

Início os agradecimentos, ao Presidente do Conselho de Administração do CHTMAD, João Oliveira, por ter contribuído para a realização desta investigação e por ter participado na rotina laboratorial do serviço de patologia clínica desta instituição. Ao Diretor da UCIP, Francisco Esteves, pela disponibilidade para o acesso aos dados dos doentes deste mesmo serviço. Ao Dr. José António Carvalho, Diretor de Serviço das Análises Clínicas do CHTMAD-EPE, pela orientação cuidada e interessada, contribuindo assim para concretização deste estágio no centro hospitalar de Vila Real.

Ao Prof. Doutor José Albino Dias, como orientador da UTAD, pelo acompanhamento e dedicação durante a realização do trabalho escrito, contribuindo positivamente para a execução de todos os objetivos intencionados para realização da dissertação do mestrado. Assim como a coordenadora do curso de Biologia Clínica Laboratorial, Professora Dr^a. Ana Sampaio pelas facilidades concedidas para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Técnico Jorge, pela ajuda na integração no CHTMAD, pois para além de ter sido um membro essencial à realização deste projeto, também contribuiu positivamente no acompanhamento da minha rotina diária na instituição. E, sobretudo, estou muito grata pela amizade e pelos gestos de conforto nos momentos menos bons passados ao longo deste período.

Aos restantes técnicos do Serviço de Patologia Clínica, que também estiveram sempre dispostos a apoiar e que colaboraram para o bom ambiente no trabalho.

À pessoa que entrou na minha vida académica de uma forma muito simples e rápida, que me acompanhou durante estes dois anos académicos, mas que irá ficar na minha vida para sempre. Agradeço a amizade, o apoio incondicional, o companheirismo, o carinho que marcou para todo sempre a minha vida. À Filipa. Gratidão é tudo o que sinto.

Quero agradecer a todas as amigas que me ajudaram a concretizar da melhor forma este trabalho e pelo apoio emocional, especialmente à Diana e à Sofia.

Ao meu namorado, Renato. Não tenho palavras para agradecer à pessoa que sempre me acompanhou e apoiou incondicionalmente durante a vida académica. Tenho a agradecer por todo o companheirismo, pelas palavras de carinho, pela força de vontade e pela confiança. Desta forma, aprendi que com luta e persistência tudo se consegue. Não existem obstáculos, enquanto soubermos contorná-los.

Por último, e mais importante, tenho a agradecer à minha família, que desde sempre esteve do meu lado a apoiar-me ao longo de todo este projeto e que sempre fez parte desta etapa tão marcante da minha vida, Obrigada.

Índice Geral

Agradecimentos.....	IX
Resumo.....	XVII
Abstrat.....	XIX
Abreviaturas.....	XXV
1. Revisão bibliográfica.....	1
1.1. Enquadramento temático.....	1
1.1. Infeção bacteriana.....	1
1.2. Septicémia.....	2
1.2.1. SIRS.....	4
1.2.2. Choque séptico.....	4
1.3. Marcadores Bioquímicos.....	4
1.3.1. Citocinas pró-inflamatórias.....	5
1.3.2. Proteína C reativa.....	7
1.3.3. Procalcitonina.....	10
1.4. Objetivos.....	14
2. Materiais e Métodos.....	17
2.1. Amostragem.....	17
2.2. Variáveis estudadas.....	17
2.3. Determinação por COBAS 6000®.....	17
2.3.1. Soluções de calibração e de controlo de qualidade.....	19
2.3.1.1. Constituintes.....	19
2.3.1.2. Preparação.....	20
2.3.2. Calibração.....	21
2.3.3. Controlo de qualidade.....	21
2.3.4. Preparação da amostra.....	22
2.3.5. Quantificação da Proteína C reativa.....	23
2.3.5.1. Constituição da <i>rackpack</i>	23
2.3.5.2. Princípio do método de quantificação de CRP.....	23
2.3.6. Quantificação da Procalcitonina.....	24
2.3.6.1. Constituição da <i>rackpack</i>	24
2.3.6.2. Princípio do método de quantificação da PCT.....	24

3. Resultados e Discussão	29
3.1. Análise geral dos doentes	29
3.1.1. Unidades de serviço	30
3.1.1.1. Doentes da faixa etária: 0-18 anos	30
3.1.1.2. Doentes da faixa etária: 19-65 anos	32
3.1.1.3. Doentes da faixa etária: superior a 65 anos	33
3.2. Análise dos diagnósticos gerais	36
3.3. Alvo de estudo	37
3.2.1. Dados relativos ao ano de 2016	37
3.2.2. Dados relativos de 2017	38
3.3. Intervalo de <i>Cut-off</i> prático	39
3.4. Cálculo do valor de Índice K	40
4. Conclusão e Perspetivas futuras	45
Referências Bibliográficas	49

Resumo

Os avanços promovidos pela investigação científica têm vindo a solucionar ou a melhorar a resposta a diversos problemas relativos à saúde pública.

Uma das patologias mais graves em todo mundo, responsável pela ocorrência de elevada mortalidade nos doentes afetados, é a sepsis. A deteção e diagnóstico precoce da sepsis representam um desafio diário no ambiente médico hospitalar devido à complexidade da doença e à falta de métodos específicos. Um dos métodos da deteção da sepsis consiste na realização de análises aos níveis séricos de biomarcadores que mostram alteração na presença de agentes patogénicos. A procalcitonina (PCT) e a proteína C reativa (CRP) são os biomarcadores mais utilizados para a deteção da sepsis. Estes biomarcadores permitem uma resposta rápida contribuindo positivamente para o diagnóstico precoce desta doença.

Neste trabalho, realizou-se um estudo dos doentes com idade superior a 65 anos internados na UCIP com infeção bacteriana, nos anos 2016 e 2017, que efetuaram análises aos níveis séricos da PCT e CRP.

O objetivo principal deste trabalho foi verificar o nível de concordância na utilização dos biomarcadores, PCT e CRP, para o diagnóstico da sepsis através de um estudo pormenorizado dos dados dos doentes que deram entrada no CHTMAD. Verificou-se que apesar de CRP ter sido descoberta e utilizada no âmbito hospitalar antes da PCT, este biomarcador não apresenta especificidade suficiente para a deteção da sepsis. Em contrapartida, tem uma sensibilidade considerável na presença de agentes patogénicos no organismo. A PCT manifesta uma especificidade superior e, por isso, é o biomarcador mais utilizado para diagnóstico da sepsis, apesar de mais dispendioso.

Como complemento a este trabalho foi também calculado o intervalo de *cut-off* prático e o índice de concordância de utilização simultânea dos biomarcadores, PCT e CRP, para o diagnóstico da sepsis, definido como índice kappa (IK). O intervalo de *cut-off* prático foi concordante com o intervalo dado pela ROCHE[®], para o ano de 2016 e 2017. Desta forma, verificou-se que existe coerência entre o método considerado e o obtido na prática laboratorial. Após a realização do cálculo do IK, o grau de concordância foi classificado como “Muito Bom”, valorizando a utilização da PCT e CRP em simultâneo para a deteção da sepsis.

Palavras chave: sepsis, procalcitonina, proteína C reativa, intervalo de *cut-off* prático, índice kappa.

Abstract

The Advances promoted by scientific research haveM coming to solve Or to improve the response to various Problems related to public health.

One of the most serious pathologies in the world, responsible the occurrence of high mortality in the affected patients is sepsis. Early detection and diagnosis of sepsis represent a daily challenge in the hospital medical environment due to the complexity of the disease and the lack of specific methods. One of the methods of the detection of sepsis is to perform analyses on the serum levels of biomarkers that show alterations in the presence of pathogenic agents. Procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) are the most widely used biomarkers for the detection of sepsis. These biomarkers allow a rapid response contributing positively to the early diagnosis of this disease.

In this work, we conducted a study of patients older than 65 years hospitalized in the UCIP with bacterial infection in the years 2016 and 2017, who performed analyses at the serum levels of PCT and CRP.

The main objective of this work was to verify the level of agreement in the use of biomarkers, PCT and CRP, for the diagnosis of sepsis Through a detailed study of the data of patients who entered the Chtmad. It was found that although CRP was discovered and used in the hospital context before PCT, this biomarker does not present sufficient specificity for the detection of sepsis. On the other hand, it has considerable sensitivity in the presence of pathogenic agents in the body. PCT manifests a higher specificity and, therefore, is the most widely used biomarker for diagnosis of sepsis, although it is more costly.

As a complement to this work, we also calculated the interval of *cut-off* and the concordance rate of simultaneous use of biomarkers, PCT and CRP, for the diagnosis of sepsis, defined as Kappa Index (IK). The range of *cut-off* Agreement was consistent with the interval given by ROCHE[®], for the year 2016 and 2017. Thus, it was verified that there is coherence between the method considered and that obtained in laboratory practice. After the performance of the IK calculation, the degree of agreement was classified as "very good", The use of PCT and CRP simultaneously for the detection of sepsis.

Keywords: sepsis, procalcitonina, C-reactive protein, Range of *cut-off* Practical, kappa Index.

Índice de Figuras

Figura 1- Estrutura tridimensional da CRP.	9
Figura 2- Representação da estrutura primária da PCT com os locais de fragmentação em polipéptidos.	12
Figura 3- Aparelho COBAS 6000®.	21
Figura 4- Esquema ilustrativo das incubações realizadas no COBAS 6000® para a quantificação da PCT.	23
Figura 5- Distribuição percentual dos doentes de cada faixa etária, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP no ano de 2016.	31
Figura 6- Distribuição percentual dos doentes de cada faixa etária, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP no ano de 2017.	32
Figura 7- Distribuição percentual das unidades de serviço com maior número de doentes, com idade inferior ou igual a 18 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2016.	33
Figura 8- Distribuição percentual das unidades de serviço com maior número de doentes, com idade inferior ou igual a 18 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2017.	34
Figura 9- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idades entre os 19 e 65 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2016.	34
Figura 10- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idades entre os 19 e 65 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2017.	35
Figura 11- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idade superior a 65 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2016.	36
Figura 12- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idade superior a 65 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2017.	36

Índice de Tabelas

Tabela 1- Sintomas fisiopatológicos mais frequentes associados à sepsis e consequentemente à SIRS.	3
Tabela 2- Intervalos de concentração sérica de CRP em situações normais no ser humano, presentes na literatura.	10
Tabela 3- Intervalos de concentração sérica de PCT em situações normais no ser humano, presentes na literatura.	13
Tabela 4- Constituintes da solução de calibração da CRP.	29
Tabela 5- Escala de classificação do valor kappa.	42
Tabela 6- Intervalo/Valor de referência relativos aos níveis séricos de CRP e PCT.	42
Tabela 7- Índice K relativo ao ano de 2016 entre a PCT e CRP.	42
Tabela 8- Índice K relativo ao ano de 2017 entre a PCT e CRP.	43

Abreviaturas

ALT (GTP) - Alanina aminotransferase

ASLO - Antiestreptolisina-O

AST (GOT) - Aspartato transaminase glutâmica oxalacética sérica

CHTMAD - Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro

CRP - Proteína C Reativa

CK-MB - Creatinofosfoquinase cerebral

CK-MM - Creatinofosfoquinase muscular

Cons.- Consulta

ECL - Eletroquimioluminescência

GLDH - Glutamato desidrogenase

γ- GTP - Gama glutamiltranspeptidase

IK - Índice kappa

IL-1β – Interleucina-1β

IL-6 – Interleucina- 6

Int. - Internamento

LDH - Lactato desidrogenase

LCR - Líquido cefalorraquidiano

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

PCT - Procalcitonina

TNFα – Fator de Necrose Tumoral α

Rpm - Rotações por minuto

SIRS - Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica

UCI - Unidade de Cuidados Intensivos

UCIP - Unidade de Cuidados Intensivos Polivalentes



Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

1. Revisão bibliográfica

1.1. Enquadramento temático

Segundo a literatura, a sepsis continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo (Kim *et al.*, 2017; Suárez-Santamaría *et al.*, 2010). A percentagem de mortes causadas por esta doença, chega a ultrapassar a soma das percentagens de morte por cancro do pulmão e da mama (Becker *et al.*, 2010). Nos hospitais, a unidade de cuidados intensivos (UCI), corresponde à unidade com mais frequência destes casos (Heredia-Rodríguez *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017b). A sepsis representa um tema da atualidade muito relevante para a investigação científica, uma vez que existem muitas dificuldades para a sua deteção e para a implementação do seu tratamento (Uusitalo-Seppälä *et al.*, 2011).

Em condições de sepsis, há uma estimulação contínua de mediadores anti-inflamatórios nomeadamente citocinas, provocada pelos antigénios, que promovem a resposta imune no hospedeiro (Vijayan *et al.*, 2017). Um diagnóstico rápido e assertivo de uma septicémia é crucial, quando está em causa a sobrevivência dos doentes e um bom prognóstico (Gonçalves *et al.*, 2015; Suárez-Santamaría *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017a).

1.1. Infecção bacteriana

Uma infecção bacteriana consiste na interação de microrganismos e o sistema imunitário (SI) humano, inato e adquirido, promovendo a síntese de mediadores de resposta no organismo (Ríos-Toro *et al.*, 2017). Esta resposta pode ser controlada, ou fatal se a resposta do hospedeiro à infecção for desregulada (Pontrelli *et al.*, 2017).

O nosso organismo é frequentemente exposto a agentes patogénicos presentes no meio ambiente aos quais já está adaptado, e produz anticorpos para os eliminar eficazmente, manifestando resistência a estes agentes oportunistas (Vijayan *et al.*, 2017). Os agentes patogénicos mais comuns em indivíduos geneticamente predispostos interagem com o SI promovendo uma resposta excessiva e a libertação de mediadores celulares (Suárez-Santamaría *et al.*, 2010). Este fenómeno promove o desenvolvimento de uma reação no hospedeiro podendo dar origem a uma infecção localizada e/ou generalizada. A infecção generalizada (septicémia) caracteriza-se pela replicação ativa e descontrolada de bactérias na corrente sanguínea, espalhando-se pelo organismo. Geralmente provém de uma fonte específica (infecção localizada) podendo ter origem em rituais diários e frequentes nos hospitais, como por exemplo na introdução dos cateteres (Soreng *et al.*, 2011).

A gravidade da infeção está correlacionada com a taxa de mortalidade e a sua origem, podendo ser adquirida na comunidade, nos hospitais ou outros estabelecimentos de saúde (Vijayan *et al.*, 2017).

1.2. Septicémia

Ao longo de muitos anos, a sepsis era caracterizada por uma resposta inflamatória à infeção, da qual resultava uma lesão e disfunção dos órgãos (Soreng *et al.*, 2011). Contudo o processo demonstrou não ser tão linear quanto esta definição. Mais tarde, a sepsis foi definida como uma desordem heterogénea e dinâmica resultante de desequilíbrios nos eventos inflamatórios do organismo (Chaudhry *et al.*, 2013). Os eventos inflamatórios (resposta inflamatória) surgem quando o organismo é invadido por agentes patogénicos e desenvolve mecanismos de neutralização que promovem a ativação de vários mecanismos em células imunes com capacidade de produzir proteínas inflamatórias (Vijayan *et al.*, 2017). Em grande parte dos casos, a resposta inflamatória sistémica exagerada provoca um aumento da mortalidade, a curto/longo prazo (Bode-Jänisch *et al.*, 2013; Heredia-Rodríguez *et al.*, 2017; Suárez-Santamaría *et al.*, 2010).

Em termos clínicos, a sepsis é detetada pelo aumento da concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias, que pode ser provocado pela interação de bactérias, parasitas da malária e, excepcionalmente, por vírus e fungos, com o SI (Becker *et al.*, 2010; Chaudhry *et al.*, 2013). As bactérias são a causa mais comum da sepsis, representando cerca de 80% dos casos. Nomeadamente as bactérias Gram-positivas representam mais de 50 % das causas da sepsis (Soreng *et al.*, 2011). Este acontecimento é explicado, pelo facto de os níveis séricos de PCT aumentarem com a presença dos lipopolissacarídeos e citocinas que surgem na corrente sanguínea na presença da sepsis. O tipo de bactérias (Gram-positivo ou Gram-negativo) pode ser identificado precocemente, através da manifestação de determinados sintomas de infeção na corrente sanguínea e pela realização de hemoculturas (Vurgun *et al.*, 2017).

A sepsis em grande parte dos casos tem origem infecciosa, mas também pode ter origem não infecciosa, como no caso de distúrbios auto-imunes, pancreatites, vasculites, tromboembolismos, queimaduras, procedimentos cirúrgicos, golpes de calor, doenças neoplásicas e síndromes de angústia respiratória (Becker *et al.*, 2010; Pontrelli *et al.*, 2017; Soreng *et al.*, 2011). No caso da origem não infecciosa é fundamental a identificação da possível fonte de infeção através da situação atual do doente e dos seus antecedentes. As alterações fisiopatológicas que se manifestam no hospedeiro em resposta à sepsis, são nomeadamente:

febre, hipotermia, taquipneia, taquicardia, leucocitose e leucopenia (tabela 1). Para além disso, da sepsis pode resultar complicações a curto prazo com elevada gravidade como por exemplo, a hipotensão, coma, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e coagulação intravascular (Becker *et al.*, 2010; Heredia-Rodríguez *et al.*, 2017; Ríos-Toro *et al.*, 2017). A coagulação intravascular é o principal fator responsável pela disfunção dos órgãos, pois impede o fluxo sanguíneo nos capilares com a micro-coagulação e origina situações de alto risco. Com o avançar do estado da patologia, surge a exaustão dos fatores que contribuem para a coagulação e, conseqüentemente, aumentam as hemorragias locais. Este fenómeno vai contribuir para uma complexa interação entre o sistema de coagulação e as células, levando a uma perfusão tecidual insuficiente e à hipoxia nos tecidos, promovendo a disfunção dos órgãos (Soreng *et al.*, 2011).

Tabela 1- Sintomas fisiopatológicos mais frequentes associados à sepsis e conseqüentemente á SIRS (Carrol *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2017).

Sintomas fisiopatológicos	Valores
Temperatura (°C)	>36°C
Batimentos cardíacos (min)	>90
Batimentos respiratórios (min)	>20
Leucócitos (cel/mm ³)	>12000

Uma vez que estes sintomas fisiopatológicos (tabela 1) podem estar associados a outras patologias, deve ser realizada uma análise pormenorizada do estado clínico do doente. Apesar de não haver um tratamento específico para sepsis, esta deve ser diagnosticada em tempo útil para assim se realizar uma terapia adequada (Faix *et al.*, 2013).

Em casos mais avançados de doentes imunodeprimidos, como as crianças, idosos, doentes com outras patologias ou em casos não diagnosticados, a morte é o que acontece frequentemente, por não terem defesas suficientes para resistir à complexa interação com o SI (Becker *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2017).

Durante a sepsis com a presença das bactérias (sepsis bacteriana) no organismo, ocorre de imediato ativação de monócitos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais

que produzem e secretam as citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea, atravessando as barreiras respiratórias do intestino e do epitélio urogenital. Além da origem bacteriana, a sepsis pode também ser proveniente de padrões moleculares associados a danos, como por exemplo a libertação de fatores de células mortas (Becker *et al.*, 2010; Vijayan *et al.*, 2017).

1.2.1. SIRS

Segundo Becker *et al.* (2010), um doente que apresente mais do que dois sintomas clínicos presentes na sepsis, possui uma síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS). A SIRS, trata-se de uma infeção sistémica associada à disfunção e falha dos órgãos, cujo tratamento médico é crucial para o doente atingir a homeostase (Soreng *et al.*, 2011; Suwen *et al.*, 2013). Esta patologia tem associadas outras doenças, devido ao seu agravamento, nomeadamente o choque séptico, que está associado à hipotensão, a hipoperfusão, acidose láctica, oligúria e alteração aguda do estado mental do doente (Carrol *et al.*, 2002).

1.2.2. Choque séptico

O choque séptico é caracterizado como sepsis grave e manifesta pelo menos dois sintomas presentes no SIRS (Chaudhry *et al.*, 2013). Trata-se de um termo com uma definição menos precisa, podendo dividir-se em dois tipos:

- Choque séptico precoce: surge em resposta a fluídos intravenosos e\ou intervenções farmacológicas;
- Choque séptico refratário: tem duração de apenas uma hora no organismo, mesmo com a administração de fluídos intravenosos e intervenção farmacológica (Carrol *et al.*, 2002).

1.3. Marcadores Bioquímicos

Ao longo dos anos, as equipas médicas verificaram que são necessárias ferramentas de auxílio ao diagnóstico, mais diretas e rápidas que a manifestação de sintomas fisiopatológicos pela parte do doente. Uma das ferramentas mais utilizadas é a determinação dos biomarcadores na corrente sanguínea através da sua concentração sérica (Riedel, 2012). Nos últimos anos, foram estudados cerca de 178 biomarcadores, nomeadamente a PCT e CRP, sendo estes mencionados como os mais acessíveis e económicos comparativamente com os restantes, em mais de 3 370 artigos (Tachyla *et al.*, 2017).

Os biomarcadores podem ser moléculas, células específicas, genes, hormonas ou enzimas presentes no organismo. São substâncias que surgem na corrente sanguínea em situações normais, situações patológicas do organismo ou em resposta a um agente farmacológico (Kinderheilkd, 2017; Riedel, 2012). São determinados experimentalmente com o objetivo de diagnosticar doenças e de permitir verificar a gravidade ou sua progressão, prever um prognóstico e, assim, delinear o tratamento mais apropriado com efeitos secundários reduzidos (Kinderheilkd, 2017; ROCHE.pt- site).

Um marcador biológico tem como propósito ser objetivo, sensível, preciso, reprodutível e mensurável em condições fisiológicas ou patológicas não manifestadas pelo doente, podendo ser útil para o diagnóstico (Kinderheilkd, 2017).

Ao utilizar determinado biomarcador no laboratório, onde é realizada a colheita da amostra será necessária uma padronização ótima dos procedimentos pré-analíticos, bem como da reprodutibilidade, precisão (Kinderheilkd, 2017; Vijayan *et al.*, 2017).

Estes podem ser mensurados através dos fluídos corporais extraídos do doente, como por exemplo, o soro e o plasma (dados pertencentes aos doentes em estudo).

Nenhum biomarcador pode ser utilizado isoladamente, isto é, deve ser sempre considerado o uso simultâneo de dois ou mais biomarcadores. Desta forma, os biomarcadores são úteis para identificar os doentes que tem a necessidade de uma monitorização mais cuidadosa (Faix *et al.*, 2013).

Existem vários biomarcadores para a deteção da sepsis, os mais utilizados na medicina são os marcadores bioquímicos, como a contagem de células brancas do sangue, as citocinas pró-inflamatórias, a PCT, a CRP e a taxa de sedimentação eritrocitária (Suwen *et al.*, 2013).

1.3.1. Citocinas pró-inflamatórias

Após o organismo ser invadido por agentes infecciosos (bactérias) desencadeia-se uma resposta imunitária verificando-se na corrente sanguínea um aumento excessivo das células brancas, nomeadas de glóbulos brancos ou leucócitos. Estas fazem parte do SI e desempenham uma função importante na defesa do organismo. Sempre que o processo de infeção ocorre, são estimulados os leucócitos, nomeadamente as células T, células B e as células NK, assim como os subgrupos associados, nomeadamente os monócitos e neutrófilos que desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro (Becker *et al.*, 2010).

No desencadeamento da resposta, são libertadas citocinas que têm ação de péptidos sinalizadores (Becker *et al.*, 2010). A produção de citocinas pelos recetores do citoplasma é

estimulada pelo reconhecimento dos peptidoglicanos da bactéria ou pelos ácidos nucleicos (Faix *et al.*, 2013). As citocinas são moléculas pequenas, com tempo de semivida curto, produzidas nos macrófagos com capacidade de regular a resposta imune perante uma infecção, inflamação e casos de trauma. Existem dois tipos de citocinas: as citocinas pró-inflamatórias, que ativam a inflamação sistêmica e as citocinas anti-inflamatórias, que inibem a inflamação e contribuem para a recuperação desta patologia (Chaudhry *et al.*, 2013).

O Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α^1), Interleucina-1 β (IL-1 β^2) e Interleucina- 6 (IL-6³) são citocinas pró-inflamatórias que medeiam a resposta inicial do SI inato, a lesões ou infecções. Quando os recetores ficam envolvidos pelos ligandos bacterianos, ocorre a estimulação dos macrófagos para a sua produção (Faix *et al.*, 2013). Cada uma destas citocinas tem funções específicas:

- **TNF- α** – corresponde à parte intrínseca do processo pró-inflamatório que influencia células imunes podendo levar à morte celular (Becker *et al.*, 2010). Tem um papel importante na estimulação da reação da fase aguda na sepsis, pois ativa as células endoteliais, atraindo para o local os leucócitos polimorfonucleares circulantes (Faix *et al.*, 2013). Estes ao entrarem na corrente sanguínea vão provocar o aumento da temperatura corporal (febre), entre outros sintomas sistémicos. Os seus níveis séricos aumentam drasticamente em casos de septicémia, o que faz desta citocina a mais estudada por vários investigadores científicos. A desregulação desta citocina está associada ao aparecimento de variadas patologias tais como a depressão, doença de Alzheimer e cancro (Chaudhry *et al.*, 2013);
- **IL-1 β** – é processada proteoliticamente pela caspase-1. Tem propriedades pirogénicas induzindo a febre, capacita os leucócitos de atravessarem o endotélio capilar aumentando desta forma a sensibilidade para a dor e, para além disso, é citotóxica para vários tipos de células (Becker *et al.*, 2010). A **IL-1 β** é uma mediadora importante da resposta inflamatória, estando envolvida em várias atividades celulares inclusive proliferação celular, diferenciação e apoptose (Chaudhry *et al.*, 2013);
- **IL-6** – é sintetizada nos macrófagos e nos monócitos. Tem a função de estimular a síntese da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) contribuindo também para a diferenciação de células B e para a ativação de células T citotóxicas (Becker *et al.*, 2010). A IL-6 é

¹ Da terminologia inglesa: Tumor Necrosis Factor Alfa.

² Da terminologia inglesa: Interleukin 6.

³ Da terminologia inglesa: Interleukin 1beta

secretada por células T e macrófagos para estimular a resposta imune em casos de trauma, queimaduras e outros danos nos tecidos que, conseqüentemente, promovem a infeção. Funciona como citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória. Para além disso, também pode ser libertada em resposta à presença de moléculas microbianas específicas referenciadas como padrões moleculares dos agentes patogénicos (Chaudhry *et al.*, 2013). Também estimula a síntese e secreção de várias proteínas podendo contribuir para a diminuição do seu catabolismo (Becker *et al.*, 2010; Ríos-Toro *et al.*, 2017). É utilizada em diagnósticos de doenças como o cancro, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes e na sepsis (Chaudhry *et al.*, 2013). No caso da sepsis, esta interleucina é fundamental, pois promove a produção dos fatores de fase aguda no fígado, inclusive a CRP, estimulando alteração na produção de células na medula óssea e a produção de leucócitos polimorfonucleares circulantes (Faix *et al.*, 2013). A IL-6 tem sido distinguida comparativamente às outras citocinas, devido ao facto de ser menos afetada pelos aumentos fisiológicos e maturação hepática na fase neonatal (Prieto *et al.*, 2010).

As citocinas pró-inflamatórias, assim como todos os fatores de resposta inflamatória, desempenham uma função elementar no organismo, podendo-se assim prevenir a morte com a sinalização prévia da sepsis (Becker *et al.*, 2010). Segundo Faix *et al.*, (2010), o TNF- α , IL-1 β e IL-6 são citocinas que não sendo específicas para a sepsis, têm um papel importante como biomarcador no prognóstico do doente devido à correlação positiva com a gravidade da doença.

1.3.2. Proteína C reativa

Na década de 1930, foi identificada a CRP como uma proteína plasmática de fase aguda, não glicosilada, produzida no fígado por hepatócitos (Gao L. *et al.*, 2017). E, por este motivo, em meados de 1980, foi um dos biomarcadores mais utilizados na identificação de inflamação e diagnóstico da sepsis (Riedel, 2012). Tem como principal objetivo combater os antigénios invasores, sendo a IL-6 a citocina responsável pelo estímulo da sua produção e libertação (Lyu *et al.*, 2013; Ríos-Toro *et al.*, 2017).

Esta proteína (figura 1) com peso molecular de aproximadamente 105 kDa, possui 5 cadeias polipeptídicas idênticas e altamente resistentes à proteólise. As subunidades estão unidas por ligações covalentes e a sua estrutura quaternária revela que estão dispostas simetricamente em volta do centro, formando um anel com as cinco sub-unidades (Gao *et al.*, 2017a; Ríos-Toro *et al.*, 2017).

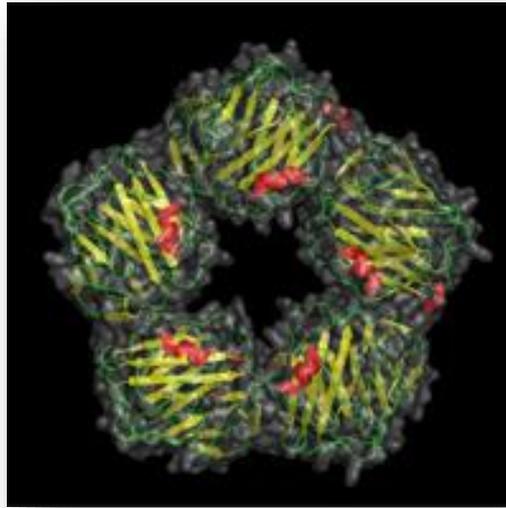


Figura 1- Estrutura tridimensional da CRP.

(Adaptado: www.wikilingue.com)

A proteína C reativa, quando se encontra na forma de complexo, é reconhecida pela fração de complemento C1q ativando assim a via de complemento clássica. Este complexo é composto pela proteína agregada a células danificadas, fragmentos de apoptose e componentes bacterianos, fúngicos e parasitários. O que confere uma resposta precoce aos sintomas clínicos, nomeadamente a febre (Gao *et al.*, 2017a; Ríos-Toro *et al.*, 2017).

É uma proteína com tempo de semi-vida curto, cerca de 19 horas (May *et al.*, 2007).

O intervalo de referência para a quantificação da CRP fornecido pela ROCHE® é <5 mg/L, para adultos. Ou seja, o valor obtido nas análises efetuadas aos níveis séricos da CRP deve estar compreendido entre 0,3-350 mg/L, intervalo este definido pelo limite de deteção e pelo limite máximo de concentração de CRP detetada na corrente sanguínea (*cut-off* teórico). Comparando estes valores com a literatura, verifica-se alguma similaridade entre os valores de CRP considerados por outros centros de investigação (tabela 2).

Tabela 2- Intervalos de concentração sérica de CRP em situações normais no ser humano, presentes na literatura.

Literatura	Concentração sérica da CRP
(Heredia-Rodriguez <i>et al.</i> , 2017)	50-100 mg/L
(May <i>et al.</i> , 2007)	>10 mg/L
(Uusitalo-Seppälä <i>et al.</i> , 2011)	0.2-580 mg/L
(Slade <i>et al.</i> , 2000)	3-100 mg/L

Com o estímulo da produção da CRP, em resposta a uma infecção de fase aguda, a sua concentração sérica aumenta rapidamente. Este fenómeno ocorre no prazo de 6 a 12 horas, e o pico máximo é atingido em 48-72h (Wu *et al.*, 2017). Quando os níveis de CRP se encontram acima de 100 mg/L representam valores associados a estímulos graves, como traumatismos, infeções graves e a sepsis. A resposta da CRP poderá ser mais significativa em casos de doentes com patologias do foro hepatológico (ROCHE, BRAHMS.CRP). Como a CRP tem uma semi-vida curta, responde de imediato à diminuição do processo inflamatório, com a diminuição da sua concentração sérica.

Este biomarcador é utilizado por muitos serviços de saúde para diagnóstico clínico em várias situações, nomeadamente (ROCHE, BRAHMS.CRP):

- Detetar processos inflamatórios sistémicos;
- Avaliar o tratamento de infeções bacterianas com antibióticos;
- Detetar infeções intra-uterinas;
- Diferenciar a forma ativa e inativa de doenças com infeções concomitantes;
- Monitorizar terapeuticamente doenças reumáticas;
- Determinar a presença de complicações pós-operatórias numa fase inicial;
- Distinguir entre infeção e rejeição do transplante de medula óssea.

Assim, a quantificação da concentração sérica da CRP fornece informações muito úteis para avaliar o grau de gravidade da sepsis. Segundo 9aixet *al.*, (2013), a quantificação dos níveis séricos da CRP, indica a presença/ausência de doenças inflamatórias e/ou infecciosas significativas. Quando os valores elevados persistem, normalmente refletem a presença de

infecção não controlada (ROCHE, BRAHMS.CRP). Surge na corrente sanguínea, em casos de inflamação pós-operatória (Heredia-Rodríguez *et al.*, 2017) como por exemplo, em casos de cancro e em cirurgias de excertos da medula óssea (Lyu *et al.*, 2013). Este biomarcador é altamente referenciado pela sua elevada sensibilidade na fase aguda, uma vez que as concentrações séricas estão proporcionalmente correlacionadas com a inflamação sistémica (Lyu *et al.*, 2013; Ríos-Toro *et al.*, 2017).

Tendo em conta que este biomarcador é dos mais utilizados na área da patologia clínica, têm de ser consideradas as suas vantagens, nomeadamente o facto de a sua determinação ser um processo fácil e de custo reduzido. Para além disso, contribui para o diagnóstico, controlo terapêutico e acompanha a evolução de diversas patologias, uma vez que se trata de um indicador precoce e sensível de processos inflamatórios e infecciosos (Gao *et al.*, 2017; Slade *et al.*, 2000). É também útil para a deteção da sepsis neonatal, durante as primeiras 24 horas de vida, uma vez que possui uma elevada sensibilidade neste cenário (10aixe t *al.*, 2013).

Após a descoberta de outros biomarcadores, verificou-se que a CRP, para além de uma reduzida especificidade para a sepsis, não tem a capacidade de distinção da resposta inflamatória bacteriana ou não bacteriana, sendo, portanto, uma grande limitação na sua utilização, passando-se a dar mais importância a outros biomarcadores, tal como a PCT (Gao *et al.*, 2017; Riedel, 2012).

1.3.3. Procalcitonina

Desde o ano de 1990, investigadores científicos ao realizar estudos em doentes com infeção bacteriana detetaram níveis elevados de PCT na corrente sanguínea. Desde então, foi considerado um potencial biomarcador da sepsis. Em 2003, foi relevante mencionar na definição da sepsis, o aumento dos níveis séricos de PCT, o que demonstra ser um biomarcador recente na comunidade científica (10aixe t *al.*, 2013).

A PCT é uma glicoproteína precursora da calcitonina constituída por uma sequência de 116 resíduos de aminoácidos (Becker *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017^a) e com peso molecular de aproximadamente 13 kDa (Suwen *et al.*, 2013). Através da hidrólise, catalisada por uma dipeptidil peptidase, ocorre a remoção de um dipéptido no terminal -amino, resultando numa sequência de 114 resíduos de aminoácidos (ROCHE, BRAHMS.PCT). Depois de ocorrer a tradução (mRNA), a cadeia polipeptídica da PCT pode ser fragmentada em três polipéptidos com menor dimensão originando: a aminoprocitonina (N- terminal) que apresenta 57 aminoácidos, a calcitonina imatura na região central que irá originar calcitonina madura com

32 aminoácidos e um carboxipeptído com 21 aminoácidos (catalcalcina), como se pode visualizar na figura 2 (Becker *et al.*, 2010).

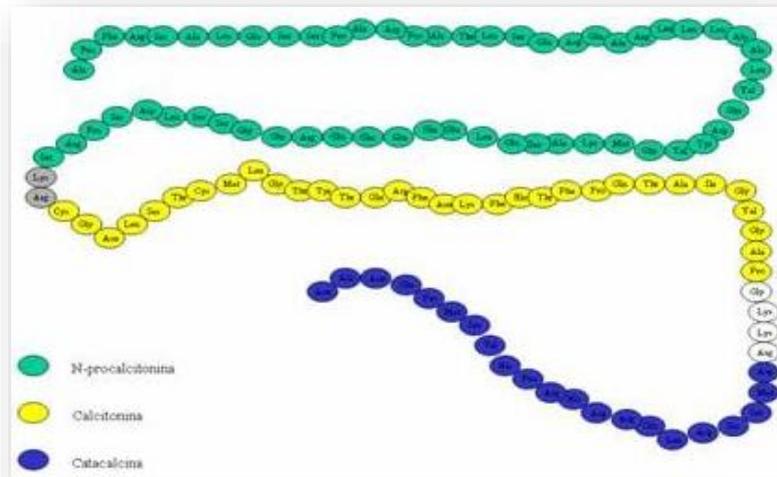


Figura 2- Representação da estrutura primária da PCT com os locais de fragmentação em polipéptidos.

(Adaptado: www.wikilingue)

A calcitonina é produzida através do gene CALC-1, que se encontra no cromossoma 11 do cariótipo humano. É uma hormona que está envolvida na regulação metabólica do cálcio e do fosfato (Soreng *et al.*, 2011). Os polipéptidos precursores de calcitonina, inclusive as duas formas da PCT (catalcalcina e N- procalcitonina) podem ser encontrados no soro dos doentes (Christ-Crain *et al.*, 2005).

A procalcitonina é produzida principalmente nas células neuroendócrinas, mais precisamente nas células C da tiróide, células endócrinas pulmonares, macrófagos e pâncreas, e processada/ armazenada no complexo de golgi antes da sua secreção regulada (Becker *et al.*, 2010; Bode-Jänisch *et al.*, 2013; Christ-Crain *et al.*, 2005; Soreng *et al.*, 2011). Durante o período da infeção sistémica (sepsis), expressão génica do gene CALC-I é regulada positivamente e secretada por todos os tecidos e tipos de células (Riedel *et al.*, 2012).

Em condições normais, a PCT encontra-se na corrente sanguínea em concentrações reduzidas (0,046 ng/mL) (Becker *et al.*, 2010; Christ-Crain *et al.*, 2005). O valor obtido nas análises efetuadas aos níveis séricos da CRP deve estar compreendido entre 0,02-100 ng/mL definido pelo limite de deteção e pelo limite máximo de concentração de PCT detetada na corrente sanguínea (*cut-off* teórico). Este valor está de acordo com o descrito na literatura (tabela 3).

Tabela 3- Intervalos de concentração sérica de PCT em situações normais no ser humano, presentes na literatura.

Literatura	Concentração sérica da PCT
(Soreng <i>et al.</i> , 2011)	<0.02 ng/ ml
(Riedel <i>et al.</i> , 2012)	0.033 ng/ml
(Carrol <i>et al.</i> , 2002)	<0.1 ng/ml
(Vijayan <i>et al.</i> , 2017)	0.05 ng/ml
(Uusitalo-Seppälä <i>et al.</i> , 2011)	0.02-165.16 ng/ml

No ambiente hospitalar, os níveis séricos da PCT devem ser considerados da seguinte forma:

- Quando < 0,5 ng/mL representam baixo risco de sepsis grave e/ou choque séptico (Suwen *et al.*, 2013);
- Quando > 2,0 ng/mL representam elevado risco de sepsis grave e /ou choque séptico.

O aumento da produção e libertação de PCT na corrente sanguínea é estimulado em resposta a infeções sistémicas de origem bacteriana, o mesmo não se verifica no caso de infeções bacterianas localizadas, infeções virais, infeções fúngicas, desordens auto-imunes e reações alérgicas (Bode-Jänich *et al.*, 2013).

Segundo estudos realizados por Becker *et al.*, (2010), ao administrar endotoxinas em voluntários com o objetivo de padronizar os efeitos do aumento das citocinas pró-inflamatórias, a PCT na corrente sanguínea surge após 3-4 horas atingindo o pico máximo de concentração em 24 horas. Os níveis séricos da PCT diminuem em simultâneo com a diminuição da gravidade da infeção bacteriana, não sendo, portanto, um efeito imediato (Suwen *et al.*, 2013). Quando a diminuição da concentração sérica da PCT se verifica no intervalo de 48 horas após o tratamento, é considerado um resultado clínico favorável (Matwiyoff *et al.*, 2012). Pode-se

afirmar que a PCT é um biomarcador sensível e específico para a deteção da sepsis (Suwen *et al.*, 2013), manifestando-se com o aumento imediato dos níveis séricos da PCT na fase aguda (Zhang *et al.*, 2017a).

A PCT, não só apresenta um forte potencial como biomarcador de infeção, como também tem um papel importante na orientação da duração da terapia antibiótica (Matwiyoff *et al.*, 2012). Segundo Vijayan *et al.*, (2017), com a utilização deste biomarcador para diagnóstico, foi possível obter uma diminuição drástica do tempo de internamento hospitalar dos doentes, assim como o número de hemoculturas realizadas.

Para além da sepsis, existem outras causas para o aumento da concentração sérica da PCT, nomeadamente: a submissão do doente a uma cirurgia, transplantação de órgãos, trauma e queimaduras. Em ambiente hospitalar, se os valores de PCT forem superiores a 10 ng/mL, sugere a presença da sepsis e, desta forma, é possível diferenciar a sepsis das situações anteriormente descritas (Bode-Jänich *et al.*, 2013).

A utilização da PCT na deteção da sepsis mostrou ter inúmeras vantagens, nomeadamente a sua deteção precoce e o auxílio no diagnóstico e prognóstico desta doença. A PCT é atualmente o biomarcador mais utilizado nesta situação, comparativamente a outros biomarcadores. É uma ferramenta fundamental para a terapia antibiótica, promovendo uma redução significativa da prescrição desnecessária de antibióticos (Vijayan *et al.*, 2017). Segundo Woodhead *et al.*, (2005), a PCT é dos biomarcadores com mais utilidade na avaliação de prognóstico de processos inflamatórios com etiologia bacteriana e não bacteriana.

Relativamente à quantificação dos níveis séricos da PCT, é necessária a utilização de soluções de calibração e controlos de qualidade específicos e exclusivos, o que faz com que seja um processo mais dispendioso (May *et al.*, 2007). Em casos de sepsis prolongada, a influência da PCT no prognóstico não será muito relevante, uma vez que não responde de imediato à aplicação da terapia antibiótica (Yu *et al.*, 2017). Segundo estudos realizados por Lisboa *et al.*, (2018), em casos mais específicos como de pneumonia, a PCT tem demonstrado que não é o marcador ideal, uma vez que apresenta elevada taxa de falsos negativos. Assim como, em casos de lesão renal e transplantados em que os níveis séricos da PCT são alterados, podendo interferir no diagnóstico.

1.4.Objetivos

Tendo em consideração a importância da PCT e da CRP como biomarcadores para diagnosticar a sepsis, torna-se relevante tomar conhecimento das particularidades destes marcadores bioquímicos e a sua utilidade na área da medicina hospitalar. Assim, este projeto de investigação tem como objetivo:

- Realizar um estudo generalizado acerca dos doentes que efetuaram análises à PCT e CRP, considerando diferentes faixas etárias, unidades de serviço e diagnósticos associados, de modo a se ter perceção das situações em que estas análises são prescritas para além da sepsis;
- Realizar um estudo específico acerca dos níveis séricos de PCT e CRP em doentes internados na UCIP do CHTMAD, com idade superior a 65 anos diagnosticados com infeção bacteriana, no ano de 2016 e 2017;
- Comparar o intervalo de *cut-off* dos biomarcadores, PTC e CRP, fornecido pelo fornecedor (ROCHE®), com o obtido no estudo em doentes internados na UCIP do CHTMAD, com idade superior a 65 anos diagnosticados com infeção bacteriana, no ano de 2016 e 2017;
- Calcular o índice K para avaliar o nível de concordância do uso simultâneo dos biomarcadores, PTC e CRP, no diagnóstico da sepsis.



Capítulo 2- Materiais e métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem

Para o desenvolvimento deste trabalho foi necessária a aprovação da comissão de ética do CHTMAD, a qual foi aceite.

A amostragem deste estudo compreende os doentes que deram entrada nas várias unidades de internamento e no serviço de urgência do CHTMAD, nos anos 2016 e 2017. Foram consideradas três faixas etárias dos doentes em estudo: 0-18; 19-65 e mais de 65 anos.

2.2. Variáveis estudadas

A recolha dos dados para este estudo foi efetuada através do programa informático utilizado pelo CHTMAD. As variáveis em estudo são:

- Idade;
- Sexo;
- Unidade de serviço;
- Resultado das análises dos biomarcadores, PTC e CRP (um episódio por doente);
- Agente infeccioso;
- Diagnóstico;
- Prognóstico (“favorável” / “não favorável”);
- Estado final (alta hospitalar / morte).

2.3. Determinação por COBAS 6000®

Os aparelhos disponíveis no laboratório de patologia clínica do CHTMAD para a realização das análises bioquímicas, foram fornecidos pela empresa ROCHE® assim como todos as soluções. Existem três aparelhos para a realização das análises bioquímicas: o COBAS 6000®, COBAS MODULAR® e o COBAS INTEGRA 400®. A quantificação da PCT e da CRP, foram efetuadas em simultâneo no analisador COBAS 6000®.

O aparelho COBAS 6000® é constituído por três módulos: o ISE, o módulo C501 e o módulo E601 (figura 3). Os módulos são controlados por *software*, que permitem a realização análises bioquímicas e imunoensaios. Efetua determinações qualitativas e quantitativas *in vitro* usando testes específicos e gerais para a análise, 24 horas por dia. No hospital é utilizado como

amostra o soro, plasma, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR), para a quantificação dos parâmetros.

O COBAS 6000[®] é:

- Automatizado;
- Modular;
- Computadorizado.



Figura 3- Aparelho COBAS 6000[®].

(Adaptado: ROCHE Diagnostics Lda.)

O Módulo ISE realiza testes seletivos para iões, com um método eletrónico inserido para analisar amostras com sódio, potássio e cloro. Este módulo tem a capacidade de realizar 900 testes por hora.

O Módulo C501 realiza análises potenciométricas e fotométricas. Este módulo é destinado à realização de 800 testes *in vitro* de análises da química geral, inclusive a CRP. A quantificação dos parâmetros procede-se através do ensaio imunoturbidimétrico e a deteção pelo fotómetro.

O Módulo E601 está destinado à quantificação de marcadores cardíacos, hormonas, inclusive a PCT. É um sistema de imunoensaios multi-teste para a deteção de anticorpos específicos, com capacidade de realizar 170 testes por hora. A quantificação dos parâmetros efetua-se através da técnica *sandwich* e a deteção por eletroquimioluminescência.

2.3.1. Soluções de calibração e de controlo de qualidade

2.3.1.1. Constituintes

Solução de calibração

Para a calibração da CPR foi utilizado a solução *C.f.a.s. Proteins* (Calibrator for automated systems) no estado líquido, constituído por soro humano específico para proteínas com concentrações ajustadas de forma a garantir uma calibração ótima dos métodos de quantificação disponíveis nos aparelhos sugeridos pela ROCHE®. Esta solução de calibração contém componentes reativos e não reativos, descritos na tabela seguinte (tabela 4).

Tabela 4- Constituintes da solução de calibração da CRP.

Componentes	Analito	Origem
Reativos	Ferritina	Humana
	CRP	Humana
	ASLO	Ovelha
Não reativo	Conservantes	-----
	Estabilizador	-----

Depois de aberta, a solução *C.f.a.s. Proteins* tem durabilidade de 4 semanas, se colocada a uma temperatura entre 2-8°C e desprovida de contaminação bacteriana.

Para efetuar a calibração da PCT, utilizou-se a solução *PCT Cal1* constituída por PCT recombinante com uma concentração de 10 ng/mL numa matriz de soro humano com conservante; e a solução *PCT Cal2* constituída por PCT recombinante com concentração de 54 ng/mL numa matriz de soro humano e conservante.

Solução de controlo de qualidade

Para realizar o controlo de qualidade da CRP foram utilizadas duas soluções com matriz de soro humano, *Autonorm Human Liquid L-1* (nível 1: não patológico) e *Autonorm Human Liquid L-2* (nível 2: patológico), ambas no estado líquido e têm de estar na câmara frigorífica a uma temperatura compreendida entre 2-8°C.

Uma vez descongelados e abertos, as soluções de controlo de qualidade permanecem estáveis durante 14 dias, se guardados bem fechados no recipiente original. Os recipientes foram distribuídos por alíquotas e congelados em 30 minutos a uma temperatura $< -20^{\circ}\text{C}$ em tubos com tampa de enroscar com vedação mantendo-se estáveis durante um mês. Estas soluções devem ser descartadas após cada utilização. Para cada solução (nível 1 e nível 2), não foram estabelecidos valores de referência, sendo estes valores estabelecidos pelo laboratório de patologia clínica do CHTMAD, com posterior validação da empresa (Bioportugal, Químico, Farmacêutico, Lda). Relativamente à composição específica das soluções de controlo de qualidade, estas são reservadas ao meio profissional interno da empresa.

Foram utilizadas duas soluções de controlos de qualidade para a PCT: a solução de nível 1 (*Low*), corresponde ao nível não patológico, e o controlo de nível 2 (*High*), corresponde ao nível patológico. A solução de nível 1, *PC PCT1* é composta por PCT recombinante com concentração de 0,50 ng/mL, numa matriz de soro humano com conservante. Por sua vez, na solução de nível 2, *PC PCT2* é composta por PCT recombinante com concentração de 10 ng/mL numa matriz de soro humano e conservante. Ambas as soluções devem ser reconstituídas individualmente, pelo menos uma vez em 24 horas na rotina laboratorial. O valor obtido no controlo de qualidade deve de estar próximo de 0,485 ng/mL e estar compreendido no intervalo definido por $0,485 \pm 3$ ng/mL.

2.3.1.2. Preparação

As soluções de calibração e controlo de qualidade são fornecidas pela ROCHE® em estado líquido ou liofilizado. São armazenados a uma temperatura entre $2-8^{\circ}\text{C}$, podendo ser utilizados/ reconstituídas até ao fim de prazo de validade indicado no lote.

No caso da PCT, quer a solução de calibração, quer as soluções do controlo de qualidade são específicos para este biomarcador. Ambas se encontram armazenados na arca refrigeradora na forma de liofilizado. Para a CRP, a solução de calibração já se encontra no estado líquido (pronta a ser utilizada) mas as soluções de controlo de qualidade têm de ser reconstituídas.

Antes da utilização de qualquer solução de calibração e de controlo de qualidade, o número de lote é inserido no programa informático e devidamente instalado. No caso de a solução não se encontrar pronta para utilização, então terá de ser reconstituída. O liofilizado é hidratado com água destilada e desionizado e deixado a repousar durante 30 minutos. O volume da água utilizada para a reconstituição do liofilizado das soluções depende da capacidade do recipiente e do que é recomendado pelo fornecedor. Em cada utilização deve de ser controlado

o tempo (mínimo duas horas) no analisador, para assim garantir a sua estabilidade à temperatura ambiente.

Após a reconstituição das soluções, são pipetados volumes equivalentes em alíquotas para vários *cups* rotulados com códigos fornecidos pelo fornecedor (ROCHE®) e armazenados a uma temperatura de -20°C. Como são congelados, cada *cup* pode ser utilizado duas vezes

2.3.2. Calibração

A calibração é um processo que estabelece uma relação linear entre valores medidos e os resultados obtidos pelo aparelho (ROCHE Diagnostics Lda).

É necessária a repetição do processo de calibração para a mesma solução quando: os valores obtidos da solução de controlo de qualidade não estão compreendidos no intervalo de validação considerado; existem poucos testes disponíveis no *rackpack* do biomarcador; o reagente for de um lote novo e quando o *software* o solicite. Na prática laboratorial, quando o número de testes disponíveis no *rackpack* é consideravelmente reduzido, não se procede a uma última calibração pelo facto do reagente já se encontrar aberto e em utilização a um longo período de tempo promovendo instabilidade total na (ROCHE Diagnostics Lda).

Depois de realizada a calibração, esta é validada através do *software* com verificações automáticas de validação. No caso de ser detetada uma condição ou um resultado irregular ocorre uma falha na calibração. Quando ocorre uma falha no processo de calibração, o aparelho desperta um alarme de modo a sinalizar que é necessária uma repetição. Esta falha pode ter várias origens, nomeadamente:

- Introdução de um reagente com um lote novo no analisador e não ter sido inserido corretamente no sistema informático;
- Reconstituição da solução de calibração mal executada;
- Desempenho diminuído das agulhas de pipetagem do aparelho;
- Troca de posições na *rack* indicada, antes de ser introduzida no analisador pelo técnico (ROCHE®).

2.3.3. Controlo de qualidade

O controlo de qualidade tem como função verificar e assegurar que as soluções estão de acordo com os padrões de qualidade exigidos. Segundo a ROCHE® esta prática deve ser diária e repetida em todas as mudanças de turno efetuadas no laboratório de patologia clínica do

CHTMAD. Este processo é validado através de cartas, designadas por cartas de controlo, que correspondem a gráficos relativos aos valores obtidos pela análise às soluções de controlo de qualidade de cada biomarcador, efetuadas e fornecidas automaticamente pelo *software*. Através desses gráficos é possível verificar se os valores obtidos estão dentro do intervalo aceite pelo laboratório de patologia clínica do CHTMAD. Os valores obtidos são aceites se estiverem compreendidos no intervalo de referência estabelecido pelo fornecedor (ROCHE®), sendo aceites até \pm dois desvios padrão do valor referência (intervalo de referência).

Se o valor permanecer fora do intervalo de referência, o controlo de qualidade deverá ser repetido, colocando-se a *rack* no aparelho novamente. Esta falha do processo de calibração, pode ter várias origens:

- Solução de controlo expirado;
- Solução de controlo mal homogeneizado;
- Solução de controlo a terminar;
- Falha na linha das *racks*;
- Interferência de um magnete;
- Falha na pipetagem;
- *Rackpack* do reagente a acabar;
- Introdução de *Rackpack* de reagente novo;
- Origem desconhecida.

Para solucionar estes inconvenientes, procede-se à repetição do controlo de qualidade, se possível com novos reagentes (ROCHE Diagnostics, Lda).

2.3.4. Preparação da amostra

A quantificação da PCR e CRP foi determinada através de uma amostra de sangue, mais especificamente através do soro ou do plasma. A colheita do sangue nos doentes do CHTMAD foi realizada em espaços e temperaturas controladas. No momento da colheita os doentes encontravam em jejum. Após a colheita, a amostra foi entregue ao serviço de patologia clínica e integrada na plataforma informática CLINIDATA XXI, pertencente à empresa MAXDATA que possui um registo histórico de cada doente adquirido pelo CHTMAD.

O sangue foi colhido para diferentes tubos dependendo do seu destino. Para obter o soro, o sangue foi colhido para um tubo com gel separador e para obter o plasma, um tubo com heparina-lítio. Após a colheita a amostra foi deixada a repousar cerca de 10 minutos, para

ocorrer a retração do coágulo. Seguidamente, foi centrifugada a 4500 rpm, durante 10 minutos. E por fim, colocaram-se as amostras nas respectivas *racks* no analisador para se iniciar a análise. Se, por algum motivo, a amostra não pudesse ser analisada no próprio dia da colheita, esta era armazenada em câmara fria (2-8°C). Relativamente à PCT e à CRP, como são considerados parâmetros de urgência, eram quantificados após a sua receção no laboratório.

Fatores como a icterícia, hemólise, lipidémia e a biotina em quantidades excessivas, podem corresponder a possíveis interferências na análise de qualquer parâmetro (inclusive a PTC e CRP). Desta forma, devem-se ter alguns cuidados na recolha da amostra, como por exemplo, ter em atenção os doentes em tratamento de doses elevadas de biotina e colher o sangue de forma cuidada.

2.3.5. Quantificação da Proteína C reativa

2.3.5.1. Constituição da *rackpack*

Para a quantificação da CRP é necessária a adição da *rackpack* correspondente a este parâmetro (CRP) no analisador. Segundo as instruções do fabricante (ROCHE®), as soluções de trabalho da constituição do *rackpack* são: o R1, o tampão TRIS (Tris(hidroximetil)-aminometano) com albumina de soro bovino e conservantes e o R2, um conjunto de partículas de látex revestidas com anticorpos anti-CRP de rato em tampão de glicina, imunoglobulinas de rato e conservante.

2.3.5.2. Princípio do método de quantificação de CRP

Os níveis séricos de CRP são mensurados no módulo C 601 no aparelho COBAS 6000®.

A determinação quantitativa *in vitro* da concentração sérica de CRP na amostra realiza-se através de um ensaio imunoturbidimétrico com intensificação da reação por partículas. O processo inicia-se com a CRP da amostra a aglutinar-se com as partículas de látex revestidas em anticorpos monoclonais anti-CRP. Posteriormente, o agregado é determinado turbidimetricamente, ou seja, a quantificação é realizada através da turbidez da amostra provocada pela agregação (imunoprecipitação) e medida por espectrofotometria, a 540 nm.

A reação de imunoprecipitação dá-se quando um antigénio proteico solúvel se combina com um anticorpo do soro/plasma, formando-se um complexo antigénio-anticorpo insolúvel, que corresponde ao precipitado (Okomura *et al.*, 1990). Ao incidir o feixe de luz na solução contendo partículas em suspensão, vai seguir-se uma dispersão em todas as direções que irá ser mensurada em qualquer ângulo (Hanson, 1997). A técnica de imunoturbidimetria é um ensaio

imunológico baseado na reação de imunoprecipitação e na dispersão de luz, com o objetivo de quantificar os antígenos presentes no soro/plasma. Uma vez que existe uma relação diretamente proporcional entre a absorvância e a concentração sérica da CRP na amostra, o valor obtido da absorvância é o parâmetro utilizado para calcular a concentração de CRP (Friedman *et al.*, 1997). É uma técnica muito utilizada em laboratórios devido as suas vantagens de: precisão, estabilidade, reprodutibilidade e de custo reduzido (Póvoa, 2002). Segundo Gao *et al.*, (2017), nos últimos anos a utilização da técnica imunoturbidimétrica tem contribuído para uma quantificação com maior sensibilidade e precisão, mesmo em concentrações séricas reduzidas.

No entanto, existem situações em que a quantificação da CRP é limitada, como no caso de detecção de anticorpos em elevadas concentrações na amostra (efeito pró-zona). Nestas condições não ocorrerá a aglutinação, havendo a necessidade de se efetuar uma maior diluição do soro/plasma (Young *et al.*, 1972).

2.3.6. Quantificação da Procalcitonina

2.3.6.1. Constituição da *rackpack*

Para a quantificação da concentração sérica da PCT foi adicionada no analisador a *rackpack* correspondente ao biomarcador. Segundo as instruções do fabricante, o *rackpack* de reagentes da PCT é constituído por: reagente M, composto por micropartículas revestidas de estreptavidina (0,72 mg/mL) e conservante; reagente R1, composto por anticorpo monoclonal biotilado anti-PCT de rato (2,0 µg/mL), tampão fosfato (95 mmol/L) a pH 7,5 e conservante, e o reagente R2, composto por anticorpo monoclonal anti-PCT de rato, marcado com complexo de ruténio (5,6 µg/mL) no mesmo tampão fosfato e conservante.

2.3.6.2. Princípio do método de quantificação da PCT

Os níveis séricos da PCT são quantificados através da técnica de *sandwich*. O procedimento deste método tem duração de 18 minutos. O processo inicia com a primeira incubação, em que o antígeno presente da amostra, o anticorpo monoclonal biotilado específico de PCT e um anticorpo monoclonal específico de PCT marcado com um complexo de ruténio reagem entre si e formam um complexo *sandwich*. Seguidamente, ocorre a segunda incubação, em que são adicionadas micropartículas revestidas de estreptavidina formando um complexo. O complexo formado liga-se à fase sólida através da interação da biotina e da estreptavidina. A solução resultante desta reação é aspirada para a célula de leitura, onde as

micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo (figura 4). Os elementos não ligados são removidos com a solução Procell/Procell M. Por fim, ocorre a aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo com emissão quimioluminescente mensurada pelo fotomultiplicador.

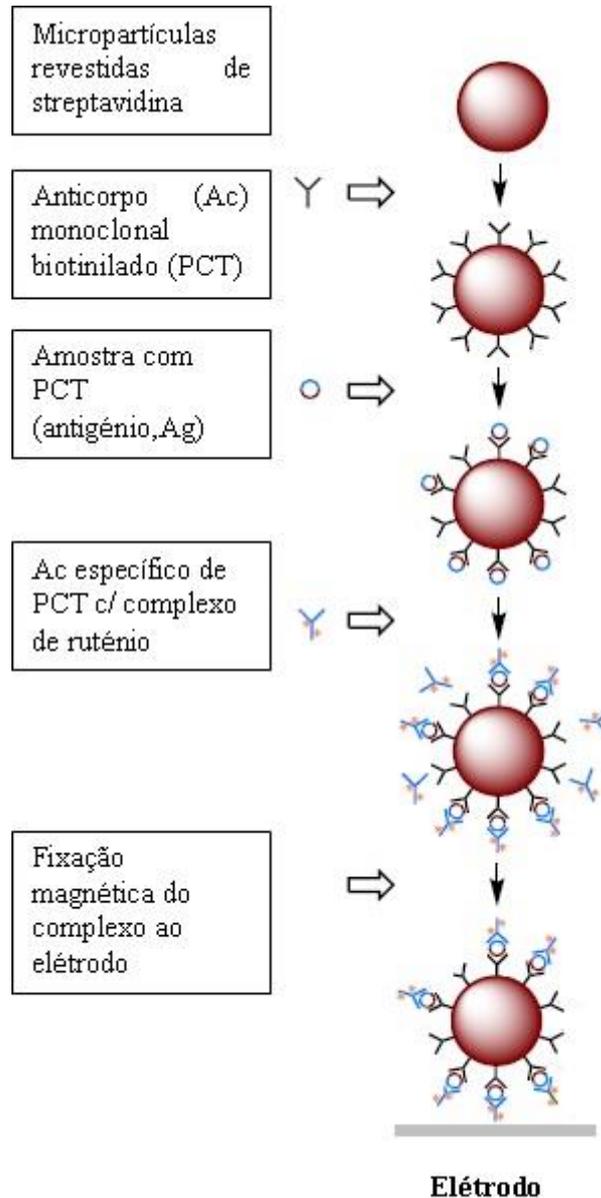


Figura 4- Esquema ilustrativo das incubações realizadas no COBAS 6000® para a quantificação da PCT (Adaptado: Zhou *et al.*, 2018)

Esta técnica baseia-se na emissão de eletroquimioluminescência na zona do visível do espectro produzida pelos estados excitados durante reações rápidas e exotérmicas com transferência de elétrons entre espécies altamente oxidantes e redutoras (Ludvik, 2011).

Inicialmente ocorre uma reação de transformação de energia luminosa em energia química, processo denominado quimioluminescência. Seguidamente, ocorre uma reação eletroquímica com a passagem de energia química em energia elétrica, dando origem a radicais de iões extremamente reativos (Ludvik, 2011). A eletroquimioluminescência é dos métodos mais utilizados para a quantificação de vários parâmetros em níveis séricos, devido à elevada precisão, fiabilidade e fácil execução. Para além disso, utiliza um volume reduzido de amostra e oferece um intervalo de quantificação amplo. Em contrapartida, é um método dispendioso (Schietecatte *et al.*, 2016).



Capítulo 3- Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise geral dos doentes

No presente trabalho, como já foi referido foram analisados dados acerca de doentes que deram entrada no CHTMAD, aos quais foram prescritas análises da PCT e CRP para a deteção de infeções bacterianas.

A prioridade deste estudo foram os doentes diagnosticados com septicémia, SIRS e choque séptico. Após a entrada dos doentes no CHTMAD os que carecerem de internamento, foram encaminhados para uma unidade de serviço interna. Após a apreciação do estado do doente foram prescritas análises adaptadas a cada situação, sendo que em caso de suspeita de infeção ou inflamação, a PCT e a CRP são solicitadas de imediato.

No ano de 2016, deram entrada no CHTMAD 1035 doentes foram prescritos com análises da PCT e CRP para a deteção de infeções bacterianas, dos quais 181 (17,4%) pertencem à faixa etária dos 0-18 anos, 345 (33,3%) dos 19-65 anos e 510 (49,3%) correspondem aos doentes com mais de 65 anos (figura 5).

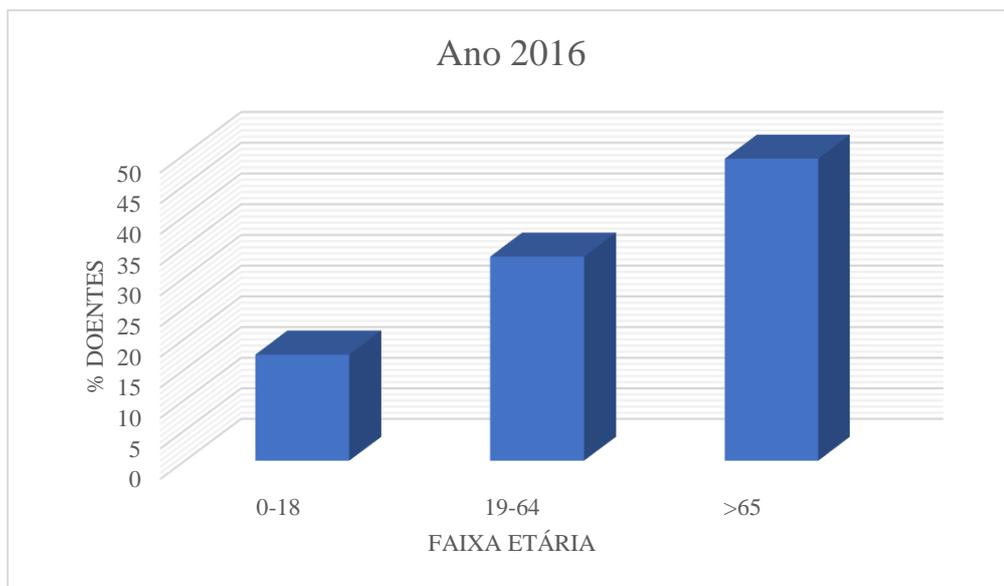


Figura 5- Distribuição percentual dos doentes de cada faixa etária que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP no ano de 2016.

No ano de 2017, deram entrada no CHTMAD 1079 doentes, dos quais 183 (17,0%) pertencem à faixa etária dos 0-18 anos, 326 (30,2%) à faixa etária dos 19-65 anos, e 570 (52,8%) com mais de 65 anos (figura 6).

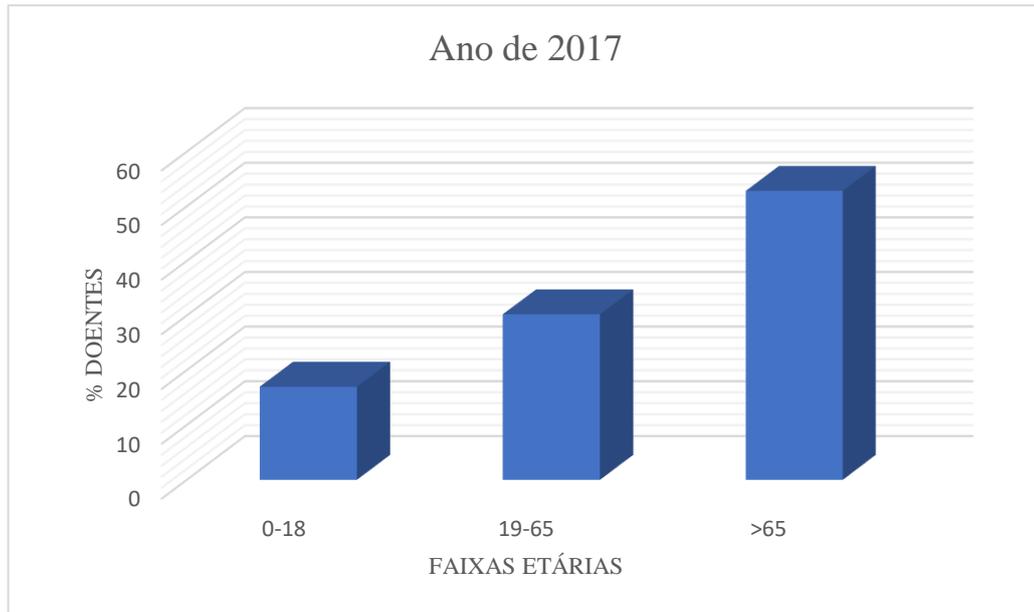


Figura 6- Distribuição percentual dos doentes de cada faixa etária que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP no ano de 2017.

Através dos dados anteriormente expostos, verifica-se um aumento do número de doentes que deram entrada no CHTMAD e que realizaram análises aos biomarcadores PCT e CRP no ano de 2017 relativamente ao ano de 2016. Para além disso, verifica-se um valor discrepante do número de doentes nas diferentes faixas etárias. Tanto no ano de 2016 como no ano de 2017, a faixa etária dos doentes com idade superior a 65 anos representou cerca de metade do número total de doentes.

3.1.1. Unidades de serviço

3.1.1.1. Doentes da faixa etária: 0-18 anos

No ano de 2016, verificou-se que a unidade de Neonatologia apresentou a maior percentagem de doentes que realizaram análises aos biomarcadores, com cerca de 37%. Seguindo-se as unidades de Pediatria e do Berçário ambas com cerca de 29% dos doentes (figura 7).

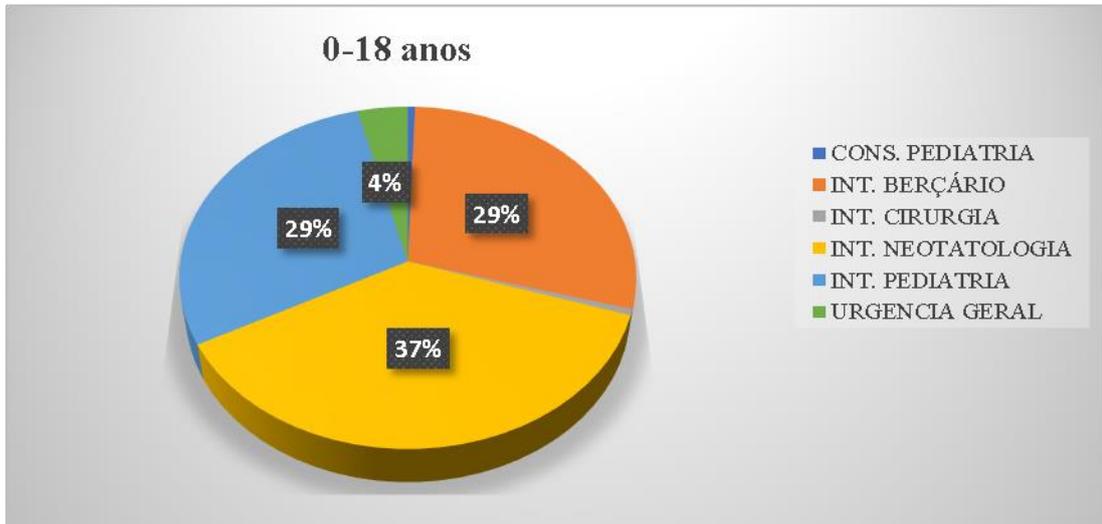


Figura 7- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idade inferior ou igual a 18 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2016.

No ano de 2017, a unidade com maior percentagem de doentes que efetuaram análises aos biomarcadores em estudo foi a unidade do Berçário, com cerca de 43%. Seguindo-se as unidades de Neonatologia e de Urgência Geral, com cerca de 35% e 17%, respetivamente (figura 8).

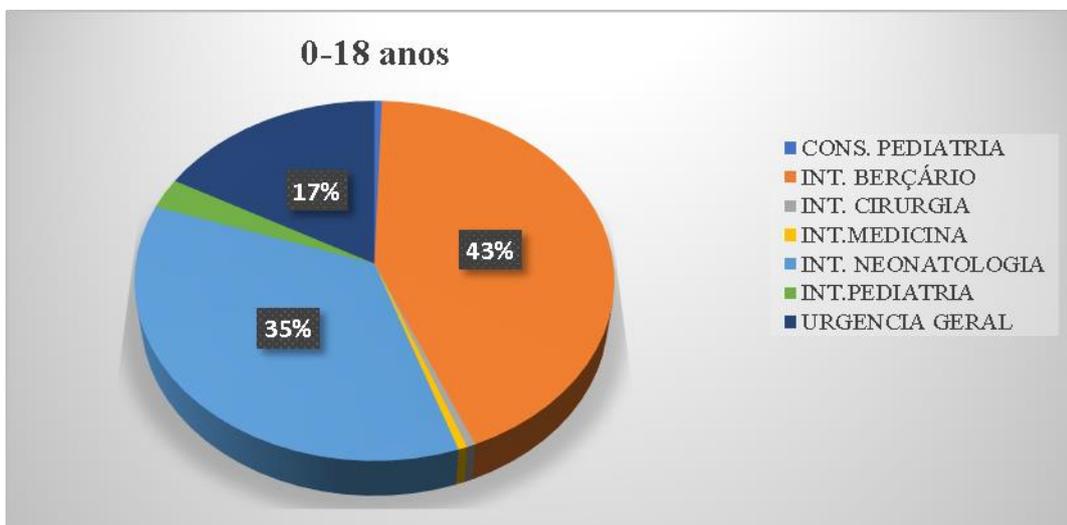


Figura 8- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idade inferior ou igual a 18 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2017.

Após a análise dos dados obtidos, verificou-se um aumento significativo da percentagem de doentes internados na unidade do Berçário, que realizaram análises aos biomarcadores em estudo, do ano de 2016 comparativamente ao ano de 2017. Relativamente à percentagem de

doentes internados na unidade de Neonatologia não se verificam alterações significativas, apresentando percentagens semelhantes.

3.1.1.2. Doentes da faixa etária: 19-65 anos

Relativamente à faixa etária dos 19 aos 65 anos, verificou-se um aumento significativo da quantidade de unidades de serviço que prescreveram análises de PCT e CRP. Nomeadamente, vinte e uma unidades de serviço no ano de 2016, e vinte no ano de 2017.

Verificou-se que nesta faixa etária em 2016, a UCIP foi a unidade com maior percentagem de doentes a quem foi requerida a análise quantitativa da PCT e CRP, com cerca de 39%. Seguidamente, a unidade de Internamento de Cirurgia com cerca de 19%, e a Urgência Geral com 14% dos doentes.

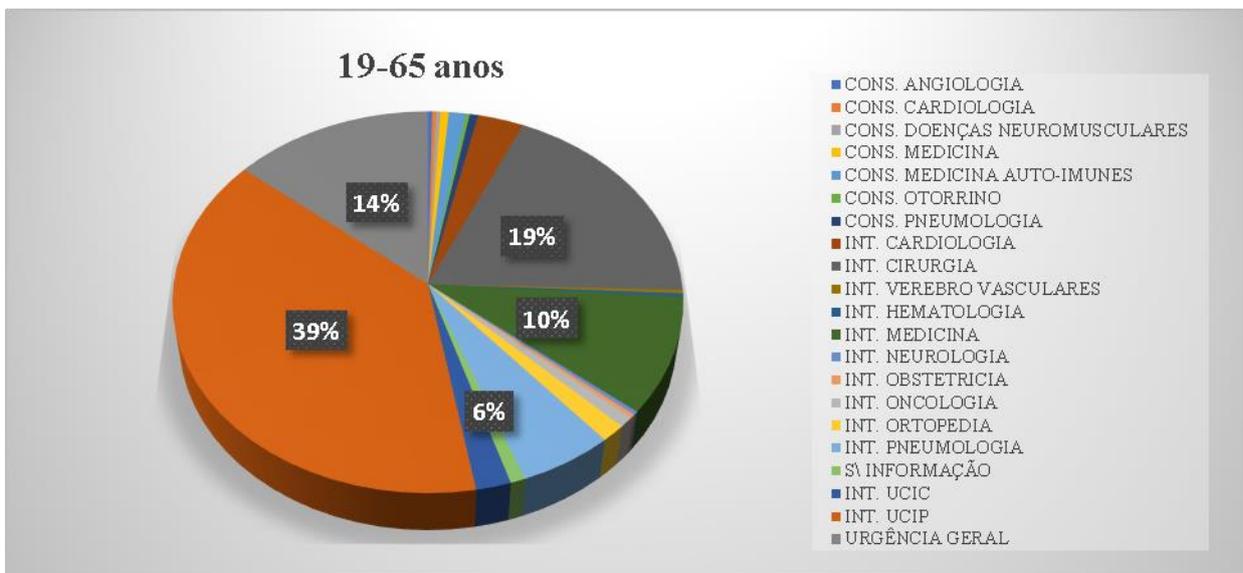


Figura 9- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idades entre 19-65 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2016.

No ano de 2017, a unidade com maior percentagem de doentes foi a UCIP (34%). Seguidamente, a Urgência Geral com cerca de 19% e a unidade de Medicina Interna com cerca de 15% (figura 10).

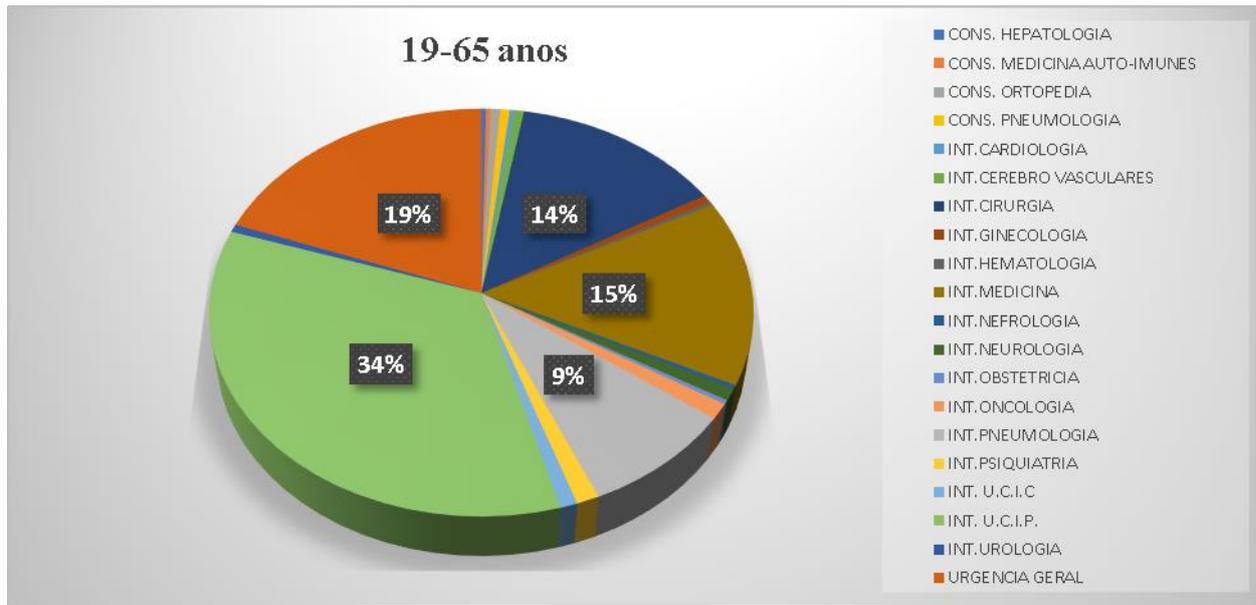


Figura 10- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idades entre 19-65 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2017.

Na faixa etária dos 19-65 anos, a unidade com maior percentagem de doentes com prescrição das análises à PCT e CRP foi a UCIP quer no ano de 2016, quer no ano de 2017, com uma percentagem muito superior às restantes unidades de serviço mencionadas.

3.1.1.3. Doentes da faixa etária: superior a 65 anos

No ano de 2016, as unidades com maior percentagem de doentes em estudo foram a UCIP e a unidade de Cirurgia, com percentagens muito próximas, 28% e 24%, respetivamente. Seguidamente, a unidade de Medicina Interna com cerca de 18% (figura 11).

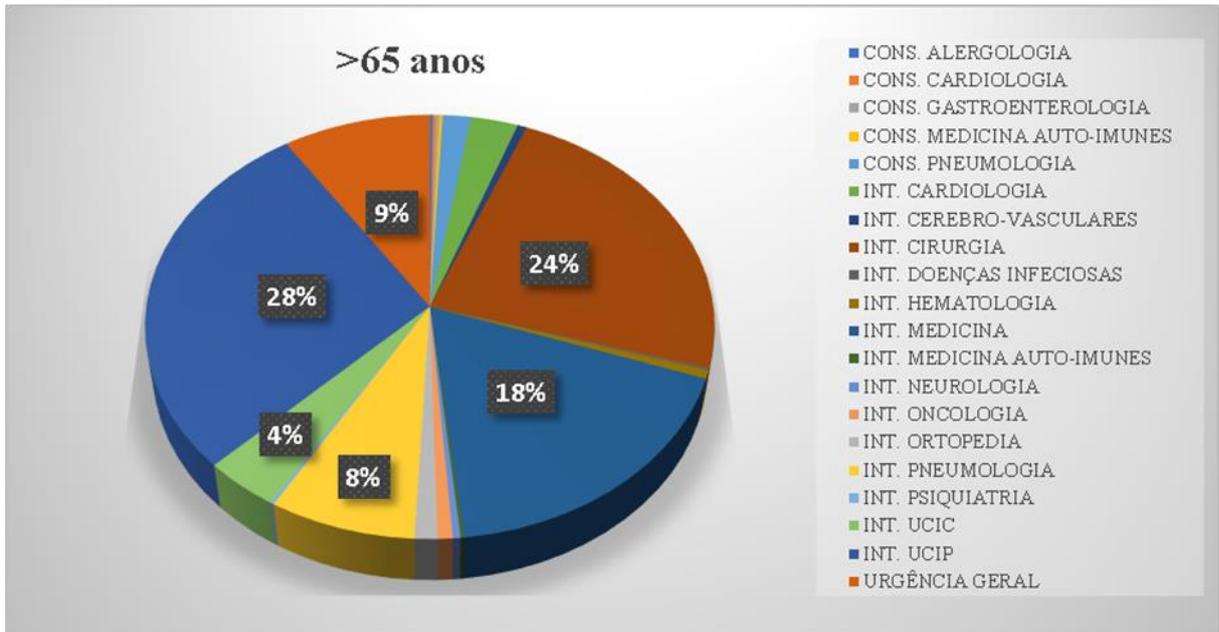


Figura 11- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idades superior a 65 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2016.

No ano de 2017, as unidades de serviço que mais prescreveram análises à PCT e CRP foi a UCIP com cerca de 25% dos doentes e unidade de internamento em Medicina com cerca de 24 % dos doentes, respetivamente. Seguidamente, a Urgência Geral com cerca de 20% (figura 12).

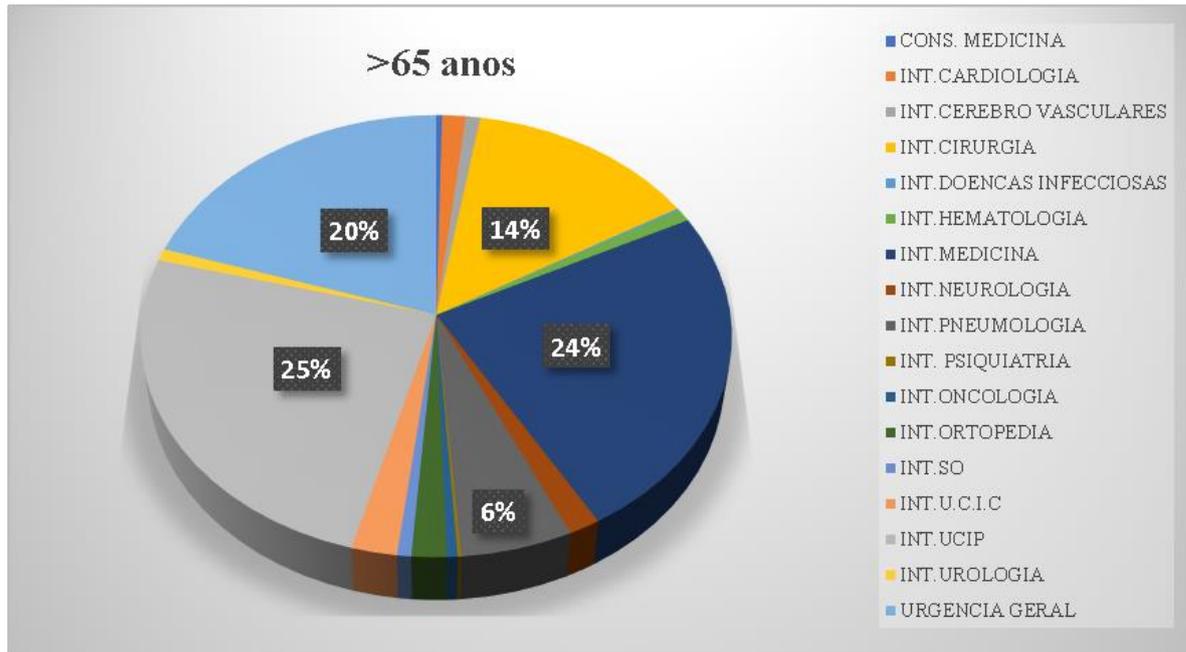


Figura 12- Distribuição percentual dos serviços com maior número de doentes, com idades superior a 65 anos, que efetuaram análises aos biomarcadores PCT e CRP, no ano de 2017.

Na faixa etária dos doentes com mais de 65 anos, verificou-se que a UCIP foi a unidade com maior percentagem de doentes nos dois anos de estudo, apresentando uma diferença de percentagens pouco significativa. Para além disso, foi possível averiguar que a unidade de Medicina Interna apresentou um aumento da percentagem de doentes que realizaram análises aos dois biomarcadores em estudo, do ano de 2016 relativamente ao ano de 2017.

Fazendo uma análise geral dos dados, relativamente ao número de doentes com prescrição de análises à concentração sérica da PCT e CRP, no ano de 2017 foram menos 44 comparativamente ao ano de 2016.

Na faixa etária dos doentes com idade compreendida entre 0-18 anos, verificou-se uma percentagem de doentes superior nas unidades de Neonatologia e no Berçário, nos dois anos de estudo. Isto acontece pelo facto de nesta idade os sintomas serem sobrealimentados, pois trata-se maioritariamente de crianças cujo sistema de órgãos ainda não se encontra em estado completo de maturidade, o que significa que o SI é muito debilitado, estando mais sujeitos ao aparecimento de patologias. Deste modo, o aumento da concentração sérica da PCT e CRP pode não estar associado à infeção (Soreng *et al.*, 2011; Niehunes, 2017).

Nas faixas etárias dos doentes com idade dos 19 aos 65 anos, as unidades com maior percentagem de doentes nas referidas condições, foram a UCIP, unidade de Cirurgia e na Urgência geral. Assim como na faixa etária que compreende doentes com idade superior a 65

anos, em que a UCIP, unidade de Cirurgia, unidade de Cirurgia e a de Medicina interna também foram as que apresentaram maior percentagem relativamente às restantes unidades. A UCIP representa o serviço com uma percentagem maioritária nas faixas etárias referidas devido á situação débil dos doentes internados, pois encontram-se num estado avançado da doença em que tem o SI frágil e estão mais suscetíveis aos agentes oportunistas, os responsáveis principais das infeções bacterianas (Jämsä *et al.*, 2018). Segundo Gao L. *et al.*, (2017), cerca de 25-40 % dos doentes com sepsis encontra-se internada na UCI na maioria das instituições, o que revela uma semelhança aos resultados obtidos neste estudo. O facto de a unidade de Cirurgia representar uma percentagem considerável, deve-se à requisição de análises á PCT e CRP como prevenção no pré e pós-operatório. Segundo Becker *et al.*, durante a cirurgia estamos sujeitos a uma intervenção invasiva no organismo podendo ser uma fonte de infeção. A unidade de Medicina e de Urgência Geral têm um valor considerável de doentes com prescrições de análises aos biomarcadores em estudo como método de prevenção e para auxílio no diagnóstico do doente.

3.2. Análise dos diagnósticos gerais

Após análise da ampla lista de diagnósticos, foram selecionados os dois com maior percentagem de frequência de prescrição dos biomarcadores em estudo, nas diferentes faixas etárias relativas aos anos de 2016 e 2017.

Na faixa etária dos 0 aos 18 anos, verificou-se um maior número de doentes com prescrição de análises da PCT e CRP nos doentes com o diagnóstico de febre (10%) e com icterícia (8%). A febre é o sintoma mais frequente quando o organismo é invadido por um agente patogénico e por isso está associada à presença de uma infeção (Ebihara *et al.*, 2016). A icterícia, como representa uma quebra da função hepática que leva a uma alteração dos processos hemolíticos pode ser a origem de um choque séptico.

Na faixa etária dos 19 aos 65 anos, a maior percentagem corresponde aos doentes diagnosticados com neoplasias (14%) e seguidamente, os doentes com choque séptico (7 %).

Em doentes com idade superior a 65 anos, verificou-se uma similaridade dos dados uma vez que a maior percentagem corresponde aos doentes com neoplasias (20%) e seguidamente, doentes com pneumonias (8%).

A prescrição destas análises a doentes com neoplasias variadas deve-se ao facto de este ser um processo crónico ao qual promove uma redução significativa das defesas imunitárias, devido ao estado debilitado do SI, o que poderá originar mais facilmente infeções por bactérias

oportunistas (Becker *et al.*, 2010). As análises aos biomarcadores em estudo são regularmente prescritas aos doentes com neoplasias no pré e pós-operatório, pois é a forma de prevenir que o doente seja submetido a uma cirurgia com infeção e verificar se após a intervenção cirúrgica permanece fora perigo (Becker *et al.*, 2010). A pneumonia, é uma infeção pulmonar que pode ser provocada por bactérias, o que justifica o facto de representar uma percentagem significativa de doentes com prescrição de análises à PCT e CRP. Relativamente ao diagnóstico de choque séptico, como já foi referido, é um estado avançado da sepsis, em que após a administração da terapia antibiótica é necessário um controlo continuo das concentrações séricas da PCT e CRP de modo a controlar o estado da doença.

3.3. Alvo de estudo

Os doentes com idade superior a 65 anos, representaram a maior percentagem de doentes que deram entrada no CHTMAD e que efetuaram análises aos biomarcadores PCR e CRP, tanto no ano de 2016 como no ano de 2017. Por este motivo serão alvo deste estudo, uma vez que são uma percentagem representativa na região de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Segundo os dados apresentados anteriormente, a UCIP foi a unidade de serviço com maior percentagem de doentes com prescrição de análises aos biomarcadores em estudo. O diagnóstico de sepsis foi escolhido como alvo de estudo pelo facto de ser ainda a causa maioritária de mortes em todo mundo. Para além disso a PCT e a CRP são os biomarcadores considerados para a deteção desta patologia.

3.2.1. Dados relativos ao ano de 2016

Após a seleção dos dados, anotou-se a entrada no CHTMAD de 510 doentes com idade superior a 65 anos que realizaram as análises aos biomarcadores em estudo, dos quais 144 pertencem à UCIP.

Diagnóstico

Dos 144 doentes com idade superior a 65 anos, 23 foram diagnosticados com choque séptico (16%) e 14 com insuficiência pulmonar (10%). Relativamente ao diagnóstico de septicémia, apenas foram diagnosticados 2 doentes.

Uma vez que, o diagnóstico de choque séptico foi o mais frequente dos doentes com prescrição de análises à PCT e CRP, realizou-se um estudo mais aprofundado acerca do mesmo. Assim, verificou-se que, dos 23 doentes com diagnóstico de choque séptico, a 12 foi atribuído

um diagnóstico secundário de septicémia. A 10 destes 12 doentes, também lhes foi atribuído o diagnóstico de SIRS.

Analisando os dados obtidos relativos aos doentes, confirma-se a realidade descrita pela literatura, isto é, as infeções bacterianas não identificadas em tempo útil podem resultar em septicémia, SIRS e posteriormente choque séptico.

Bactérias

Dos doentes selecionados foi feita a identificação da bactéria que poderá ser responsável pelo aparecimento destas patologias. O grupo de bactérias que foi detetado através de análises microbiológicas do sangue (hemocultura) ou de mucos dos respetivos doentes estão em conformidade com a literatura (Soreng *et al.*, 2011). Pois, as bactérias mais frequentes e responsáveis pelo aparecimento destas patologias são maioritariamente as bactérias Gram-negativas (Nishikawua. *et al.*, 2016), nomeadamente: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* resistentes á meticilina.

Prognóstico

Foram atribuídos prognósticos (“favorável” / “não favorável”) aos 23 doentes diagnosticados com choque séptico, considerando o estado do doente e os valores dos níveis séricos dos biomarcadores em estudo. Aproximadamente metade dos doentes encontravam-se numa situação “não favorável” e faleceram.

3.2.2. Dados relativos de 2017

No ano de 2017, deram entrada no CHTMAD 570 doentes com idade superior a 65 anos, dos quais apenas 142 encontravam-se na UCIP e realizaram análises aos biomarcadores em estudo.

Diagnóstico

Dos 142 doentes, 19 foram diagnosticadas com pneumonia (13%), 9 com traumatismo (6%) e 8 doentes com diagnóstico principal de septicémia, verificando-se um aumento comparativamente ao ano de 2016.

Relativamente aos 19 doentes com diagnóstico principal de pneumonia, apenas 2 tiveram como diagnóstico secundário choque séptico e apenas 1 sobreviveu após o tratamento aplicado.

Bactérias

Pode-se afirmar que os dados fornecidos pelo CHTMAD continuam em conformidade com a literatura (Soreng *et al.*, 2012) e com os dados obtidos no ano de 2016 com algumas exceções. Pois as bactérias mais frequentes e responsáveis pelo aparecimento da sepsis são maioritariamente as bactérias Gram-negativas (Nishikawua *et al.*, 2016) nomeadamente: *Enterobacter cloacae*; *Enterococcus faecium*; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Legionella*; *Maltophilia*; *Stenotrophomonas* (X.); *Staphylococcus coagulase* (negativa); *Streptococcus pneumoniae*.

Prognóstico

Dos 19 doentes diagnosticados de pneumonia, 14 tiveram um prognóstico “favorável”, sobrevivendo, e 5 faleceram durante o internamento.

3.3. Intervalo de *Cut-off* prático

O intervalo de *cut-off* é definido como o limite de deteção (valor não patológico) e o limite máximo de quantificação (valor patológico).

Através da análise dos dados relativos aos doentes que deram entrada no CHTMAD, foi elaborado um estudo para a obtenção do intervalo de *cut-off* prático. Este intervalo, foi calculado para o ano de 2016 e 2017. O *cut-off* representa o intervalo de valores que compreende os valores obtidos da quantificação da concentração sérica para a PCT e CRP. Apesar de ser sempre considerado o valor de *cut-off* teórico do fornecedor (ROCHE®) como suporte de validação das análises dos biomarcadores em estudo, foi calculado o valor obtido na prática hospitalar relativamente aos doentes. Para efetuar o cálculo deste valor foram considerados apenas os doentes com idade superior a 65 anos.

No ano de 2016, o intervalo de *cut-off* obtido através níveis séricos da PCT foi de 0,10-100 ng/mL e o intervalo de *cut-off* da CRP foi de 0,05- 57,00 mg/L.

No ano de 2017, verificou-se que o intervalo de *cut-off* da PCT foi de 0,10-95,3 ng/mL e o intervalo de *cut-off* da CRP é de 0,5-58,5 mg/mL, resultados semelhantes aos obtidos por Uusitalo-Seppälä *et al.*, (2011) e por Slade *et al.*, (2000), respetivamente.

3.4. Cálculo do valor de Índice K

Para a conclusão deste estudo, foi calculado o índice K (IK) que representa uma medida de reprodutibilidade e concordância de resultados quando os parâmetros em estudo são utilizados em condições idênticas (Kraemer *et al.*, 2002). O valor obtido através do cálculo efetuado será interpretado com auxílio da tabela 6 em que o mínimo da escala é definido por “Pobre” e o máximo por “Excelente”.

Tabela 5- Escala de classificação do valor kappa.

Valor de kappa	Concordância
0	Pobre
0-0,20	Ligeira
0,21-0,40	Considerável
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Muito Bom
0,81-1	Excelente

Para auxílio da realização do cálculo foram considerados os valores de referência dos níveis séricos normais de PCT e CRP no ser humano (tabela 7).

Tabela 6- Intervalo /Valor de referência relativos aos níveis séricos da CRP e PCT.

Intervalo/Valor de referência	
CRP	PCT
<5 mg/L	0,046 ng/mL

O valores acima do valor de referência representa um nível patológico e foi considerado como o valor POSITIVO. Por sua vez, o valor abaixo do valor de referência representa um nível não patológico, foi considerado como o valor NEGATIVO. Foram utilizados os dados de todos os doentes que realizaram análises aos biomarcadores em estudo, com idade superior a 65 anos, a partir da base de dados, conforme a tabela 8 e tabela 9, e calculado o IK, para o ano de 2016 e 2017. O cálculo foi realizado através dos parâmetros: $V_{(n \text{ PCT}+ n \text{ CRP})}$ - soma do número de doentes que realizaram análises à de PCT e CRP considerados negativos; $V_{(p \text{ PCT}+ p \text{ CRP})}$ - soma do número de doentes que realizaram análises à PCT e CRP, considerados positivos; **nº total de doentes**- número total de doentes considerados para a realização do cálculo, seguindo o modelo da equação 1.

Equação 1- Equação base para a realização do cálculo do índice kappa.

$$IK = \frac{V(n_{PCT+n_{CRP}}) + V(p_{PCT+p_{CRP}})}{n^{\circ} \text{ total de doentes}}$$

Tabela 7- Índice K relativo ao ano de 2016 entre a PCT e CRP.

		CRP		
		Negativo	Positivo	Total
PCT	Negativo	7	0	7
	Positivo	171	332	503
Total		178	332	510

$$IK = \frac{7 + 332}{510} = 0,66$$

Tabela 8- Índice K relativo ao ano de 2017 entre a PCT e CRP.

		CRP		
		Negativo	Positivo	Total
PCT	Negativo	31	4	35
	Positivo	157	378	535
Total		188	382	570

$$IK = \frac{31 + 378}{570} = 0,72$$

Pela observação das tabelas 8 e tabela 9, verificou-se que o valor do IK relativo ao ano de 2016 foi de 0,66 e de 2017 foi de 0.72. Através da consulta à tabela 6, verificou-se que a PCT e CRP têm um nível de concordância classificado como “Muito Bom”. Apesar do índice K destes biomarcadores apresentar um grau de concordância classificado como “Muito Bom”, este estudo mostra também que a percentagem de resultados não concordantes (soma da diagonal secundária) parece justificar a utilização simultânea dos dois biomarcadores. Desta forma, será vantajoso a utilização de ambos os biomarcadores em simultâneo no âmbito médico do CHTMAD, para a deteção das infeções bacterianas e posteriores septicémias.



Capítulo 4- Conclusão e Perspetivas futuras

4. Conclusão e Perspetivas futuras

De acordo com os dados descritos na literatura, continuam a ser estudados inúmeros biomarcadores potenciais de identificação da sepsis em todo o mundo, na tentativa de definir um teste clinicamente útil na avaliação desta patologia.

Verificou-se neste estudo que na atualidade a PCT e a CRP são os biomarcadores mais utilizados para o diagnóstico da sepsis devido à sua resposta específica e/ou sensível na presença de bactérias no organismo. A quantificação dos seus níveis séricos é o método mais utilizado para a deteção desta patologia devido ao facto de a sua produção e libertação ser estimulada em resposta à infeção.

Através da análise dos dados dos doentes com idade superior a 65 anos, verificou-se que existe similaridade entre os dois intervalos de *cut-off* prático obtidos para a PCT e CRP no ano de 2016 e 2017. No ano de 2016, o intervalo de *cut-off* para a PCT foi de 0,10-100 ng/mL e o intervalo de *cut-off da CRP* foi de 0,5-57,00 mg/mL. No ano de 2017, o intervalo de *cut-off* para a PCT foi de 0,10-95,3 ng/mL e o intervalo de *cut-off da CRP* foi de 0,5-58,50 mg/mL. O que revela coerência dos métodos utilizados para a análise quantitativa dos níveis séricos da PCT e CRP utilizados no CHTMAD. Para além disso, foi possível confirmar que o intervalo de *cut-off* prático se encontra compreendido no intervalo de *cut-off* teórico dado pela empresa ROCHE®, tanto para a PCT como para CRP.

Quando calculado o IK relativo ao nível de concordância na utilização em simultâneo dos dois biomarcadores em estudo para a deteção da sepsis, verificou-se que o valor obtido corresponde ao intervalo de classificação “Muito bom”. Pois no ano de 2016, o valor de IK foi de 0,66 e para o ano de 2017, o valor foi de 0,72. Este facto vem a reforçar o descrito na literatura.

Concluído o estudo acerca deste tema, pode-se dizer que mostrou ter um grau de relevância considerável, uma vez que continua a pôr em causa a saúde pública. Deste modo, as perspetivas futuras deste estudo são:

- Estudar os valores dos vários episódios pertencentes a cada doente, uma vez que só consideramos um episódio por doente;
- Analisar os antibióticos mais utilizados no caso de suspeita ou diagnóstico de sepsis e seu resultado final, com o objetivo de diminuir a sua utilização e conseqüentemente a resistência aos mesmos;

- Estudar a atividade de diferentes marcadores bioquímicos que sejam uteis para o diagnóstico da sepsis, de modo a ser um ponto favorável para a atuar eficazmente no foco da doença e diminuir a taxa de mortalidade causadas pela falta de especificidade desta doença.
- Perceber a razão para o elevado número de resultados discrepantes na determinação dos níveis séricos da PCT e CRP.



Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Becker K. L., Snider R., Nylén E. S. (2010) Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *British journal of pharmacology*, **159** (2): 253-264.
- Bode-Jänisch S., Schütz S., Schmidt A., Tschernig T., Debertin A.S., Fieguth A., Hagemeyer L., Teske J., Suerbaum S., Klintschar M., Bange F.C. (2013) Serum procalcitonin levels in the postmortem diagnosis of sepsis. *Forensic science international* **226** (1-3): 266–272.
- Carroll E., Thomson A., Hart C. (2002) Procalcitonin as a marker of sepsis. *Journal international of antimicrobial agents*, **20** (1): 1-9.
- Chaudhry H., Zhou J., Zhong Y., Ali M. M., McGuire F., Nagarkatti P. S., Nagarkatti M (2013) Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *In vivo* **27** (6): 669–684.
- Christ-Crain M., Müller B (2005) Procalcitonin in bacterial infections –hype, hope, more or less?. *Swiss Med Wkly*, **135**: 451 – 460.
- Ebihara Y., Kobayashi K., Ishida A., Maeda T., Takahashi N., Taji Y., Asou N., Ikebuchi K. (2016) Diagnostic performance of procalcitonin, presepsin, and C-reactive protein in patients with hematological malignancies. *Journal of clinical laboratory analysis*, **31** (6): e22147.
- Faix D. J. (2013) Biomarkers of sepsis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, **50** (1): 23–36.
- Friedman R.B., Young D. S. (1997) Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press.
- Gao D., Chen X., Wu H., Wei H., Wu J. (2017a) The levels of serum pro-calcitonin and high-sensitivity C-reactive protein in the early diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease during acute exacerbation. *Experimental and therapeutic medicine*, **14** (1): 193-198.
- Gao L., Liu X., Zhang D., Xu F., Chen G., Hong Y., Feng G., Shi G., Yang B., Xu L. (2017b) Early diagnosis of bacterial infection in patients with septicopyemia by laboratory analysis of PCT, CRP and IL-6. *Experimental and therapeutic medicine*, **13** (6): 3479-3483.
- Gonçalves P. F., Falcão L. M., Pinheiro I. D. (2015) Procalcitonin as Biomarker of Infection: Implications for Evaluation and Treatment. *American journal of therapeutics*, **0** (0): 1–7.
- Hanson L. (1997) Current opinion in infectious diseases. **10**: 196-201.

- Heredia-Rodríguez M., Bustamante-Munguira J., Lorenzo M., Gómez-Sánchez E., Álvarez F. J., Fierro I., Conejo E., Eduardo Tamayo E. (2017) Procalcitonin and white blood cells, combined predictors of infection in cardiac surgery patients. *Journal of surgical research*, **212**: 187-194.
- Kim H., Hur M., Moon H., Yun Y., Somma S. (2017) Multi-marker approach using procalcitonin, presepsin, galectin-3, and soluble suppression of tumorigenicity 2 for the prediction of mortality in sepsis. *Annals of intensive care*, **7** (1):27.
- Kinderheilkd M. (2017) C-reaktives Protein und andere immunologische Biomarker. *CrossMark*, **165**:560–571.
- Kraemer, H. C., Periyakoil, V. S., Noda, A. (2002). Kappa coefficients in medical research. *Statistics in medicine*, **21**: 2109-2129.
- Lisboa T., Salluh J., Póvoa P. (2018) Do we need trials of procalcitonin-guided antibiotic therapy?. *Critical Care*, **22** (1): 17.
- Ludvik, J. (2011) DC-electrochemiluminescence (ECL with a coreactant)-principle and applications in organic chemistry. *Journal of solid state electrochemistry*, **15** (10): 2065–2081.
- Lyu Y. X., Yu X. C., Zhu M. Y. (2013) Comparison of the diagnostic value of procalcitonin and C-reactive protein after hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Transplant infectious disease*, **15** (13): 290–299.
- Matwiyoff G. N., Prah J. D., Miller R. J., Carmichael J. J., Amundson D. E., Seda G., Daheshia M. (2012) Immune regulation of procalcitonin: a biomarker and mediator of infection. *Inflammation research*, **61** (5): 401-409.
- May A., Wang J. T. (2007) Evaluating the role of biomarkers for cardiovascular risk prediction: focus on CRP, BNP and urinary microalbumin. *Expert review of molecular diagnostics*, **7** (6): 793-804.
- Nishikawa H., Shirano M., Kasamatsu Y., Morimura A., Iida K., Kishi T., Goto T., Okamoto S., Ehara E. (2017) Comparison between procalcitonin and C-reactive protein in predicting bacteremias and confounding factors: a case-control study. *Clinical chemistry and laboratory medicine (CCLM)*, **55** (10): 1043-1052.
- Okomura J. M., Miyagi J.M., Terada K.J. (1990) Potential clinical applications of C-reactive protein. *Journal of clinical laboratory analysis*, **4** (3): 231-235.
- Pontrelli G., Crescenzo F., Buzzetti R., Jenkner A., Balduzzi S., Carducci F.C, Amodio D., Luca M., Chiurchiù S., Davies E. H., Copponi G., Simonetti A., Ferretti E., Franco V.D.,

- Rasi V., Corte M. D., Gramatica L., Ciabattini M., Livadiotti S., Rossi P. (2017) Accuracy of sérum procalcitonin for the diagnosis of sepsis in neonates and children with systemic inflammatory syndrome: a meta-analysis. *BMC infectious diseases*, **17** (1):302.
- Póvoa P. (2002) C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive care medicine*, **28** (3): 235-243.
- Prieto B., Miguel D., Costa M., Coto D., Álvarez F. V. (2010) New quantitative electrochemiluminescence method (ECLIA) for interleukin-6 (IL-6) measurement. *Clinical Chemistry and laboratory medicine*, **48** (6): 835-838.
- Reinhart K., Meisner M., Brunkhorst F. M. (2006) Markers for sepsis. Diagnosis: What is useful?. *Critical care clinicals*, **22** (3): 503-519.
- Riedel S. (2012) Procalcitonin and the role of biomarkers in the diagnosis and management of sepsis. *Diagnostic Microbiology and infectious disease*, **73** (3): 221–227.
- Ríos-Toro J-J., Márquez-Coello M., García-Álvarez J-M., Martín-Aspas A., Rivera-Fernández R., Sáez de Benito A., Girón-González J-A. (2017) Soluble membrane receptors, interleukin 6, procalcitonin and C reactive protein as prognostic markers in patients with severe sepsis and septic shock. *Plos one*, **12** (4): e0175254.
- ROCHE. pt (site da Internet); acedido em 30/01/2018. Disponível no endereço: <https://www.roche.pt/corporate/index.cfm/farmaceutica/ensaios-clinicos-profissionais-desaudef/biomarcadores/o-que-sao-biomarcadores/> .
- ROCHE diagnostics, Lda (BRAHMS.CRP)
- ROCHE diagnostics, Lda (BRAHMS.PCT)
- Schiettecatte J., Strasser O., Anckaert E., Smits J. (2016) Performance evaluation of an automated electrochemiluminescent calcitonin (CT) immunoassay in diagnosis of medullary thyroid carcinoma. *Clinical biochemistry*, **49** (12): 929-931.
- Slade G. D, Offerbacher S., Beck J. D., Heiss G., Pankow J.S. (2000) Accent-phase inflammatory response to periodontal disease in the population. *Journal dental research*, **79** (1): 49-57.
- Soreng K., Levy H. R. (2011) Procalcitonin: an Emerging Biomarker of Bacterial Sepsis. *Clinical Microbiology Newsletter*, **33**: 22.
- Suárez-Santamaría M., Santolaria F., Pérez-Ramírez A., Alemán-Valls M., Martínez-Riera A., González-Reimers E., Veja M., Milena A. (2010) Prognostic value of inflammatory markers (notably cytokines and procalcitonin), nutritional assessment, and organ function in patients with sepsis. *European cytokine network*, **21** (1): 19-26.

- Suwen Q., Qiaoliang L., Rao W., Yin L., Zhang H. (2013). Determining the Concentration of Procalcitonin Using a Magnetic Particles-based Chemiluminescence Assay for the Clinical Diagnosis of Sepsis. *Analytical sciences*, **29**: 805- 810.
- Sun Y., Jiang L., Shao X. (2017) Predictive value of procalcitonin for diagnosis of infections in patients with chronic kidney disease: a comparison with traditional inflammatory markers C- reactive protein, White blood cell count, and neutrophil percentage. *International urology nephrology*, **49 (12)**: 2205-2216.
- Tachyla A. S., Marochkov A. V., Lipnitski A. L., Nikiforova Y. G. (2017) The prognostic value of procalcitonin, C-reactive protein and cholesterol in patients with an infection and multiple organ dysfunction. *Journal korean of anesthesiology*, **70 (3)**: 305-310.
- Uusitalo-Seppälä R., Koskinen P., Leino A., Peuravuori H., Vahlberg T., Rintala E. M. (2011) Early detection of severe sepsis in the emergency room: Diagnostic value of plasma C-reactive protein, procalcitonin, and interleukin-6. *Scandinavian journal of infectious Diseases*, **43 (11-12)**: 883–890.
- Vijayan L. A., Vanimay, Ravindran S., Saikant R., Lakshami, Kartik R., Manoj G. (2017) Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy. *Journal of intensive care*, **5 (1)**: 51.
- Vurgun E., Evliyaoğlu O., Arabaci C., Yıldırım S., Cakmak P. (2017) Roles of C-Reactive Protein and Procalcitonin in Empirical Treatment Approach to the Bacterial Sepsis Agent. *Istanbul Journal medicinal*, **18 (2)**: 72-5.
- Woodhead M., Blasé F., Ewig S., Huchon G., Leven M., Ortquist A., Shaberg T., Torres A., Van Der Hei Jden G., Verheij T. J. M. (2005) Ears task force in collaboration with Escumid – Guidelines for the lower respiratory tract infections. *Journal european respiratory*, **26**:1138-1180.
- Wu C., Lan H., Han S., Chaou C., Yeh C., Liu S., Li C., Blaney G. N., Liu Z., Chen K. (2017) Comparison of diagnostic accuracy in sepsis between presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis. *Annals of intensive care*, **7 (1)**: 91.
- Young D. S., Thomas D. W., Friedman R. B., Pestaner L. C. (1972) Effects of drugs on clinical laboratory test. *Clinical chemistry*, **18 (10)**: 1041.
- Yu H., Qi Z., Hang C., Fang Y., Li R. S. C. (2017) Evaluating the value of dynamic procalcitonin and presepsin measurements for patients with severe sepsis. *American journal of emergency medicine*, **35 (6)**: 835–841.

- Zhang H., Wang X., Zhang Q., Xia Y., Liu D. (2017a) Comparison of procalcitonin and high-sensitivity C-reactive protein for the diagnosis of sepsis and septic shock in the oldest old patients. *Baylor college of medicine geriatrics*, **17 (1)**:173.
- Zhang T., Wang Y., Yang Q., Dong Y. (2017b) Procalcitonin- guided antibiotic therapy in critically ill adults: a meta-analysis. *BMC infections diseases*, **17 (1)**: 514.
- Zhou M., Xia Y. (2018) Electrochemiluminescence immunoassay based on site-specific labeling using a histidine-binding iridium (III) solvent complex. *Analytica Chimica Acta*, **1023**: 29-34.

