

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

DALILA TEIXEIRA LEAL

**ANÁLISES BIOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E PROTEÔMICA DE PACIENTES
COM SEPSE**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

DALILA TEIXEIRA LEAL

**ANÁLISES BIOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E PROTEÔMICA DE PACIENTES
COM SEPSIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Goreti de A. Oliveira

Coorientadores: Andréia Patrícia Gomes
Camilo Elber Vital
Humberto Josué de Oliveira Ramos
Rodrigo Siqueira Batista

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L435e
2021 Leal, Dalila Teixeira, 1983-
Análises bioquímica, microbiológica e proteômica de
pacientes com sepse / Dalila Teixeira Leal. – Viçosa, MG, 2021.
102 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Septicemia. 2. Proteômica. 3. Prognóstico.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 616.944

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima Alves CRB6/2578

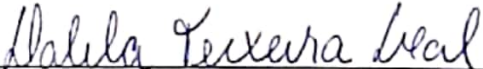
DALILA TEIXEIRA LEAL

**ANÁLISES BIOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E PROTEÔMICA DE
PACIENTES COM SEPSE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de maio de 2021.

Assentimento:



Dalila Teixeira Leal
Autora



Maria Goreti de Almeida Oliveira
Orientador

Dedico esta Tese aos meus amados filhos: Jorge e Inácio.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar e conduzir todo o meu caminho.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, pela oportunidade de fazer esse curso.

Ao Departamento de Medicina e Enfermagem por permitirem a minha liberação para cursar o doutorado.

As agências que fomentaram essa pesquisa CAPES, CNPq e à FAPEMIG.

A equipe da UTI do Hospital São João Batista e pela contribuição e permissão em realizar essa pesquisa.

Aos professores Rodrigo Siqueira Batista e Andréia Patrícia Gomes por idealizarem e conduzirem a primeira etapa desse projeto.

A Professora Maria Goreti de Oliveira pela paciência, orientação, apoio, confiança e exemplo a ser seguido.

Ao Professor Humberto Ramos pelos ensinamentos.

Agradeço de forma especial a todas as pessoas que me apoiaram, ajudaram, escutaram, aconselharam durante essa jornada, como eu aprendi com vocês: Samuel, Camilo, Layla, Rafaela, Verônica, Neilier, Gabriela, Juliano, Lídia, Diogo e Yaremis.

Agradeço todo apoio recebido pelos colegas de trabalho da UAES.

Aos meus filhos Jorge e Inácio e meu marido, Emmanuel, que são razão de todo o meu esforço e dedicação.

Aos meus pais Elizete e José Paulo pelo amor, dedicação, exemplo de “trabalho duro” que nunca mediram esforços para realização dos meus sonhos.

A minha irmã Deborah e meu cunhado Fabiano pela troca de ideias e pelo incentivo.

A minha sogra, Rita, que sempre me apoiou e ajudou nessa caminhada.

RESUMO

LEAL, Dalila Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Análises Bioquímica, Microbiológica e Proteômica de Pacientes com Sepses**. Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Rodrigo Siqueira Batista, Camilo Elber Vital, Andreia Patrícia Gomes e Humberto Josué de Oliveira Ramos.

A *Sepses* é caracterizada, de acordo com o *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock*, como a disfunção orgânica com risco de vida, causada por resposta desregulada à infecção. Na presente investigação, realizou-se estudo retrospectivo observacional com objetivo de analisar os parâmetros bioquímicos, microbiológicos e proteômicos de pacientes com *Sepses* internados em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de hospital da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. Essa tese apresenta a seguinte estrutura: Introdução, apresentando revisão dos principais conceitos relativos à *Sepses*; três Capítulos correspondentes a três artigos; Discussão e Conclusão Geral; mais as Referências. O primeiro Capítulo descreveu os principais microrganismos encontrados nas amostras clínicas dos pacientes internados com *Sepses* e a resistência antimicrobiana apresentada por esses patógenos. Demonstrou-se que os dispositivos invasivos mais utilizados pelos pacientes com *Sepses* (n=19) foram o cateter venoso central, o ventilador mecânico e o cateter urinário. As axilas e a secreção traqueal foram os locais mais colonizados. Os microrganismos isolados, relacionados com a colonização, foram a *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *Acinetobacter spp.* Em relação a infecção, o trato urinário foi o mais acometido e o principal microrganismo relacionado a esta infecção foi a *Pseudomonas aeruginosa*. Nas culturas investigadas, relacionadas tanto com a colonização, quanto infecção, *Ciprofloxacino* foi o antimicrobiano ao qual as bactérias apresentaram maior resistência. O segundo Capítulo teve por escopo a análise dos parâmetros bioquímicos e as relações entre neutrófilo/linfócitos (RNL), plaquetas/linfócitos (RPL) e linfócitos/monócitos (RLM) de pacientes com *Sepses*, internados na UTI (n=7). As principais fontes de infecção foram o sistema respiratório e o abdômen. O microrganismo mais frequente, isolado nas culturas, foi a *Escherichia*

coli. Os valores de creatinina, ureia e FiO₂ apresentaram-se elevados desde o início da internação para os enfermos com *Sepse* que evoluíram para o óbito. Nos pacientes que faleceram, a Relação Neutrófilo/Linfócito (RNL) aumentou ao longo do tempo, ao contrário dos doentes que sobreviveram, os quais apresentaram queda nesses valores ao longo do tempo. A RNL mostra-se como marcador prognóstico importante para *Sepse*. O terceiro capítulo orientou-se à descrição dos spots de proteínas, encontrados ao longo do tempo (T1xT2 e T2xT3), obtidos por análise de detecção e quantificação diferencial sobre os géis 2DE, com diferenças estatísticas nas comparações entre enfermos com *Sepse* (n=7) que receberam alta e aqueles que evoluíram para a óbito. A análise longitudinal mostrou que houve diferenças entre os dois grupos quanto ao tempo e desfecho da doença. Os pacientes que evoluíram para o óbito tiveram número maior de spots proteínas alteradas ao longo do tempo, principalmente entre os tempos T2 e T3. Novos estudos são necessários à caracterização microbiológica e bioquímica dos pacientes com *Sepse*, especialmente no que concerne a correlação entre esses dados, que provavelmente contribuirá à melhor compreensão desta importante condição mórbida.

Palavras-chave: Prognóstico. Proteômica. *Sepse*. Spots de Proteína.

ABSTRACT

LEAL, Dalila Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2021. **Biochemical, Microbiological and Proteomic Analyses of Patients with Sepsis.** Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisors: Rodrigo Siqueira Batista, Camilo Elber Vital, Andreia Patrícia Gomes and Humberto Josué de Oliveira Ramos.

Sepsis is characterized, according to *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock*, as a life-threatening organ dysfunction caused by an unregulated response to infection. In the present investigation, a retrospective observational study was carried out to analyze the biochemical, microbiological and proteomic parameters of patients with sepsis admitted to an Intensive Care Unit (ICU) of a hospital in the Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil. This thesis has the following structure: Introduction, presenting a review of the main concepts related to sepsis; three Chapters corresponding to three articles; Discussion and General Conclusion; plus the References. The first Chapter described the main microorganisms found in clinical samples from hospitalized patients with sepsis and the antimicrobial resistance presented by these pathogens. It was shown that the invasive devices most used by patients with sepsis (n=19) were the central venous catheter, the mechanical ventilator and the urinary catheter. The armpits and tracheal secretion were the most colonized sites. The isolated microorganisms related to colonization were *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* and *Acinetobacter spp.* Regarding infection, the urinary tract was the most affected and the main microorganism related to this infection was *Pseudomonas aeruginosa*. In the cultures investigated, related to both colonization and infection, ciprofloxacin was the antimicrobial to which the bacteria showed greater resistance. The second chapter had as its scope the analysis of biochemical parameters and the relationships between neutrophil/lymphocytes (RNL), platelets/lymphocytes (RPL) and lymphocytes/monocytes (LMR) of patients with sepsis admitted to the ICU (n=7). The main sources of infection were the respiratory system and the abdomen. The most frequent microorganism, isolated in cultures, was *Escherichia coli*. The values of creatinine, urea and FiO₂ were high since the beginning of hospitalization for patients with sepsis who progressed to death. In

patients who died, the Neutrophil/Lymphocyte Ratio (NLR) increased over time, in contrast to patients who survived, who showed a drop in these values over time. NLR is an important prognostic marker for sepsis. The third chapter was oriented to the description of protein spots, found over time (T1xT2 and T2xT3), obtained by detection analysis and differential quantification on 2-DE gels, with statistical differences in comparisons between patients with sepsis (n=7) who were discharged and those who died. Longitudinal analysis showed that there were differences between the two groups in terms of disease duration and outcome. Patients who died had a greater number of altered protein spots over time, especially between T2 and T3. Further studies are needed for the microbiological and biochemical characterization of patients with sepsis, especially with regard to the correlation between these data, which will likely contribute to a better understanding of this important morbid condition.

Keywords: Prognosis. Proteomics. Sepsis. Protein spots.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exames Bioquímicos.....	58
Figura 2 – Parâmetros do Hemograma.....	59
Figura 3 – Parâmetros da Gasometria Arterial.....	60
Figura 4 – Marcadores Inflamatórios.....	61
Figura 5 – Imagens representativas de géis 2-DE para proteômica comparativa entre os tratamentos Controle (1A), Alta (1B) e Óbito (1C).....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Definições de Sepsis.....	18
Quadro 2 – Critérios para cálculo do escore SOFA.	20
Quadro 3 – Definições de SIRS e Sepsis.	27
Quadro 4 – Período de internação dos participantes do estudo.....	28
Quadro 5 – Período de internação dos participantes do estudo.....	56
Quadro 6 – Definições de sepsis e características de identificação.	75

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Characteristics of patients according to age, gender, period of hospitalization, and conclusion	36
Table 2 – Number of invasive devices used in patients.....	37
Table 3 – Frequency of prescribed antimicrobials during the period of hospitalization	38
Table 4 – Microbiology by patient during the treatment period.....	39
Table 5 – Microorganism associated to colonization per culture site and per patient.	39
Table 6 – Microorganism associated with infection per culture site and per patient ..	40
Table 7 – Microorganism resistance profile related to colonization and infection.....	41
Tabela 1 – Características gerais dos pacientes.....	57
Tabela 2 – Microrganismos identificados por local de cultura.....	57
Tabela 3 – Resultado geral da comparação proteômica.....	82
Tabela 4 – Análise proteômica comparativa das classes nas três condições estudadas.	83
Tabela 5 – Lista dos spots identificados entre os tratamentos Alta, Óbito e Controle.	84
Tabela 6 – Número de spots diferencialmente abundantes ao longo do tempo de internação para os diferentes tratamentos.....	88
Tabela 7 – Lista dos spots identificados entre os tempos para o tratamento Alta.....	89
Tabela 8 – Lista dos spots identificados entre os tempos para o tratamento Óbito. .	90

LISTA DE SIGLAS

ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
AMR	Antimicrobial Resistance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propanesulfonate
DAMP	Padrões moleculares associados com a lesão
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ESICM	<i>European Society for Intensive Care Medicine</i>
EUA	Estados Unido da América
FiO2	Fração inspirada de oxigênio
GLASS	<i>Global Surveillance System of Antimicrobial Resistance</i>
HAIs	<i>Healthcare-associated infections</i>
PAS	Pressão arterial sistólica
ICF	<i>Informed Consent Form</i>
ICU	<i>Intensive Care Unit</i>
IEF	Focalização Isoelétrica
ILAS	Instituto Latino-Americano de Sepsis
INR	<i>International normalized ratio</i>
IRA	Insuficiência renal aguda
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
KTTP	Tempo de tromboplastina parcial
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NO	Oxido nítrico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógenos

PaO2	Pressão parcial de oxigênio arterial
PBSI	<i>Primary bloodstream infection</i>
PCR	Proteína C Reativa
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
RLM	Relação Linfócitos/Monócitos
RNL	Relação Neutrófilo/Linfócitos
RPM	Relação Plaquetas/Linfócitos
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SDS	Dodecil sulfato sódio
SIRS	Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica
SIS	<i>Surgical Infection Society</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment Score</i>
SPREAD	<i>Sepsis Prevalence Assessment Database</i>
SSC	<i>Surviving Sepsis Campaign</i>
suPAR	Receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase solúvel
TCA	Ácido tricloroacético
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TREM-1	Receptor Desencadeador Expresso nas Células Mielóides Tipo 1
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
VAP	Ventilator-associated pneumonia
VWF	<i>Von willebrand ultralargo</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 DEFINIÇÕES DA SEPSE	17
1.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA SEPSE	21
1.3 ESTUDOS PROTEÔMICOS DA SEPSE	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 GERAL.....	25
2.2 ESPECÍFICOS.....	25
3. MÉTODOS	26
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO I – MICROBIOLOGICAL PROFILE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF PATIENTS WITH SEPSIS IN AN INTENSIVE CARE UNIT	33
1. INTRODUCTION	34
2. METHODS.....	35
3. RESULTS.....	36
4. DISCUSSION	43
5. CONCLUSION	47
REFERENCES	48
CAPÍTULO II – ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE PACIENTES COM SEPSE INTERNADOS EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. MÉTODOS	55
2.1 DESENHO DO ESTUDO	55
2.2 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS	55
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
3. RESULTADOS	57
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
CAPÍTULO III – ANÁLISES PROTEÔMICAS DO SORO DE PACIENTES COM SEPSE INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: DIFERENÇAS ENTRE SOBREVIVENTES E NÃO SOBREVIVENTES	74

1. INTRODUÇÃO	75
2. MÉTODOS	79
2.1 DESENHO EXPERIMENTAL	79
2.2 PREPARO DA AMOSTRA.....	79
2.3 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)	80
2.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DIFERENCIAL DOS SPOTS NOS GÉIS 2DE	80
3. RESULTADOS	82
3.1 ANÁLISE ENTRE OS TRATAMENTOS CONTROLE, ALTA E ÓBITO	82
3.2 ANÁLISE ENTRE OS TEMPOS DE INTERNAÇÃO	88
4. DISCUSSÃO	92
5. CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	95
4. CONCLUSÃO GERAL	99
ANEXO	101

1. INTRODUÇÃO GERAL

As Infecções Relacionadas com a Assistência à Saúde (IRAS) são infecções cuja aquisição está relacionada com a hospitalização ou procedimento assistencial de saúde (WHO, 2016), por exemplo, das cirurgias ou uso de dispositivos como cateteres e ventilador mecânico (BRASIL, 2017a). As IRAS são consideradas como evento adverso, acometendo 10 a cada 100 pacientes hospitalizados nos países em desenvolvimento (WHO, 2016). É importante destacar que a ocorrência das IRAS é diferente nos países, segundo a renda de cada qual. Nas nações de baixa e média renda a frequência das IRAS se encontra, segundo a Organização Mundial de saúde (OMS), pelo menos duas a três vezes maior do que naquelas de alta renda (WHO, 2016).

Devido a importância do conhecimento sobre as IRAS, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que a ocorrência das mesmas seja regularmente registrada em seu sistema de informação, uma vez que são infecções que elevam o tempo de internação, a morbidade e a mortalidade dos pacientes, bem como os custos dos serviços de saúde (BRASIL, 2017 b; LEAL; FREITAS, 2021). No entanto, no Brasil, muitas ações ainda são necessárias para aumentar a adesão às notificações das IRAS nos hospitais (ANVISA, 2016).

As principais IRAS estão relacionadas com a infecção da corrente sanguínea, pneumonia, infecção do trato urinário, infecção relacionada ao cateter (ECDC, 2017). Nesse contexto, importa destacar as Unidades de Terapia Intensiva (UTI), nas quais os pacientes estão sujeitos a diversos procedimentos invasivos que aumentam as chances de infecções (PIZA; CAMARGO, 2016; ECDC, 2017).

Indivíduos com infecção podem evoluir para sepse, uma síndrome complexa reconhecida como uma das mais importantes causas de morte por infecção em todo o mundo (SINGER *et al.*, 2016). Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi verificar os parâmetros bioquímicos, microbiológicos e proteômicos de pacientes com sepse, internados em uma UTI.

1.1 DEFINIÇÕES DA SEPSE

A incidência de *seps*e nas UTI brasileiras é elevada, bem como a taxa de letalidade, que em 2014 foi de 55,7% (MACHADO *et al.*, 2017). Além disso, pacientes diagnosticados com *seps*e necessitam de cuidados intensivos que demandam altos custos aos sistemas de saúde (NEIRA; HAMACHER; JAPIASSU, 2018).

A definição de *seps*e apresenta alterações no transcorrer das pesquisas no tempo, o que levanta discussão quanto aos critérios que definem os pacientes com *seps*e e choque séptico (BONE *et al.*, 1992; LEVY *et al.*, 2003; SINGER *et al.*, 2016). Em 1991 o *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) definiram quatro conceitos relacionados: (i) síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS); (ii) *seps*e ; (iii) *seps*e grave, associada à disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão arterial e; (iv) choque séptico que, por sua vez, é tida como hipotensão arterial, apesar da ressuscitação fluídica adequada (BONE *et al.*, 1992).

Em 2001, durante a Conferência Internacional de Definições de Seps, que incluiu membros da ACCP, SCCM, *American Thoracic Society* (ATS), *European Society for Intensive Care Medicine* (ESICM) e da *Surgical Infection Society* (SIS), as definições propostas em 1991 foram atualizadas sem muitas novidades. O consenso manteve as definições de *seps*e como SIRS devido a infecção (presumida ou confirmada). E *seps*e grave como *seps*e associada à disfunção orgânica aguda. Entretanto, novos critérios para SIRS foram definidos, juntamente com as variáveis de disfunção de órgãos, indicativas de *seps*e grave (LEVY *et al.*, 2003).

Mais tarde, no ano de 2016, a SCCM e a ESICM promoveram conferência com o objetivo de chegarem a novo consenso sobre as definições de *seps*e. Por meio de evidências científicas, revisaram e apresentaram os atuais conceitos. O documento produzido passou a ser denominado como *SEPSIS-3*. Ademais, chamaram, retrospectivamente, as definições propostas no consenso de 1992 de *SEPSIS-1* (BONE *et al.*, 1992) e as definições 2001 de *SEPSIS-2* (Levy *et al.*, 2003). As definições detalhadas de cada consenso estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Definições de Sepses.

<i>SEPSE 1</i>
<p>Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) Resposta manifestada por duas ou mais das seguintes condições:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Temperatura > 38°C ou < 36°C 2- Frequência cardíaca > 90/minuto 3- Frequência respiratória > 20/minuto (ou PaCO₂ < 32mmHg) 4- Glóbulos Brancos > 12.000cel/μL ou < 4.000cel/μL (ou > 10% formas imaturas) <p>Sepses Resposta sistêmica à infecção, manifestada por dois ou mais critérios SIRS como resultado de infecção</p> <p>Sepses graves Sepses associada a disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão</p> <p>Choque séptico Induzido por <i>sepses</i> com hipotensão apesar de adequada ressuscitação com fluidos.</p>
<i>SEPSE 2</i>
<p>Critérios para <i>sepses</i> - Infecção documentada ou suspeitada em algum dos critérios</p> <p>Variáveis gerais Febre (Temperatura central > 38,3°C) Hipotermia (temperatura central < 36 °C) Frequência cardíaca > 90 bpm ou 2 DP acima do valor normal para a idade Taquipnéia Estado mental alterado Edema significativo ou balanço hídrico positivo (>20 ml/kg em 24 horas) Hiperglicemia na ausência de diabetes (glicemia > 120 mg/dL)</p> <p>Variáveis inflamatórias Leucocitose (contagem de leucócitos > 12.000/mm³) Leucopenia (contagem de leucócitos < 4000/mm³) Contagem de leucócitos totais normal com > 10% de formas imaturas Proteína C reativa plasmática > 2 DP acima do valor normal Procalcitonina plasmática > 2 SD acima do valor normal</p> <p>Variáveis hemodinâmicas Hipotensão arterial (PAS < 90 mmHg, PAM < 70 mmHg, ou uma diminuição da PAS > 40 mmHg em adolescentes ou PAS/PAM < 2 DP abaixo do normal para a idade)</p>

Continua.

Continuação Quadro 1.

Saturação de oxigênio venoso misto > 70% (não válido para crianças)
Índice cardíaco 3,5 l/min (não válido para crianças)

Variáveis de disfunção orgânica

Hipoxemia arterial (PaO₂ / FIO₂ < 300)
Oligúria aguda (diurese < 0,5 ml/ kg/h
Creatinina > 0,5 mg /dL
Anormalidades de coagulação (INR >1,5 ou KTTTP > 60 segundos)
Íleo (ausência de ruídos hidroaéreos)
Trombocitopenia (contagem de plaquetas <100.000/mm³)
Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total >4 mg/dL)

Variáveis de perfusão tecidual

Hiperlactatemia (>1 mmol / L)
Enchimento capilar reduzido
DP: desvio padrão. PAS (Pressão arterial sistólica), PAM (Pressão Arterial média)
PaO₂(Pressão parcial de oxigênio arterial), FiO₂ (Fração Inspirada de oxigênio)
INR (*International Normalized ratio*), KTTTP (Tempo de tromboplastina parcial)

Sepse Grave

Sepse + Disfunção orgânica

Choque séptico

Sepse + Hipotensão mesmo com reanimação volêmica adequada

SEPSE 3**Sepse**

Disfunção orgânica com risco de morte decorrente de uma resposta desregulada do organismo a uma infecção. Caracterizada com aumento do escore SOFA ≥ 2 pontos

Sepse grave: Termo abandonado

Choque séptico

Pacientes com sepsis e mesmo após reposição volêmica vigorosa, necessitam do uso de drogas vasoativas a fim de manter uma pressão arterial média (PAM) maior ou igual a 65 mm Hg e que possuem nível de lactato sérico maior que 2 mmol/L

Legenda: DP: desvio padrão; FiO₂: fração inspirada de oxigênio; INR: *international normalized ratio*; KTTTP: tempo de tromboplastina parcial; PaCO₂: pressão parcial de dióxido de carbono; PAM: pressão arterial média; PaO₂: pressão parcial de oxigênio arterial; PAS: Pressão arterial sistólica; SOFA: *Sepsis-related Organ Failure Assessment*.

Fonte: Elaborado pela autora (2021), adaptado de BONE *et al.* (1992); Levy *et al.* (2003); SINGER *et al.* (2016).

Dessa forma, definiu-se que *sepse* é síndrome complexa caracterizada por disfunção orgânica, causada pela resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção (SINGER *et al.*, 2016). Para caracterizar clinicamente os pacientes com suspeita de infecção e avaliar a disfunção orgânica, dentro das UTI, o atual manejo do *sepse-3* recomenda o uso do escore *Sequential Organ Failure Assessment Score* (SOFA). O escore SOFA (Quadro 2) exige resultados de testes laboratoriais (plaquetas, creatinina, bilirrubinas, gasometria arterial), e varia de 0 a 4, de forma que uma pontuação igual ou superior a 2 representa disfunção orgânica (SINGER *et al.*, 2016).

Quadro 2 – Critérios para cálculo do escore SOFA.

SOFA					
	0	1	2	3	4
PaO ₂ /FiO ₂	≥400	<400	<300	<200 Com suporte ventilatório	<100 com suporte ventilatório
Plaquetas (10 ³)	≥150	<150	<100	<50	<20
Bilirrubina	<1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	≥12
Cardiovascular	PAM ≥70	PAM <70	Dopamina < 5 ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina (5,1-15) Ou adrenalina ≤ 0,1 ou noradrenalina ≤0,1	Dopamina >15 ou adrenalina >0,1 ou noradrenalina >0,1
Glasgow	15	14-13	12-10	9-6	<6
Creatinina ou débito urinário (DU) (mL/dia)	<1,2	1,2-1,9	2-3,4	3,5-4,9 ou DU <500	>5 ou DU <200

Legenda: FiO₂: Fração Inspirada de oxigênio, PAM: Pressão Arterial Média PaO₂: Pressão Parcial de Oxigênio.

Fonte: Elaborado pela autora (2021), adaptado de Singer *et al.* (2016).

Mudanças nas definições, critérios de triagem e diagnóstico da *sepse* podem alterar os dados epidemiológicos. Shankar-Hari *et al.* (2017) encontraram diferenças ao comparecer a incidência, desfecho e validade preditiva de *sepse* e choque séptico, considerando os critérios de *sepse-2* e *sepse-3*. *Sepse*, de acordo com critérios de

sepsis-3, foi identificada com similaridade de 92% em comparação aos critérios de sepsis-2. Já para o choque séptico, as definições de sepsis-3 apresentam melhor validade preditiva, com seleção de poucos pacientes, mas, considerando aqueles com maior gravidade.

O diagnóstico precoce da *sepsis* é importante para orientar o tratamento em tempo oportuno e consequentemente evitar o agravamento do quadro clínico (ENGELEN *et al.*, 2018). Nesse sentido, diversos estudos procuram um biomarcador ou um conjunto de critérios que consigam identificar precocemente a *sepsis* (DECOUX *et al.*, 2015; LANGLEY *et al.*, 2013; LUDWIG; HUMMON, 2017; OVED *et al.*, 2015; ROGERS *et al.*, 2014; SCHMERLER *et al.*, 2012).

Singer *et al.* (2016) afirmam que a inexistência de um teste de diagnóstico padrão ouro para diagnosticar a *sepsis*, questões precoces da resposta pró e anti-inflamatórias devem ser analisadas. Nesse contexto, o que vai diferenciar a *sepsis* de um outro tipo de infecção é a resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção, juntamente com a disfunção orgânica, a qual pode ser oculta. Assim, em pacientes com ou sem infecção confirmada a disfunção orgânica deve ser considerada.

Um estudo recente menciona que, apesar do número de estudos sobre biomarcadores na *sepsis* estar em estado de crescimento, a descoberta de novos biomarcadores não apresentou o mesmo aumento (PIERRAKOS *et al.*, 2020). A proteína C-reativa e a procalcitonina são os biomarcadores mais frequentemente estudados, seguidos pela interleucina-6, presepsina e CD64 de neutrófilos. Revisão realizado por Teggert, Datta e Ali (2020) confirma esses biomarcadores como os mais estudados, acrescentando ainda outros, como TREM-1 (Receptor desencadeador expresso nas células mielóides Tipo 1), lactato, relação de neutrófilos/linfócitos, e suPAR (receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase solúvel) (TEGGERT; DATTA; ALI, 2020). No entanto, nenhum desses marcadores foi validado como critério para uso clínico na *sepsis*.

1.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA SEPSIS

A *sepsis* se desenvolve de acordo com as relações entre o hospedeiro, o microorganismo e a resposta inflamatória desencadeada de forma exacerbada. Algumas variáveis, como o estado nutricional, a presença de comorbidades e idade do hospedeiro, bem como a virulência das cepas e o sítio de infecção, estão

diretamente relacionadas com a evolução do quadro clínico do paciente (GUANG *et al.*; 2021, ARINA; SINGER, 2021).

A fisiopatologia da *sepse* compreende mecanismos variados que irão surgir após o organismo se expor para um patógeno ou as toxinas deste, ativando os neutrófilos, plaquetas e monócitos, de forma a desencadear resposta imune mediada por citocinas, gerando inflamação tecidual. A exacerbação e descontrole dessa resposta causa lesão ao endotélio vascular, aumentando a vasoconstrição e ativando as vias inflamatórias (GUANG *et al.*, 2021).

É importante considerar, sobre o desenvolvimento da *sepse*, se os padrões de imunidade, a inflamação e a coagulação estão interrelacionados (ARINA; SINGER 2021). O microrganismo infectante e o hospedeiro se interagem por meio da mediação de receptores de reconhecimento de padrão (PRR), os quais detectam os padrões moleculares associados ao patógenos (PAMP), que são substâncias produzidas pelos microrganismos. Esses PRRs reconhecem os padrões moleculares associados com a lesão (DAMP), que são produtos decorrentes da resposta do hospedeiro. Da mesma forma, são liberadas as armadilhas extracelulares de neutrófilos (TNEs), as quais, embora contribuam para eliminar o patógeno, sua formação excessiva na *sepse* resulta em inflamação e danos tecidual (DENNING *et al.*, 2019).

No combate à infecção, têm-se os mecanismos de reconhecimento da presença do microrganismo, com destaque para o papel do endotélio na inflamação e imunidade inata e adaptativa. Isso é importante porque a *sepse* induz um deslocamento das células endoteliais em direção a um fenótipo pró-coagulante e antifibrinolítico (JOFFRE; HELLMAN; INCE, 2020).

Resumidamente, no período inflamatório acontece a vasodilatação do endotélio regulada por moléculas vasoativas como óxido nítrico (NO) e prostaciclina. A secreção dos mediadores de inflamação local leva ao extravasamento capilar, aumentando a permeabilidade vascular. Esta inflamação induz ao estado pró-coagulante, aumentando a expressão de fator tissular nos monócitos e nas células endoteliais, induzindo o início da cascata coagulação. Os níveis de antitrombina e do inibidor da via do fator tecidual diminuem devido as condições inflamatórias. Assim, é configurado um estado pró-inflamatório que pode diminuir a expressão endotelial de trombosmodulina, que contribui com a diminuição da ativação da proteína C. Após este estado inflamatório as células endoteliais podem iniciar resposta imune inata. As

células endoteliais, devido a esses fatores inflamatórios, como fator de necrose tumoral ou em resposta à detecção de PAMP, aumentam a expressão de moléculas de adesão de neutrófilo, molécula de adesão intercelular 1, E-selectina e P-selectina. Tal fato pode levar ao aumento da adesão de leucócitos e plaquetas e transmigração de leucócitos através da parede vascular (PONS *et al.*, 2019).

Na *sepsis* os neutrófilos podem também liberar cromatina, proteínas nucleares e serina proteases extracelularmente para formar TNEs. TNEs podem prender patógenos e limitar sua dispersão, inicia a coagulação e induz lesão endotelial. Uma resposta imune adaptativa pode acontecer devido a uma infecção prolongada (PONS *et al.*, 2019).

Em relação aos mecanismos de ativação da coagulação durante a *sepsis*, observa-se que as células endoteliais danificadas modificam suas propriedades anticoagulantes para pró-coagulantes por meio da ruptura do glicocálice e da expressão do fator de *von willebrand ultralargo* (VWF). Os neutrófilos atuam na ativação da coagulação ao liberarem as NETs, compostas de DNA pró-coagulante, histonas e outros DAMPs (IBA; LEVY, 2020)

Assim a infecção instalada desencadeia perturbações circulatórias e metabólicas que podem ser controladas e apropriadas, ou desreguladas, levando a graus crescentes de disfunção orgânica ao hospedeiro. Há relatos defendendo a disfunção orgânica como um desligamento metabólico do órgão que impede a atividade celular normal, podendo representar uma resposta adaptativa que é capaz de proteger o órgão de danos permanentes e irreversíveis causados pela infecção e que permite a recuperação (ARINA; SINGER, 2021).

1.3 ESTUDOS PROTEÔMICOS DA SEPSIS

Uma ferramenta importante para descoberta de biomarcadores para diversas doenças são as “ômicas”. Elas podem caracterizar e quantificar moléculas relacionadas com a estrutura, função e dinâmica de um organismo, englobando a genômica, epigenética, transcriptômica, proteômica e metabolômica, e são cada vez mais factíveis e menos dispendiosas (SKIBSTED *et al.*, 2013).

A análise proteômica pode ser realizada em diferentes amostras, incluindo tecidos, urina, sangue e outros. Os materiais mais utilizados de pacientes com *sepsis* são o plasma e o soro sanguíneo, as quais, através da eletroforese em gel

bidimensional, vêm contribuindo para melhor entendimento dessa doença (SHARMA; SALOMÃO, 2018; SIQUIRA-BATISTA, 2012). Exemplificando resumidamente, as proteínas são separadas por eletroforese bidimensional e posteriormente identificadas por espectrometria de massas. Essa identificação melhora a compreensão dos processos moleculares alterados nas doenças, como na *sepse* (BLANGY-LETHEULE *et al.*, 2020; LUDWIG; HUMMON, 2017; PAIVA; DAVID; DOMONT, 2010).

Embora se tenha diversos estudos que relacionam a proteômica com a *sepse* (ENGELEN *et al.*, 2018, SHARMA; SALOMÃO, 2018), as investigações com análises proteômicas de pacientes com *sepse* ao longo do tempo ainda são escassos, o que indica a necessidade de estudos longitudinais sobre o assunto (HAYASHI *et al.*, 2019). Devem ser destacadas duas investigações utilizando análise proteômica urinária que identificaram proteínas diferencialmente expressas envolvidas na inflamação, imunidade e processos estruturais ou formação do citoesqueleto celular (SU *et al.*, 2013, a), e proteínas associadas aos processos biológicos de homeostase lipídica, desenvolvimento da cartilagem celular e transporte de íons férrico (SU *et al.*, 2013, b).

Observa-se diferenças ao longo do tempo na expressão proteica entre pacientes com *sepse* que sobreviveram e com desfecho ruim. Três proteínas identificadas (cadeias beta da hemoglobina, haptoglobina e ceruloplasmina) apresentaram quedas significativas exclusivamente no grupo do desfecho ruim, o que não ocorreu no grupo dos sobreviventes, as quais não mudaram ao longo do tempo (HAYASHI *et al.*, 2019).

É improvável que um único biomarcador produza todas as informações necessárias sobre a *sepse* (SINGER, 2019), de forma que o tratamento deverá ser direcionado por um conjunto de biomarcadores, analisados individualmente, levando em consideração as vias de resposta do hospedeiro. Assim, uma abordagem personalizada com terapias individualizadas específica deverá ser recomendada, e não simplesmente baseada na apresentação clínica do paciente (ENGELEN *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar os parâmetros bioquímicos, microbiológicos e proteômicos de pacientes com *seps*e internados em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital da Zona da Mata de Minas Gerais.

2.2 ESPECÍFICOS

Descrever os principais microrganismos e avaliar a resistência antimicrobiana em amostras clínicas de pacientes internados com *seps*e em uma UTI de adultos;

Comparar os parâmetros bioquímicos e as relações entre neutrófilo/linfócitos (RNL), plaquetas/linfócitos (RPL) e linfócitos/monócitos (RLM) de pacientes de uma UTI, que apresentaram *seps*e;

Identificar alterações na quantidade e na abundância de *spots* de proteínas do soro sanguíneo de pacientes com *seps*e, com base no padrão de tempo e desfecho da doença.

3. MÉTODOS

Este estudo – caracterizado como um estudo prospectivo e observacional – teve início em janeiro de 2011, com a coleta de dados referentes aos aspectos clínicos dos pacientes que apresentaram o diagnóstico de *seps*e após admissão na UTI. O projeto de pesquisa teve aprovação por parte do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com seres humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) parecer de número 88/2011 (Anexo 1). Para a realização do estudo foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do responsável legal de cada paciente, o qual foi enfatizado os riscos e benefícios da investigação, além de explicitar a garantia ao sigilo sobre a identidade dos sujeitos de pesquisa e a veiculação apenas em meio cientificamente reconhecido.

Os dados clínicos foram coletados a partir do prontuário em um questionário próprio. As variáveis estudadas incluíram idade, sexo, período de internação, etnia, dispositivos invasivos utilizados, valores do escore SOFA (calculados a posteriori), dados relativos às intervenções terapêuticas (esquemas antimicrobianos utilizados), registros relativos as culturas microbiológicas e a sensibilidade antimicrobiana apresentadas por essas culturas. Além dessas informações, foram selecionados resultados laboratoriais como níveis de leucócitos, plaquetas, creatinina, uréia, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular media, concentração corpuscular media, parâmetros da gasometria arterial como valores de pH, FiO₂ (Fração Inspirada de Oxigênio), Pressão Parcial de CO₂, Pressão Parcial de Oxigênio, Relação PaO₂/FiO₂, Bicarbonato e também a Relação Neutrófilo-Linfócito, Relação Plaqueta-Linfócito, Relação Linfócito-Monócito. Os enfermos serão acompanhados até o desfecho, alta ou óbito da UTI.

Juntamente com as informações clínicas foram coletadas amostras de sangue venoso (5mL sem anticoagulante) dos participantes em tubos do Sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson). Essas amostras de sangue foram rapidamente centrifugadas a 1100g por 15 minutos, para separação do plasma e do soro. O soro dos pacientes com *seps*e foi armazenado em freezer -80 para conservação das amostras. Nesse período os pacientes participantes do estudo foram clinicamente caracterizados com *seps*e (*Sepsis-2*) segundo as recomendações de Levy *et al.* (2003) de acordo com o Quadro 3.

Quadro 3 – Definições de SIRS e Sepse.

SIRS	<p>Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica, caracterizada por ser uma resposta inespecífica do organismo a uma variedade de situações que geram inflamação.</p> <p>Para sua detecção, são necessárias duas das seguintes condições:</p> <p>Temperatura > 38,0 °C ou < 36,0 °C</p> <p>Frequência cardíaca > 90 bpm</p> <p>Frequência respiratória > 20 irpm ou PaCO₂ < 32 mmHg</p> <p>Leucócitos > 12.000/mm³ ou < 4.000/mm³ ou > 10% de bastões</p>
Sepse	<p>SIRS desencadeada por infecção bacteriana, viral, fúngica ou parasitária.</p>

Legenda: PaCO₂: pressão parcial de dióxido de carbono, SIRS: Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica.

Fonte: Elaborado pela autora (2021), adaptado de Levy *et al.* (2003).

Em outubro de 2019 dando prosseguimento a pesquisa, foram analisadas as informações clínicas, microbiológicas e de resistência antimicrobiana dos 19 pacientes participantes do estudo com *sepse* (*Sepsis-2*). Após esta etapa, iniciaram-se as análises proteômicas do soro dos pacientes com *sepse*. Primeiramente, foram excluídos os pacientes que não tinham a quantidade de soro sanguíneo suficiente para as análises proteômicas e posteriormente esses pacientes foram reclassificados de acordo com as definições de *Sepsis-3* (SINGER *et al.* 2016), ou seja, pacientes como disfunção orgânica caracterizado com um score SOFA de 2 pontos ou mais.

Dos 19 pacientes, 7 apresentaram todos os critérios definidos. Para esses enfermos foram procedidas as análises ao longo do tempo dos parâmetros bioquímicos e proteômicas em três períodos: T1, T2 e T3. O T1 corresponde ao primeiro dia de internação na UTI, T2 refere aproximadamente à metade de internação e T3 o último dia de internação antes do desfecho alta ou óbito. O período de internação de cada paciente foi diferente como mostra o Quadro 4.

Quadro 4 – Período de internação dos participantes do estudo.

Paciente	T1	T2	T3	Desfecho
Dia de Internação na UTI				
Paciente 1	Dia 01	Dia 05	Dia 12	Alta
Paciente 2	Dia 01	Dia 02	Dia 04	Alta
Paciente 3	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Alta
Paciente 4	Dia 01	Dia 13	Dia 29	Óbito
Paciente 5	Dia 01	Dia 02	Dia 05	Óbito
Paciente 6	Dia 01	Dia 23	Dia 46	Óbito
Paciente 7	Dia 01	Dia 19	Dia 36	Óbito

Fonte: Dados da pesquisa.

Devido a pandemia de COVID-19, não foi possível caracterizar as proteínas identificadas nos *spots* dos géis 2D. Etapa importante que será concluída em momento oportuno.

Esse documento está organizado em três capítulos. No capítulo I foram descritos os principais microrganismos encontrados nas amostras clínicas dos pacientes internados com *sepsis* e a resistência antimicrobiana apresentada por esses patógenos relacionados à colonização e à infecção. No capítulo II foram comparados ao longo do tempo, os parâmetros bioquímicos e as relações entre neutrófilo/linfócitos (RNL) plaquetas/linfócitos (RPL) e linfócitos/monócitos (RLM) de pacientes com *sepsis* que sobreviveram ou não. Por fim, no capítulo III realizou-se um estudo descrevendo os *spots* de proteínas encontrados ao longo do tempo, com diferenças estatísticas nas comparações entre pacientes com *sepsis* que receberam alta, e que foram a óbito, com um controle sem infecção.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. Brasília, 30 de dezembro de 2016.

ARINA, Pietro; SINGER, Mervyn. Pathophysiology of sepsis, *Current Opinion in Anaesthesiology*. V.34, n.2, p. 77-84, April 2021. doi: 10.1097/ACO.0000000000000963

Blangy-Letheule A., Persello A., Rozec B., De Waard M., Lauzier B. New Approaches to Identify Sepsis Biomarkers: The Importance of Model and Sample Source for Mass Spectrometry", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2020, Article ID 6681073, 10 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6681073>

BONE, R. C. *et al.* American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine consensus conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med.**, v. 20, p.864-874, 1992.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. 2 ed. Brasília: ANVISA, 86p. 2017. (a)

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasília: Anvisa.122p. 2017 (b)

DECOUX, A. *et al.* Plasma glycoproteomics reveals sepsis outcomes linked to distinct proteins in common pathways. **Crit Care Med.**, v. 43, n. 10, p. 2049–2058, 2015. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001134>.

DENNING, N. L. *et al.* DAMPs and NETs in sepsis. *Front Immunol*. V.10, p.2536. 2019.

ECDC, EUROPEAN COMMISSION. **A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR)**. 2017. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_action_plan_2017_en.pdf Acesso: 14 abr. 2020.

ENGELLEN, T. S. R. *et al.* Biomarkers in sepsis. **Crit Care Clin.**, v. 34, p. 139-152, 2018.

HAYASHI, S. *et al.* Multiple biomarkers of sepsis identified by novel time-lapse proteomics of patient serum. **PLoS One**, v. 14, n. 9, p1-25. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222403>

IBA, T.; LEVY, J.H. Sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Anesthesiology*. V.132, p.1238–1245, 2020;

JOFFRE, J.; HELLMAN, J.; INCE, C Ait-Oufella H. Endothelial responses in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*; v.202, p.361–370, 2020

LANGLEY, R. J. *et al.* An integrated clinic-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. **Sci Transl Med.**, v. 5, n. 195 pp. 195ra95, 2013.
DOI:10.1126/scitranslmed.3005893

LEAL, M; A.; FREITAS, A. A. V. Costs of healthcare-associated infections in an Intensive Care Unit. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 74, n. 1, p. 1-6. , 2021.
<https://doi.org/10.1590/0034-7167-2020-0275>.

LEVY, M.M., FINK, M.P., MARSHALL, J.C. *et al.* 2001
SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* v. 29, p. 530–538, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-1662-x>

LUDWIG, K. R.; HUMMON, A. B. Mass spectrometry for the discovery of biomarkers of sepsis. **Mol Biosystems**, v. 13, p. 648–664, 2017.

MACHADO, F. R. *et al.* SPREAD Investigators; Latin American Sepsis Institute Network. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (The Sepsis Prevalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet Infect Dis.**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.

NEIRA, R. A. Q.; HAMACHER, S.; JAPIASSU, A. M. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. 1-15, 2018.

OVED, K. *et al.* A novel host-proteome signature for distinguishing between acute bacterial and viral infections. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p.1-18, 2015.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120012>

PAIVA, R. A.; DAVID, C. M.; DOMONT, G. B. Proteomics in sepsis: a pilot study. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 22, p. 403-412, 2010.

PIERRAKOS, C. *et al.* Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care* v. 24, n. 1, p.287, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02993-5>

PIZA, F. M. T.; CAMARGO, T. Z. S. *In*: KNOBEL, E. **Condutas no paciente grave**. Seção: 12. CAMARGO, L. F. A.; CAMARGO, T. Z. S. *Infecções Antimicrobianas*. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu. p. 1857-1866, 2016.

PONS, S. *et al.* Immune consequences of endothelial cells' activation and dysfunction during sepsis. *Crit Care Clin*. V. 36, p.401–413, 2020

ROGERS, A. J. *et al.* Metabolomic derangements are associated with mortality in critically ill adult patients. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p.1-7, 2014.

SCHMERLER, D. *et al.* Targeted metabolomics for discrimination of systemic inflammatory disorders in critically ill patients. **J Lipid Res.**, v. 53, n. 7, p. 1369-1375, 2012.

SHANKAR-HARI, M. Epidemiology of sepsis and septic shock in critical care units: comparison between sepsis-2 and sepsis-3 populations using a national critical care database. **British Journal of Anaesthesia**, v. 119, n. 4, p. 626–636, 2017.

SHARMA, N. K.; SALOMAO, R. Sepsis Through the Eyes of Proteomics: The Progress in the Last Decade. **Shock.**, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2017.

SINGER, M. Biomarkers for sepsis – past, present and future. *Qatar Medical Journal* vol. 2019, n.2, p.8. 7 Nov. 2019, doi:10.5339/qmj.2019.qccc.8

SINGER, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA**, v. 315, p. 801-810, 2016.

SIQUEIRA-BATISTA R.; MENDONÇA, E. G.; GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; MIYADAHIRA, R.; ALVAREZ-PEREZ, M. C *et al.* . Atualidades proteômicas na sepse. *Rev. Assoc. Med. Bras.* June; v.58, n.3, p. 376-382, 2012

SKIBSTED, S. *et al.*” *Critical care* (London, England) v.17, n.5, p. 231. 4 Oct. 2013, doi:10.1186/cc12693

SU, L. *et al.* Identification of Novel Biomarkers for Sepsis Prognosis via Urinary Proteomic Analysis Using iTRAQ Labeling and 2D-LC-MS/MS. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54237 2013. (b).

SU, L. *et al.* Urinary proteomics analysis for sepsis biomarkers with iTRAQ labeling and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Trauma Acute Care Surg.**, v. 74, n. 3, p. 940-945, 2013. (a).

TEGGERT, A.; DATTA, H.; ALI, Z. Biomarkers for Pointof-Care Diagnosis of Sepsis. **Micromachines**, v. 11, n. 3, p. 286, 2020.

WHO. World Health Organization. **Health care-associated infections fact sheet.** 2016. Disponível:

https://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf. Acesso: 06 de julho 2020

CAPÍTULO I

**MICROBIOLOGICAL PROFILE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF
PATIENTS WITH SEPSIS IN AN INTENSIVE CARE UNIT**

CAPÍTULO I – MICROBIOLOGICAL PROFILE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF PATIENTS WITH SEPSIS IN AN INTENSIVE CARE UNIT

ABSTRACT

Antimicrobial resistance occurs due to the natural selection of resistant bacterial strains, induced by the use of antimicrobials in the treatment of diseases. An action that can help to improve the conscious use of antimicrobials is the monitoring of the microbiological and resistance profile in different clinical samples. This work aims to describe the main microorganisms found in the clinical samples of patients with sepsis, in an adult ICU and the antimicrobial resistance presented by these pathogens. The data analyzed were obtained from hospitalized patients' medical records. Among the microbiological cultures analyzed, the majority presented colonization only in the armpits and tracheal secretion, being the typically colonized sites. The main colonizing microorganisms were *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., and *Acinetobacter* spp. *Pseudomonas aeruginosa* was the main agent found during infections. The urinary tract infection was the most frequent. In the investigated cultures, related to both colonization and infection, ciprofloxacin was the antimicrobial to which bacteria were most resistant. We conclude that *P. aeruginosa* represents one of the main species in the colonization of inpatients. Furthermore, the increased resistance profile for ciprofloxacin and cefepime reinforces the need to improve adherence to contact precautions and better use of these medications since both have, until now, an important antipseudomonal activity.

Keywords: Cross Infection. Drug Resistance Bacterial. Risk factors.

1. INTRODUCTION

Patients who require Intensive Care Unit (ICU) admission are subject to several invasive procedures. These procedures break the natural barriers to protect the skin and mucosa by increasing the chance of infections (PIZA; CAMARGO 2016; EC, 2017). These infections are often caused by organisms already resistant to certain antimicrobials, such as enterobacteria, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem-resistant (WHO, 2017c).

In the United States, each year, one (1) out of every 25 inpatients has an infection related to hospital care, which increases the number of deaths and health care costs (ODPHP, 2019). In Brazil, it is no different; healthcare-associated infections (HAIs) considerably increase costs related to hospital care, in addition to increasing the length of stay, morbidity, and mortality of patients in health services (BRASIL, 2017).

The microbial profile in HAIs and what is related to colonization varies according to the type of ICU and knowing this profile can guide the empirical treatment of infections (BRASIL, 2019; VERSPORTEN *et al*; 2018). Nevertheless, in Brazil, there are no general data regarding the microbiological profile of colonization and infection for Brazilian ICUs, which limits the knowledge on this subject. In 2006, ANVISA started monitoring the sensitivity profile of priority agents of primary bloodstream infection (PBSI). However, it was only in 2013 that the first report with data on the resistance phenotypes of microorganisms responsible for causing PBSI, in Brazilian ICUs, was published (BRASIL, 2017). According to the World Health Organization (WHO), there is a worldwide consensus on the need to prevent and control the spread of antimicrobial-resistant microorganisms (WHO, 2017c).

In addition, a bulletin published by ANVISA highlights the goal achieved, with increased adherence by Brazilian states, of notifications of PBSI, Pneumonia Associated with ventilator-associated pneumonia (VAP) and Urinary Tract Infections (UTI) (BRASIL, 2019). Thus, there is recognition and effort of the Brazilian authorities regarding the knowledge of the main infections that affect hospitalized patients, as well as the prevention of HAIs (BRASIL, 2017).

In this context, this work aims to describe the main microorganisms and to evaluate the antimicrobial resistance in clinical samples of patients admitted with sepsis in an adult ICU.

2. METHODS

In this retrospective descriptive cohort study, records of patients over 18 years of age with sepsis, admitted to a public ICU located in the Southeast Region of Brazil, identified between May 2011 and July 2012, were analyzed.

Information from 19 patients clinically characterized with sepsis was analyzed (*Sepsis-2*), according to the recommendations of Levy *et al.* (2003), which defines characterizes sepsis as SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) triggered by bacterial, viral, fungal, or parasitic infection.

The project was approved by the ethics and research committee of the Universidade Federal de Viçosa opinion No. 88/2011. To accomplish the study, the legal guardian of each patient was asked to sign the Informed Consent Form (ICF).

The data source was secondary, collected from the patient's medical records. The collection included data on the identification of each patient, such as invasive procedures performed and antimicrobials prescribed throughout the treatment.

The profile of microorganisms found in clinical samples, as well as the resistance to antimicrobials, was obtained from the results of cultures and antibiograms made available in the patient's medical records, and the laboratory results of the hospital in question were considered. More than one culture per patient was considered and the data were analyzed by Excel 2010 to estimate the proportions.

3. RESULTS

We analyzed 19 medical records of patients who were admitted to the ICU with sepsis, characterized by letters A to T. Considering the age group, the elderly patients represented 52.6% of the sample. Regarding the period of hospitalization, it was verified that the majority, 47.4% of the patients, were hospitalized between 5 and 13 days. Concerning the outcome, 47.4% of the people were discharged and 52.6% died (Table1).

Table 1 – Characteristics of patients according to age, gender, period of hospitalization, and conclusion

Patient Characteristics	
Age in years	
15 - 24 (Youth)	2 (10,5%)
25 - 44 (Young Adult)	2 (10,5%)
45 – 59 (Adult)	3 (15,8%)
60 - 90 (Elderly)	10 (52,6%)
Over 90 (Very Elderly)	2 (10,5%)
Total	19 (100%)
Gender	
Male	10 (52,6%)
Female	9 (47,4)
Total	19 (100%)
ICU stay period	
≤ 3 days	6 (31,6%)
5-13 days	9 (47,4%)
≥ 23 days	4 (21,05%)
Total	19 (100%)
Conclusion	
Discharged	9 (47,4%)
Death	10 (52,6%)
Total	19 (100%)

Source: Survey's data.

The most used invasive devices by ICU patients with sepsis were the central venous catheter, mechanical respirator, and the urinary catheter with respectively 73%, 73%, and 68.4% of use among the patients under study. Parenteral nutrition (5.2%) and use of hemodialysis catheters (5.2%) were the least used devices among the patients in this work (Table 2).

Table 2 – Number of invasive devices used in patients

Devices	Total*
Parenteral Nutrition	01 (5,2%)
Hemodialysis Catheter	01 (5,2%)
Tracheostomy	02 (10,5%)
Central Venous Pressure Monitoring	03 (15,8%)
Enteral Nutrition	04 (21,0%)
Surgical Procedure	05 (26,3%)
Peripheral Venous Catheter	08 (42,0%)
Urinary Catheter	13 (68,4%)
Central Venous Catheter	14 (73,0%)
Mechanical Breather	14 (73,0%)

*N= 19 patients for each procedure
Source: Survey's data.

Still, 37 (100%) antimicrobials belonging to five different classes of antimicrobials (beta-lactams, nitroimidazoles, quinolones, lincosamides, and aminoglycosides) were prescribed during the period of hospitalization for the empirical treatment of infections presented by patients. The beta-lactams class was the most used, representing 56.8% of the total antimicrobial prescribed. The quinolones and lincosamides class were the least used, both prescribed for 8.1% of the patients in treatment (Table 3).

Table 3 – Frequency of prescribed antimicrobials during the period of hospitalization

Classes	Antimicrobials	Total
1- Betalactams:		
Cephalosporin 4th Generation	Cefepime	09
Cephalosporin 3rd Generation	Ceftriaxone	07
Penicillin + Inhibitors β -lactamase	Piperacillin + Tazobactam	02
Penicillin	Oxacillin	02
Carbapenems	Imipenem	01
Subtotal		21 (56,8%)
2- Nitroimidazole:		
	Metronidazole	05
Subtotal		05 (13,5%)
3- Quinolone:		
	Ciprofloxacin	02
	Levofloxacin	01
Subtotal		03 (8,1%)
4- Lincosamines:		
	Clindamycin	03
Subtotal		03 (8,1%)
5- Aminoglycoside:		
	Amikacin	01
	Clarithromycin	03
	Vancomycin	01
Subtotal		05 (13,5%)
Total		37 (100%)

Source: Survey's data.

Regarding the microbiology results per patient, 52.6% of the patients presented positive microbiology and the following microorganisms were found: *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp. *Enterobacter* spp. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. Polymicrobial cultures were found in 20.8% of the patients, that is, more than one microorganism was identified in the analyzed cultures. Only 5.2% of the patients presented negative culture and for 42% of the patients, no microbiological cultures were requested (Table 4).

Table 4 – Microbiology by patient during the treatment period.

Microbial agentes	Patients	Total
<i>Proteus vulgaris</i>	C	1 (5,2%)
<i>Klebsiella</i> spp.	D	1 (5,2%)
<i>Acinetobacter</i> spp.	E	1 (5,2%)
<i>Enterobacter</i> spp.	J	1 (5,2%)
<i>Escherichia coli</i>	B, H	2 (10,5%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Proteus</i> sp.	A	1 (5,2%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.	G, F	2 (10,5%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	K	1 (5,2%)
Negative Culture	L	1 (5,2%)
Unrealized Cultures	I, M, N, O, P, Q, R, S	8 (42 %)
Total	19	100%

Source: Survey's data.

Bacterial colonization was confirmed in six patients. Samples taken from the right and left axilla and tracheal secretion showed a higher number of positive cultures. In these cultures, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Enterobacter* spp. were found in a higher proportion. (Table 5).

Table 5 – Microorganism associated to colonization per culture site and per patient.

Local	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.	Total
RA	F, G, K	E, F	F, J	-	-	7 (26%)
LA	-	E, F	F, G, K, J	-	-	6 (22%)
TS	F, G	F, G, K, J	-	-	-	6 (22%)
CT	K	-	K	K	-	3 (11%)
SS	K	-	-	K	-	2 (7%)
WF	A	-	-	A	A	3 (11%)
Total	8 (29%)	8 (29%)	7 (25%)	3 (7%)	1 (3,7%)	27 (100%)

Legend: RA: right axilla, LA: Left Axilla, TS: Tracheal Secretion, CT: calcaneus tissue, SS: sacral scar, WF: wound fragment.

Source: Survey's data.

The bacterial infection was confirmed in five patients. The main site of infection was the urinary tract with a higher number of positive cultures. The microorganism found in a higher proportion was *P. aeruginosa* (Table 6).

Table 6 – Microorganism associated with infection per culture site and per patient

Local	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiela spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	Total
U	K	H	D		C	4 (40%)
VCT	K			K		2 (20%)
BF	K			K		2 (20%)
HCT	K					1 (10%)
AS		B				1 (10%)
Total	4 (40%)	2 (20%)	1(10%)	2(20%)	1(10%)	10 (100%)

Legend: U: Urine, VCT: Venous Catheter Tip, BF: Bone Fragment, HCT: Hemodialysis Catheter Tip, AS: Abscess Secretion.

Source: Survey's data.

It is observed that *Acinetobacter* spp. and *Enterobacter* spp. were related only to colonization and *Escherichia coli* and *Klebsiela* spp. only to infection. *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. and *Proteus* spp. were related to colonization and. *P. aeruginosa* infection was the most prevalent microorganism related to colonization and infection. The proportion of antimicrobial resistance was calculated for microorganisms found in cultures related to colonization and infection (Table 7). Regarding the resistance presented by the most abundant microorganisms related to colonization, *P. aeruginosa* presented 88% of resistance in its cultures to ciprofloxacin and *Acinetobacter* spp. presented 100% of its cultures resistant to ceftazidime, cefepime, and ciprofloxacin. Regarding *P. aeruginosa* infection, 100% of its crops were resistant to gentamicin, ciprofloxacin, and levofloxacin.

Table 7 – Microorganism resistance profile related to colonization and infection.

	COLLONIZATION					INFECTION					PROPORTION OF RESISTANCE		
	PSEU (n =9)	ACIN (n= 9)	ENT (n = 8)	ESTA (n=4)	PRO (n=1)	PSEU (n=4)	ESCH (n=2)	ESTA (n=2)	PRO (n=1) *	KLEB (n=1)	Isolated Exposed	Resistance Found	Proportion (%)
Amikacin	4 (44%)	0	1 (12,5%)	X	0	1 (25%)	0	X	0	0	35	6	6/35 (16%)
Gentamicin	5 (55%)	3 (33%)	1 (12,5%)	1 (25%)	0	4(100%)	0	0		0	44	14	14/44 (31%)
Ertapenem	X	X	2 (25%)	X	0	X	0	X		0	12	2	2/12 (16%)
Imipenem	1 (11%)	1 (11%)	2 (25%)	X	0	0	0	X		0	34	4	4/34 (11%)
Meropenem	0	1 (11%)	1 (12,5%)	X	0	0	X	X		X	31	2	2/31 (6%)
Cefaclor	X	X	X	X	X	X	X	X		1(100%)	1	1	1/1 (100%)
Cefoxitin	X	X	4 (50%)	X	0	X	0	X		0	12	4	4/12 (33%)
Cefotaxima	X	7 (77%)	X	X	X	X	X	X		X	9	7	7/9 (77%)
Ceftazidime	3 (33%)	9 (100%)	0	X	0	0	0	X		0	34	12	12/34 (35%)
Cettriaxone	X	7 (77%)	4 (50%)	X	0	X	0	X		1(100%)	24	12	12/24 (50%)
Cefepima	4 (44%)	9 (100%)	3 (37,5%)	X	0	1 (25%)	0	X		X	33	17	17/33 (51%)
Tazobactam	1 (11%)	X	0	X	X	X	0	X		X	19	1	1/19 (5%)
Ampicillin	X	2 (22%)	5 (62,5%)	4 (100%)	1 (100%)	X	0	2 (100%)		1(100%)	27	15	15/27 (55%)
Oxacillin	X	X	X	4 (100%)	X	X	X	1 (50%)		X	6	5	5/6 (83%)
Chloramphenicol	X	X	X	4 (100%)	X	X	X	1 (50%)		X	6	5	5/6(83%)
Clindamycin	X	X	X	4 (100%)	X	X	X	2 (100%)		X	6	6	6/6(100%)
Erythromycin	X	X	X	4 (100%)	X	X	X	2 (100%)		X	6	6	6/6 (100%)
Amox + clavul	X	X	5 (62,5%)	X	0	X	0	X	0	0	13	5	5/13 (38%)

Continues.

Continued table 7.

	COLLONIZATION					INFECTION					PROPORTION OF RESISTANCE		
	PSEU (n =9)	ACIN (n= 9)	ENT (n = 8)	ESTA (n=4)	PRO (n=1)	PSEU (n=4)	ESCH (n=2)	ESTA (n=2)	PRO (n=1) *	KLEB (n=1)	Isolated Exposed	Resistance Found	Proportion (%)
Ampi +sulb	X	X	6 (75%)	X	0	X	X	X		X	9	6	6/9 (66%)
Piperacillin + Tazobactam	3 (33%)	1 (11%)	1 (12,5%)	X	0	2 (50%)	0	X		X	33	7	7/33 (21%)
Aztreonam	3 (33%)	4 (44%)	1 (12,5%)	X	0	2 (50%)	0	X		1(100%)	34	11	11/34 (32%)
Nalidixic acid	X	X	X	X	X	X	1(50%)	X		1(100%)	3	2	2/3 (66%)
Ciprofloxacino	8 (88%)	9 (100%)	7 (87,5%)	4 (100%)	0	4 (100%)	0	1 (50%)		1(100%)	40	34	34/40 (85%)
Levofloxacino	7 (77%)	7 (77%)	5 (62,5%)	4 (100%)	0	4 (100%)	0	1 (50%)		X	39	28	28/39 (71%)
Norfloxacin	X	X	2 (25%)	X	X	1 (25%)	X	X		1(100%)	13	4	4/13 (30%)
Sulfazotrim	5 (55%)	7 (77%)	5 (62,5%)	0	1 (100%)	3 (75%)	0	0		1(100%)	40	22	22/40 (55%)
Tetracycline	2 (22%)	3 (33%)	2 (25%)	4 (100%)	1 (100%)	2 (50%)	0	1 (50%)		X	39	15	15/39 (38%)

PSEU: *P. aeruginosa*, ACIN: *Acinetobacter* spp. ENT: *Enterobacter* spp., ESTA: *Staphylococcus* spp., ESCH: *Escherichia coli*, PRO: *Proteus* spp., KLEB: *Klebsiella* spp. *data not available. X: not tested. Source: Survey's data.

4. DISCUSSION

Microbial resistance is related to the ability of microorganisms to use strategies to avoid the action of antimicrobials (BRASIL, 2007). Considered a serious public health problem worldwide, it has raised the need to improve their awareness and understanding, since the inappropriate use of antimicrobials accelerates this process (BRASIL, 2017; AIRES, 2017). Thus, in this study, the main microorganisms found were described and the antimicrobial resistance in clinical samples of patients admitted with sepsis in an adult ICU was evaluated.

P. aeruginosa, *Acinetobacter* spp. and *Enterobacter* spp. were the most prevalent microorganisms related to colonization. Confirming the results presented here, a previous study, when analyzing the incidence of axillary colonization by resistant microorganisms involving 837 patients in an ICU, found as colonizing microorganisms *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* (ARCANJO; OLIVEIRA, 2017). Another study demonstrates the presence of *Acinetobacter baumannii* and *P. aeruginosa* colonizing other sites such as nasal mucosa, groin, and perineum of patients in ICU (DAMACENO, 2014).

Observing the microbiological results related to infection, it is observed that, despite the limited number of cultures, *P. aeruginosa* was identified more often. *P. aeruginosa* infection draws attention in the study, as the same patient presented positive cultures for this pathogen in different anatomical sites, which demonstrates its ability to colonize different sites (CDC, 2016).

On the other hand, four (4) out of ten (10) patients presented positive cultures (colonization and/or infection) by more than one microorganism. Polymicrobial infections are not yet fully understood and may compromise the treatment of infections by the reciprocal, competitive, and cooperative interactions existing in the communities, which affects tolerance to antibiotics. The interactions formed in these communities are crucial for the growth and survival of these bacteria and for this reason, it is common the diversity of species — often found in the same culture (VOS *et al.*, 2017).

The ICU is a sector where there is a constant need to use different invasive devices. The use of these devices together with other factors such as the nature of the

procedure, the environment, the technique and the length of stay of the catheter are related to the development of infections (SOUSA, 2017), that may end up evolving into sepsis. As this study shows, 73% of the patients needed to use a central venous catheter and/or mechanical respirator, reaffirming the indispensable need for preventive and safe practices to be adhered to by health professionals to avoid *HAIs* (HOANG, 2018).

Within this context, it is important to highlight that microorganisms such as *P. aeruginosa*, can be transmitted through the hands of health professionals or by contaminated equipment. Thus, the proper hygienization of hands, equipment, and the environment can substantially reduce the risk of infection (CDC, 2016). In addition, the workload of the assistance team associated with their physical and mental exhaustion also contributes to the transmission of microorganisms, either by inadequate invasive procedures or by less adherence to correct hand hygiene (PIZA; CAMARGO, 2016; EC, 2017).

According to this same reasoning, a study conducted with 584 healthcare professionals showed that even in the 21st century adherence to infection control practices is below standard, and concluded that non-adherence to contact precautions were the most important factors influencing transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*MRSA*). The study author also highlighted that it is necessary to understand the reasons for these inconsistent practices adopted by healthcare professionals that still allow the transmission of pathogens (JUN, 2018).

Other authors mention that few studies consider in more depth and detail the relationship between hospital infection and the different invasive procedures to which ICU patients may be exposed (SOUSA, 2017). In one way or another, the question is alarming, since a higher incidence of *HAIs* will lead to a greater use of broad-spectrum antimicrobials (VERSPORTEN *et al.*, 2018) and, consequently, there will be greater acquired antimicrobial resistance.

Hence, when a treatment is conducted inadequately, the microorganisms that are capable of developing mechanisms of tolerance will be selected and may be responsible for subsequent infections. Such infections are important for clinical practice, since they will already present the capacity to be multidrug-resistant (PIZA; CAMARGO, 2016).

Regarding the resistance profile presented by the most prevalent bacteria (*Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa*, and *Staphylococcus* spp.), a high resistance to ciprofloxacin was found for all of them. Ciprofloxacin is an antimicrobial of the quinolone class and has an action spectrum for gram-negative bacilli and good activity against some gram-positive cocci (BRASIL, 2007). It is known today that the use of this drug is limited due to the rapid development of resistance (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2018).

In addition, other results that stood out were those related to resistance to carbapenem, antimicrobials of the carbapenem class that are beta-lactams stable to most beta-lactamases. Of the analyzed cultures, 16% showed resistance to imipenem. ANVISA, CDC and WHO draws attention and recommend screening for antimicrobial-resistant gram-negative carbapenem (BRASIL, 2019; CDC, 2016; WHO, 2017b).

Reinforcing what was found, another work, when analyzing the antimicrobial resistance of 1,239 strains of *Staphylococcus aureus* and 721 of *Pseudomonas aeruginosa* from wound secretion of the surgical site, intra-abdominal, bedsores, abscesses, drains (1.042), urine (358), catheter tip (183), blood (155), body fluids (55), bone fragments (81), respiratory tract secretions (56), tissue (27) and foreign body (3), found that *Pseudomonas aeruginosa* isolates showed resistance higher than 40% to ciprofloxacin, gentamicin and antipseudomonal cephalosporins (KOBAYASHI, SADOYAMA, and VIEIRA, 2009). The authors also demonstrated that resistance to ciprofloxacin was associated with an increase in resistance to carbapenems between 59.6% and 60.7% (KOBAYASHI; SADOYAMA; VIEIRA, 2009).

In parallel, concerning the most prevalent bacteria, ANVISA draws attention, in its bulletins, to the resistances they present. It shows that in the adult ICU the highest rates of resistance presented by *Acinetobacter* spp. are for carbapenems, *Enterobacter* spp. cephalosporin of 4th generation and carbapenems and *P. aeruginosa* carbapenem (BRASIL, 2017).

This reinforces the concern about the limitation of the action of available antimicrobials. According to the data collected, the most prescribed antimicrobials for the treatment of infections, regarding the microbiological diagnosis and empirical therapy, were of the beta-lactam class. Among them, the 3rd and 4th generation cephalosporins were the most prescribed: ceftriaxone, 3rd generation cephalosporin, has satisfactory activity against most gram-positive and gram-negative anaerobic

bacteria, and cefepime, 4th generation cephalosporin, is an antipseudomonal cephalosporin (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2018).

The results found in this study present a certain similarity to the Global Point Prevalence Survey profile, a study that included data from 303 hospitals in 53 different countries. According to Global-PPS, the three main antimicrobials prescribed worldwide were penicillins with β -lactamase inhibitors, third-generation cephalosporins, and fluoroquinolones (VERSPORTEN *et al.*, 2018).

By relating the most prescribed antimicrobials with the resistance profile found in this work, it is observed that for the most prescribed ceftriaxone and cefepime, the proportion of microbial resistance was high, with respectively 50% and 51% resistant cultures to the antibiotics in question. This resistance profile may be related to the irrational use of antimicrobials in clinical practice, since this is the main factor related to antimicrobial resistance (MONTEIRO *et al.*, 2020).

The HAIs, once identified, should always be informed through regular epidemiological notifications by hospitals, since they are considered adverse events (BRASIL, 2017). To standardize and strengthen the national surveillance systems of Antimicrobial Resistance (AMR), WHO launched, in 2017, the Global Surveillance System of Antimicrobial Resistance (GLASS). GLASS encourages countries to collect and report data based on clinical samples according to the demonstration that this approach enables better analysis and increases understanding of the impact of AMR on human health (WHO, 2017a).

In short, it is necessary to pay attention to the colonization of patients at the time of admission, since patients may already be colonized by resistant microorganisms (ZAHA *et al.*, 2019), and this may help to define the best therapeutic scheme. In addition, by identifying and disseminating the most prevalent microorganisms in biological cultures, it is possible to contribute to the adoption of safer handling techniques, which may minimize contamination among patients (DEBARBA *et al.*, 2018).

5. CONCLUSION

We concluded that *Pseudomonas aeruginosa* represents one of the main species in the colonization of hospitalized patients with sepsis. Along with this, the increased resistance profile for ciprofloxacin and cefepime reinforces the need to improve adherence to contact precautions and better use of these medications since both have, until now, important antipseudomonal activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq), the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES) and the Protection Foundation for Research in Minas Gerais (Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais, FAPEMIG) for financially supporting this research.

REFERENCES

AIRES, C. A. M.; ASENSI, M. D.; LAZARINI, N. M.; MOTTA, B. G.; PEREIRA, P. S. Resistência bacteriana aos antibióticos: o que você deve saber e como prevenir. Rio de Janeiro: IOC/Fiocruz. 16 p. 2017. Available in: http://www.fiocruz.br/ioc/media/resistencia_bacteriana_antibioticos_ioc_fiocruz.pdf. Access in: 2019 mai 12.

ARCANJO, R.; OLIVEIRA, A. C. Fatores associados à colonização axilar por microrganismo resistente em pacientes na unidade de terapia intensiva. *Rev. Aten. Saúde*.v.15, n.51, p.11-17, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: Anvisa. 122 p. 2017. Available in: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/biblioteca/medidas-de-prevencao-de-infeccao-relacionada-a-assistencia-a-saude/>. Access in: 2019 mai 12

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Boletins Anvisa. Infecções Relacionadas à Assistência à saúde (IRAS). Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017, 5 p. 2019. Available in: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/boletim-seguranca-do-paciente/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-17.pdf/view>. Access in: 2020 mai 12

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Capacitações. RM Controle: Medidas de prevenção e controle da resistência microbiana e Programa de Uso Racional de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. Brasília. [Internet] 2007. Available in: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/inicio.htm. Access in: 2020 mai 12.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C.; As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. 12 ed. *AMGH, Porto Alegre*. 2112 p. 2018.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP). *Healthcare-associated Infections*. [Internet]. 2016. Available in: <https://www.cdc.gov/hai/index.html>. Access in: 2019 Apr 8.

DAMACENO, Q. S. Aspectos epidemiológicos e microbiológicos relacionados à colonização de pacientes por micro-organismos multirresistentes em unidade de terapia intensiva. Tese Doutorado Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem, 115p. 2014.

DEBARBA, E.; SILVERO, K. de S. V.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVA, C. M. da; PEDER, L. D. de. Prevalência microbiana em secreções traqueais de pacientes em unidade

de terapia intensiva - Experiência de 4 anos. Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz, Cascavel – PR. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. 12 p. 2017.

European Commission. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). 24 p. 2017. Available in: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_2017_action-plan.pdf Access in: 2019 Apr 8.

HOANG, S.; GEORGET, A.; ASSELINEAU, J.; VENIER, A.G.; LEROYER, C.; *et al.* Risk factors for colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units in France. **PLoS ONE, Public Library of Science**, In press, vol. 1, n.3, pp.e0193300, 2018.

JUN, M. H. J. Health Care Professionals' Knowledge, Perceptions And Practices In Prevention And Transmission Of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus In An Acute Care Setting: A Cross-Sectional Study. **ScholarBank@NUS Repository**. 21-06-2018. Available in: <http://scholarbank.nus.edu.sg/handle/10635/145861>. Access in: 2019 Apr 15.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SADOYAMA, G.; VIEIRA, J. D. G. Determinação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público de Goiânia, Estado de Goiás. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V.42, n. 4, p. 404-410, 2009.

LEVY, M. M. *et al.* SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med**, v. 31, p. 1250-1256, 2003.

MONTEIRO, R. F. S.; SANTOS, V. R. R.; FERREIRA, A. A. C. T.; ABREU, J. R. G. O uso indiscriminado de antimicrobianos para o desenvolvimento de micro-organismos resistentes. REAS [Internet]. (53): e3597. 2020. Available in: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/3597>. Access in: 2020 mai 10

ODPHP, Office of Disease Prevention and Health Promotion, Overview- Health Care-Associated Infections. [Internet]. 2019. Available in: <https://health.gov/hcq/prevent-hai.asp> Access in: 2019 Apr 8

PIZA, F. M. T.; CAMARGO, T. Z. S. *In*: KNOBEL, E. **Condutas no paciente grave**. Seção: 12. CAMARGO, L. F. A.; CAMARGO, T. Z. S. Infecções Antimicrobianas. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu. p. 1857-1866, 2016.

SOUSA, M. A. S. De; NASCIMENTO G. C.; BIM, F. L.; OLIVEIRA, L. B. de ; OLIVEIRA, A. D. da S. Infecções hospitalares relacionadas a procedimentos invasivos em unidades de terapia intensiva: revisão integrativa. **Rev Pre Infec e Saúde**, v. 3, n. 3, p.49-58, 2017.

VERSPORTEN, A.; ZARB, P.; CANIAUX, I.; GROS, Marie-F.; DRAPIER, N.; MILLER, M.; JARLIER, V.; NATHWANI, D.; GOOSSENS, H. Antimicrobial consumption and resistance in adult hospital inpatients in 53 countries: results of an

internet-based global point prevalence survey. **Lancet Glob Health**. V. 6, n. 6, p:e619-e629, 2018 Jun. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30186-4

VOS, M. G. J. de; ZAGORSKI, M.; MCNALLY, A; BOLLENBACH, T. Interaction networks, ecological stability, and collective antibiotic tolerance in polymicrobial infections. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 114, n. 40, p.10666-10671, 3 out 2017.

WHO, World Health Organization. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. Geneve: WHO, 2017a. 164 p. Available in: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259744/9789241513449-eng.pdf> Access in: 2019 Apr 8.

WHO. World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Geneve: WHO. 7 p. 2017b. Available in: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf Access in: 2019 Apr 8.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities. 2017c. pp.74, pp. ref.35. Available in: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259462> Access in: 2019 mai 10.

ZAHA, D. C.; KISS, R.; HEGEDŰS, C.; GESZTELYI, R.; BOMBICZ, M.; MURESAN, M.; PALLAG, A.; ZRINYI, M.; PALL, D.; VESA, C. M.; and MICLE, O. **Recent Advances in Investigation, Prevention, and Management of Healthcare-Associated Infections (HAIs):** Resistant Multidrug Strain Colonization and Its Risk Factors in an Intensive Care Unit of a University Hospital. 9 pages, 2019.

CAPÍTULO II

ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE PACIENTES COM SEPSE INTERNADOS EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

CAPÍTULO II – ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE PACIENTES COM *SEPSE* INTERNADOS EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

RESUMO

O objetivo desse estudo foi analisar, ao longo do tempo, parâmetros bioquímicos e indicadores de base hematológica – RNL (Razão Neutrófilo Linfócito), RPL (Razão Plaqueta Linfócito) e RLM (Razão Linfócito Monócito) – para descrever os principais os microrganismos relacionados com a infecção dos pacientes com *sepsis*, divididos em dois grupos: sobreviventes e não sobreviventes. Trata-se de um estudo retrospectivo o qual analisou prontuários de pacientes com *sepsis* durante o período de internação em uma UTI de hospital geral, localizada na Zona da Mata de Minas Gerais. As principais fontes de infecção dos pacientes com *sepsis* foram respiratórias e abdominais, e o microrganismo mais frequente nas culturas foi a *Escherichia coli*. Para a maioria dos pacientes não houve desenvolvimento microbiológico nas amostras biológicas. Todos os pacientes realizaram a hemocultura. No entanto, não houve crescimento de nenhum microrganismo nos dois grupos de pacientes. Foram identificadas diferenças ao longo do tempo entre os pacientes com *sepsis* que sobreviveram e não sobreviveram quanto aos parâmetros bioquímicos. Os pacientes com *sepsis* que foram a óbito apresentaram valores de creatinina, ureia, FiO₂ superiores comparado aos sobreviventes desde o início da internação. Somado a isso, os pacientes que evoluíram para óbito apresentaram aumento ao longo do tempo nas médias de RNL. Esses resultados confirmam achados de outros estudos que trazem a RNL como marcador prognóstico clínico importante para *sepsis*.

Palavras-chave: Biomarcadores. Prognóstico. *Sepsis*.

1. INTRODUÇÃO

A *Sepsis* é uma síndrome “complexa” que pode aumentar o risco de óbito decorrente de uma resposta desregulada do hospedeiro com a infecção (SINGER *et al.*, 2016). É considerada grande problema de saúde, pois, apresenta alta taxa de letalidade e vem trazendo grandes preocupações e discussões em todo o mundo (NEIRA; HAMACHER; JAPIASSU, 2018).

O estudo *Sepsis Prevalence Assessment Database* (SPREAD) conduzido pelo Instituto Latino-Americano de *Sepsis* (ILAS), com o objetivo de avaliar tanto a prevalência como a letalidade por *sepsis* grave e choque séptico, concluiu que a prevalência de *sepsis* é de 30% nas UTIs brasileiras, com letalidade de até 55% (MACHADO *et al.*, 2017).

Principal causa de morte tardia, a *sepsis* é responsável por altos custos tanto no setor público, quanto no privado (NEIRA; HAMACHER; JAPIASSU, 2018). Sua incidência e letalidade no Brasil vem aumentando, o que leva a necessidade de estabelecer ações que visem prevenção, diagnóstico precoce e o tratamento adequado (MACHADO *et al.*, 2017).

A interação entre microrganismos infectante e o hospedeiro culmina alterações relacionadas a imunidade, inflamação e coagulação (SIQUEIRA-BATISTA, 2011), levando a expressão de moléculas de adesão e ativação plaquetária que liberam fatores com atividade pró-coagulantes e pró-inflamatórias (SILVA, ASSUNÇÃO e BACKER, 2016).

Nesse sentido há grande esforço de diversos pesquisadores para entender os papéis exercidos pelas plaquetas, monócitos e suas interações na patogênese da *sepsis*. O que se sabe é que as plaquetas ativadas se ligam aos monócitos predominantemente via P-selectina e, subsequentemente, desencadeiam vias de sinalização para alterar o fenótipo dos monócitos. No entanto, os papéis exatos desses agregados na *sepsis* ainda não estão totalmente conhecidos (GUANG *et al.*; 2021).

Somado a isso diversos parâmetros bioquímicos são avaliados quanto sua função prognóstica ou diagnóstica para *sepsis*, e apesar dos marcadores - procalcitonina e a proteína C reativa (IAPICHINO *et al.*, 2010; RATZINGER *et al.*, 2013; RYU *et al.*, 2015) serem muito estudados. Até hoje não foram incorporados

como critério clínico para *sepse* por serem consideradas inespecíficos para diagnosticar com precisão a *sepse* (SINGER, 2019). Assim, outros parâmetros bioquímicos são explorados como a relação neutrófilo/linfócitos (RNL), plaquetas/linfócitos (RPL) e linfócitos/monócitos (RLM) (QU *et al.*, 2020; ÖNDER; ÇOBAN; ADANIR, 2021).

Nesse sentido o objetivo deste estudo foi comparar, ao longo do tempo, os parâmetros bioquímicos e as relações entre neutrófilo/linfócitos (RNL), plaquetas/linfócitos (RPL) e linfócitos/monócitos (RLM) de pacientes de uma UTI, que apresentaram *sepse*, divididos em dois grupos: os que sobreviveram e os que não sobreviveram.

2. MÉTODOS

2.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo retrospectivo e observacional dos casos de *sepsis* admitidos em UTI de hospital geral, localizada na Zona da Mata de Minas Gerais. A coleta de dados aconteceu no período de outubro de 2011 a julho de 2012.

O projeto de pesquisa foi submetido à análise e aprovação (Nº088/2011) por parte do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com seres humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (Anexo 1).

Para a realização do estudo foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do responsável legal de cada paciente. Foram excluídos indivíduos menores de 18 anos, aqueles que permaneceram menos de 24 horas na UTI, gestantes e pacientes para os quais não houve concordância para participação no estudo. Nesse período o critério clínico para o diagnóstico de *sepsis* utilizado foi o publicado pelo consenso de 2003, *Sepsis-2*.

Em 2019, dando prosseguimento a pesquisa, esses pacientes foram reclassificados de acordo com *Sepsis-3* (SINGER *et al.*, 2016), foram excluídos os pacientes para os quais não tinham todas as informações desejadas. Assim, 07 pacientes com disfunção orgânica, caracterizado com um score SOFA de 2 pontos ou mais, foram incluídos nesse estudo (SINGER *et al.*, 2016).

2.2 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos foram coletados a partir dos dados presentes nos prontuários dos pacientes, em questionário próprio. As variáveis estudadas incluíram idade, sexo, fonte de infecção e microrganismos identificados por amostra. Os dados referentes aos exames laboratoriais, os quais foram realizados conforme a rotina do laboratório de referência do hospital, também foram retirados dos prontuários. Foram incluídos os níveis de leucócitos, plaquetas, creatinina, ureia, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração corpuscular média, parâmetros da gasometria arterial como valores de pH, FiO₂ (fração inspirada de oxigênio), pressão parcial de CO₂, pressão parcial de

oxigênio, relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, bicarbonato e a Relação Neutrófilo-Linfócito, Relação Plaqueta-Linfócito, Relação Linfócito-Monócito. Os pacientes foram acompanhados até o desfecho.

Para as razões neutrófilos/linfócitos, plaqueta/linfócitos, linfócitos/monócitos e plaqueta/monócitos, considerou-se os valores absolutos obtidos do hemograma do paciente. Os valores de neutrófilos corresponderam à soma de neutrófilos bastonetes com os neutrófilos segmentados.

Foram realizadas comparações entre sobreviventes (S) e não sobreviventes (NS) ao longo do tempo, em três estágios: T1, T2 e T3. T1 refere ao primeiro dia de internação na UTI, T2 corresponde aproximadamente a metade do período de internação e T3 é o último dia de internação na UTI, antes do desfecho alta ou óbito. Para cada paciente o intervalo de dias entre os dados apresentados foi diferente conforme o quadro 5.

Quadro 5 – Período de internação dos participantes do estudo.

Paciente	T1	T2	T3	Desfecho
Dia de Internação na UTI				
Paciente 1	Dia 01	Dia 05	Dia 12	S
Paciente 2	Dia 01	Dia 02	Dia 04	S
Paciente 3	Dia 01	Dia 02	Dia 03	S
Paciente 4	Dia 01	Dia 13	Dia 29	NS
Paciente 5	Dia 01	Dia 02	Dia 05	NS
Paciente 6	Dia 01	Dia 23	Dia 46	NS
Paciente 7	Dia 01	Dia 19	Dia 36	NS

Legenda: S: sobrevivente; NS: não sobrevivente. Fonte: Dados da pesquisa.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados para os parâmetros bioquímicos foram submetidos a two-way ANOVA ($p < 0,05$) para comparar entre os tipos de pacientes, sobreviventes (S) e não sobreviventes (NS). Foi realizado o teste de *Tukey*, para avaliar as diferenças ao longo do tempo (T1, T2 e T3). As análises foram feitas através do software estatístico GraphPad Prism 7.0.

3. RESULTADOS

A maioria dos pacientes deste estudo foram do sexo feminino (5). As principais fontes de infecções foram pulmão e abdômen, e apenas 01 paciente apresentou mais de uma fonte de infecção (Tabela 1).

Tabela 1 – Características gerais dos pacientes.

	Sobreviventes (n=3)	Não sobreviventes (n=4)	Total (n=7)
Idade	50 ±20	66±10	
Sexo			
Masculino	1	1	2 (28%)
Feminino	2	3	5 (71%)
Fonte de Infecção			
Pulmão	1	1	2 (28%)
Urinário	-	1	1 (14%)
Abdominal	1	1	2 (28%)
Pele	1	-	1 (14%)
Pulmão e Cirúrgico	-	1	1 (14%)

Fonte: Dados da pesquisa.

Quanto a identificação dos microrganismos por local de cultura realizados nos pacientes com *sepsis* deste estudo (Tabela 2), a *Escherichia coli* foi o microrganismo mais presente. Para 04 (58%) pacientes não foi identificado nenhum microrganismo relacionado com a infecção. E apesar das hemoculturas terem sido realizadas, nenhuma apresentou desenvolvimento de microrganismos.

Tabela 2 – Microrganismos identificados por local de cultura.

Amostras	Nº Pacientes (%)	Microrganismo
Urina	1 (14%)	<i>Escherichia coli</i>
Secreção de abscesso	1 (14%)	<i>Escherichia coli</i>
Cateter (Central, Hemodiálise)	1 (14%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Cultura negativa	4 (58%)	-
Hemocultura negativa	7 (100%)	-

Legenda: N°= 07 pacientes. Fonte: Dados da pesquisa.

Na figura 1 são mostrados os gráficos referentes as médias obtidas dos valores de leucócitos, plaquetas, ureia e creatinina para os 03 pacientes que sobreviveram (S) e para os 04 pacientes que não sobreviveram (NS). Os valores de creatinina foram maiores estatisticamente no grupo dos NS comparado ao S ($p=0.0020$), e não foram identificadas diferenças ao longo do tempo. Para os S houve redução ao longo do tempo nas médias de creatinina, apresentando diferença estatística do T1 para T2 e T3. Os valores de ureia apresentado pelo grupo NS foram estatisticamente maiores comparado aos S ($p=0.0193$), os quais sofreram redução ao longo do tempo. Os valores de leucócitos e plaquetas não diferiram entre os grupos.

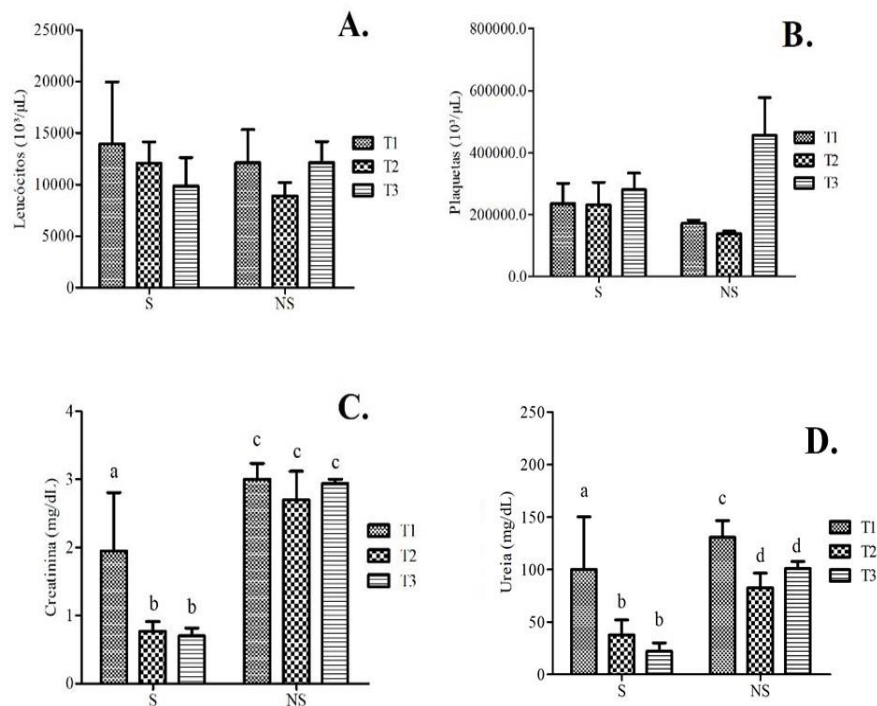


Figura 1 – Exames Bioquímicos.

Legenda: A: Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$); B: Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$); C: Creatinina (mg/dL); D: Ureia (mg/dL), de pacientes que sobreviveram (S) e não sobreviveram (NS) ao longo do tempo (T1, T2 e T3) *a, b, c, d letras diferentes nas colunas denotam diferença estatística entre os grupos, sendo $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

Não foi observada diferença estatística para os parâmetros sanguíneos analisados, como as hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média entre os grupos S e NS e entre os tempos (Figura 2).

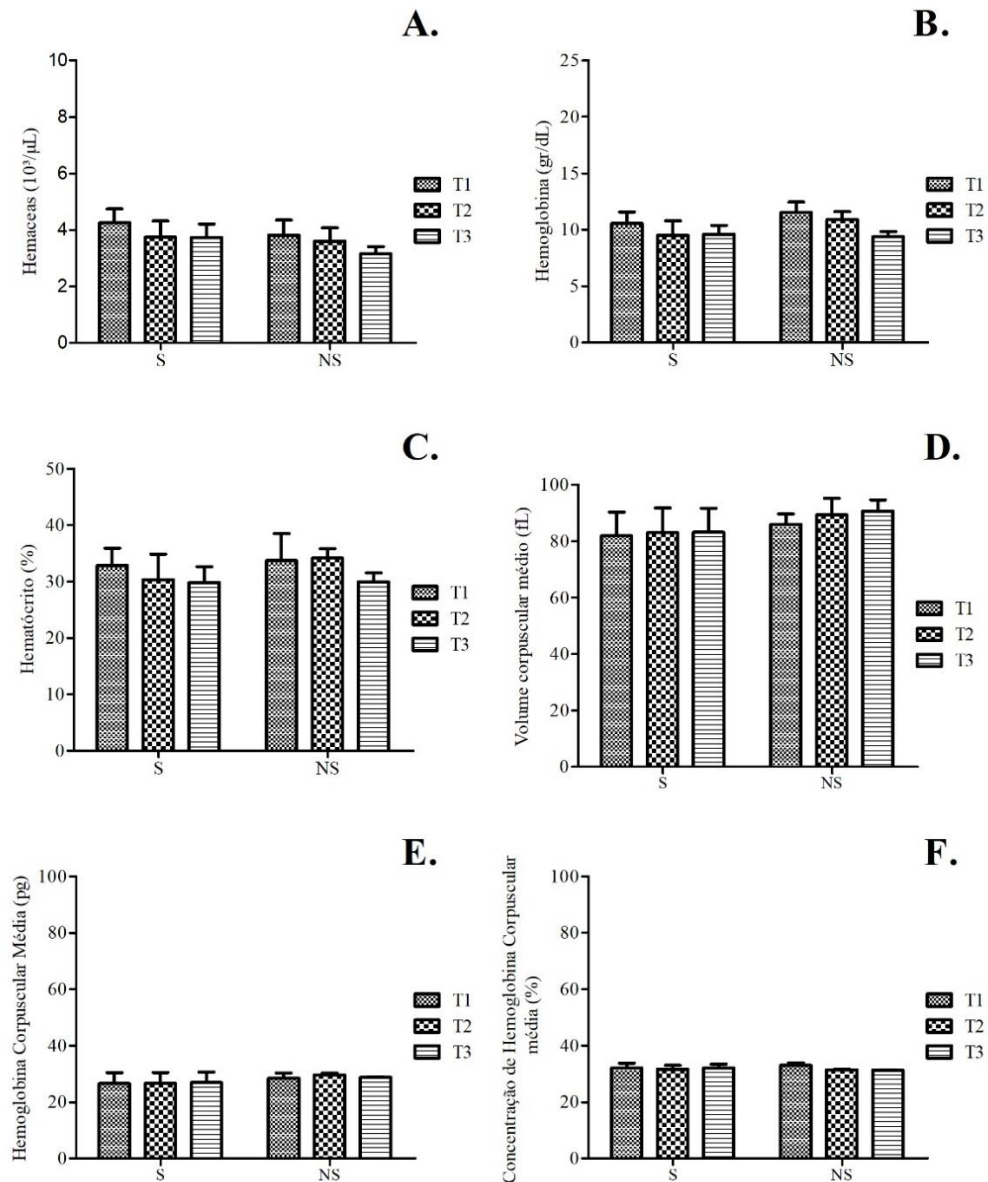


Figura 2 – Parâmetros do Hemograma.

Legenda: A: Hemácias ($10^3/\mu\text{L}$); B: Hemoglobina (gr/dL); C: Hematócrito (%); D: Volume Corpúscular Médio (fL); E: Hemoglobina Corpúscular Média (pg); F: Concentração de Hemoglobina Corpúscular Média (%), de pacientes que sobreviveram (S) e não sobreviveram (NS) ao longo do tempo (T1, T2 e T3) Letras diferentes nas colunas denotam diferença estatística entre os grupos, sendo $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

Com relação aos dados obtidos da gasometria arterial (Figura 3), pôde-se observar que para a fração inspirada de oxigênio (FiO_2) houve diferença estatística entre S e NS ($p=0.0376$). Os NS apresentaram médias superiores de FiO_2 comparado aos S, as quais foram mantidas entre os tempos.

Para a pressão parcial de oxigênio (PaO₂) houve diferença estatística entre os grupos S e NS ($p=0.0056$). Os pacientes do grupo NS apresentaram valores superiores de PaO₂ nos tempos T1 e T2, comparado aos pacientes do grupo S. Os valores de pH e pressão parcial de CO₂ não diferiram entre os grupos, conforme apresentado na figura 3.

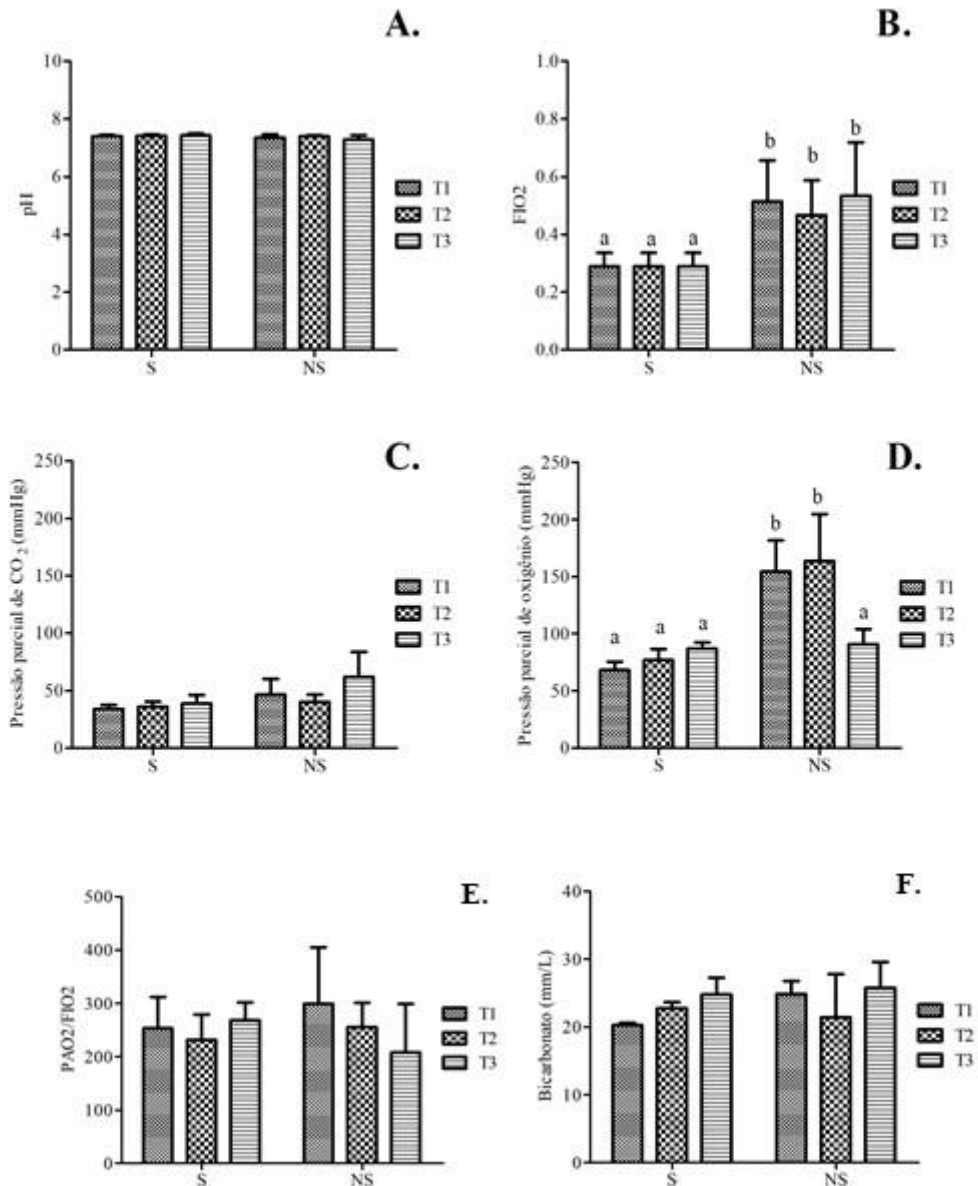


Figura 3 – Parâmetros da Gasometria Arterial.

Legenda: A: pH; B: FiO₂ (Fração Inspirada de Oxigênio); C: Pressão Parcial de CO₂ (mmHg); D: Pressão Parcial de Oxigênio (mmHg); E: Relação PaO₂/FiO₂; F: Bicarbonato (mm/L), de pacientes que sobreviveram (S) e não sobreviveram (NS) ao longo do tempo (T1, T2 e T3) *a, b letras diferentes nas colunas denotam diferença estatística entre os grupos, sendo $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

A figura 4 apresenta os parâmetros de resposta inflamatória. Houve diferença estatística para valores da Relação Neutrófilo-Linfócito (RNL) e Relação Plaqueta-Linfócito (RPL), já a Relação Linfócito-Monócito (RLM) e o bicarbonato não diferiram entre os grupos.

A RNL apresentou diferença entre os grupos S e NS ($p=0.0175$). No grupo S houve redução significativa dos valores de RNL ao longo do tempo. A redução apresentada no T3 foi diferente estatisticamente do T1 e T2. No grupo NS houve aumento significativo dos valores ao longo do tempo, valores apresentados no T1 apresentaram diferença estatística do T2, o qual, por sua vez, também apresentou diferença estatística do T3. A RPL apresentou diferença significativa entre os grupos S e NS ($p=0.0329$). No entanto, no grupo dos NS os valores de RPL iniciaram inferiores aos valores apresentados pelo grupo S no T1, seguido de um aumento significativo no T2, e de uma redução significativa no T3.

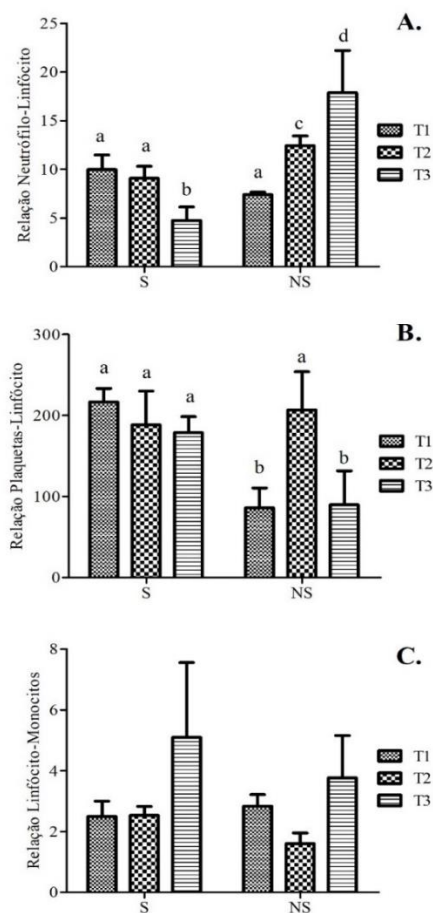


Figura 4 – Marcadores Inflamatórios.

Legenda: A: Relação Neutrófilo-Linfócito; B: Relação Plaqueta-Linfócito; C: Relação Linfócito-Monócito, de pacientes que sobreviveram (S) e não sobreviveram (NS) ao longo do tempo (T1, T2 e T3) *a, b, c, d letras diferentes nas colunas denotam diferença estatística entre os grupos, sendo $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados expostos acima mostram que há diferenças quanto aos parâmetros bioquímicos- ureia, creatinina, FiO_2 e pressão parcial de oxigênio. Do mesmo modo, para a RNL e RPL ao longo do tempo entre os sobreviventes e não sobreviventes. Não foram observadas diferenças entre os grupos e ao longo do tempo quanto aos parâmetros bioquímicos leucócitos, plaquetas, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, pH, pressão parcial de CO_2 , pressão parcial de oxigênio, PAO_2/FiO_2 e bicarbonato, assim como para a RLM.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados os parâmetros bioquímicos e as RNL, RPL e RLM ao longo do tempo, e descritos os principais microrganismos relacionados a infecção de pacientes com *sepsis* que sobreviveram e não sobreviveram durante o período de internação em uma UTI.

As principais fontes de infecção dos pacientes com *sepsis* foram o sistema respiratório e o abdominal, e o microrganismo mais frequente nas culturas foi a *Escherichia coli*. Para a maioria dos pacientes não houve isolamento de microrganismos nas amostras biológicas. Todos os pacientes realizaram a hemocultura, no entanto, não houve crescimento de nenhum microrganismo nos dois grupos (sobrevivente e não sobrevivente).

A “*Surviving Sepsis Campaign*” (SSC) de 2018 recomenda a realização de culturas sanguíneas para manejo da *sepsis* (LEVY *et al.*, 2018). Contudo, sabe-se que em pelo menos 50% dos pacientes com *sepsis* as culturas sanguíneas são negativas (PROST *et al.*, 2013).

Corroborando, uma pesquisa realizada nos EUA observou que a maioria dos casos de *sepsis* apresentavam “septicemia não especificada” (PAOLI *et al.*, 2018), resultado semelhante ao identificado por Sinha *et al.* (2021), os quais identificaram cultura negativa para isolados bacterianos em 70% de um total de 300 amostras de sangue.

Além das hemoculturas, outras culturas microbiológicas consideradas fontes potenciais de infecção devem ser definidas para pacientes com suspeita de infecção, as quais podem incluir: culturas do líquido cefalorraquidiano, urina, feridas, secreções respiratórias e outros fluidos corporais (RHODES *et al.*, 2017), como realizado no presente estudo.

No entanto, na Etiópia, para a maioria dos pacientes com suspeita de infecção não foram realizadas nenhuma cultura para identificação do microrganismo, e em apenas 10,5% dos pacientes o diagnóstico microbiológico foi associado a *sepsis* (MULATU *et al.*, 2021).

As principais fontes de infecção identificadas neste estudo foram pulmão e abdômen, e o microrganismo mais frequentemente identificado nas culturas foi a *Escherichia coli*. Corroborando outros resultados trazem que as fontes frequentes de

sepse estão relacionadas com as infecções do sistema respiratório (KAUSHIK *et al.*, 2018; MULATU *et al.*, 2021; MESTANZA *et al.*, 2018) no entanto, diferente deste trabalho, o abdômen esteve em terceiro lugar como fonte de infecção no estudo de Mulatu *et al.* (2021).

Há semelhanças entres os dados publicados com os aqui descrito em relação a etiologia da sepse. A *Escherichia coli* também foi identificada como microrganismo com maior número de culturas positivas, relacionados a sepse em outros trabalhos (MESTANZA *et al.*, 2018, PAOLI *et al.*, 2018).

Diferente dos resultados aqui apresentados, a *Klebsiella* spp. foi o microrganismo mais frequentemente relacionado com a etiologia bacteriana de infecções da corrente sanguínea em 300 pacientes com sepse na Índia (SINHA *et al.*, 2021).

O que se observa nos resultados de diferentes estudos é que não há um consenso quanto ao perfil microbiológico das culturas relacionadas à sepse. Alguns trazem que os Gram-negativos (KANTE *et al.*, 2014; SAHOO *et al.*, 2016; WAITT *et al.*, 2015) estiveram relacionadas a infecção, e outros fazem referência aos Gram-positivos, como o relatório do *SepNet Critical Care Trials Group* (2016), e o de Lwuafor *et al.* (2016).

O perfil dos microrganismos identificados em uma UTI neonatal no Egito, mostrou que as variações sazonais tiveram efeitos sobre os isolados bacterianos identificados em hemoculturas. Os autores observaram alta proporção de infecção neonatal por microrganismos Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* no inverno, e *Enterobacter* spp. no verão (MAWLA *et al.*, 2021).

Por causa das limitações quanto a utilização das culturas microbiológicas para o diagnóstico de sepse, há diferentes pesquisas que buscam encontrar novos marcadores que possam otimizar o diagnóstico da sepse (KAUSHIK *et al.*, 2018). Nesse sentido, outros resultados laboratoriais disponíveis no hemograma, como a relação neutrófilos-linfócitos (RNL), linfócito-monócito (RLM), plaqueta-monócito (RPM) e plaquetas-linfócitos (RPL) estão sendo explorados como marcadores de inflamação de várias doenças, incluindo a sepse (DURMUS *et al.*, 2015; JAGER *et al.*, 2012; KAUSHIK *et al.*, 2018; ÖNDER; ÇOBAN; ADANIR, 2021; QU *et al.*, 2020; SUPPIAH *et al.*, 2013).

Este estudo identificou que houve diferença estatística para RNL, RPL entre os

grupos de pacientes S e NS. Pacientes que foram a óbito tiveram médias de RNL superiores aos pacientes que receberam alta. Tais achados corroboram com uma meta-análise recente que mostrou que a RNL pode ser um biomarcador prognóstico útil de pacientes com sepse, e que valores mais elevados de RNL podem indicar prognósticos desfavoráveis nesses pacientes (HUANG *et al.*, 2020).

Níveis aumentados de RNL foram independentemente associados com prognóstico clínico desfavorável em pacientes com sepse (LIU *et al.*, 2016). Outros resultados sugeriram que o RNL parece ter papel promissor como marcador diagnóstico e prognóstico na sepse, uma vez que foram observados níveis elevados de RNL na fase inicial da sepse e, portanto, úteis para fazer um diagnóstico (KAUSHIK *et al.*, 2018).

Lee *et al.* (2018) encontraram para pessoas saudáveis um valor de RNL de 1,65 e Farkas (2020) cita que a RNL menor que 3 deve ser considerada como um valor normal, de forma que pacientes com sepse apresentariam um RNL acima de 3. Assim, um RNL maior que 10 pode ser considerado como elevado e sugere a presença de estresse fisiológico sistêmico grave, que pode ser causado por choque séptico ou outra doença crítica (FARKAS, 2020). Ao analisar os resultados encontrados neste estudo, observa-se que a média dos RNL foram diminuindo no grupo que sobreviveu, chegando próximo de 3, e foram aumentando ao longo do tempo no grupo que não sobreviveu, apresentando médias acima de 10.

Martins *et al.*, (2019) sugerem que a RNL, juntamente em combinação com outros parâmetros pode ser um marcador importante na detecção precoce de sepse em terapia intensiva. Já Gürol *et al.*, (2015) identificaram utilizando a procalcitonina como referência para bacteremia e sepse, que a RNL tem maior sensibilidade do que a proteína C reativa (PCR) e a contagem de leucócitos. Estes resultados sinalizam a importância de uma melhor investigação quanto aos valores da RNL. Nesse sentido, pesquisadores sugeriram os seguintes intervalos de RNL para classificar a infecção: infecção local RNL de 5 a 10; infecção sistêmica RNL de 10 a 13; sepse RNL de 13 a 15; e para choque séptico, pelo menos 15 (GÜROL *et al.*, 2015).

Além da RNL, a RPL tem sido considerada um instrumento valioso para prever letalidade em pacientes com sepse (ORAK *et al.*, 2018; PÁEZ *et al.*, 2019). Um valor de RPL maior de 200 foi significativamente associado com mortalidade, em um estudo de coorte retrospectivo (SHEN *et al.*, 2019). Rizal *et al.* (2020) relataram

um ponto de corte de RPL acima de 272,22 como preditor de mortalidade por *sepse* de 28 dias, e George *et al.* (2021) identificaram que a *sepse* foi mais perigosa em pacientes que tiveram a RPL maior que 200. Segundo os autores, a RPL pode ser um preditor confiável de letalidade em pacientes com *sepse*, e um parâmetro relativamente econômico e facilmente disponível, em comparação com os outros biomarcadores (GEORGE *et al.*, 2021; RIZAL *et al.*, 2020). Neste estudo, no entanto, os pacientes do grupo NS apresentaram médias menores, em comparação aos do grupo S.

Outros estudos mostraram resultados positivos com parâmetros diferentes, como RLM, distinguindo-se do encontrado neste trabalho, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos que sobreviveram e não sobreviveram. Hu *et al.* (2020), ao avaliarem a relação linfócito-monócito (RLM) com os desfechos de internação de pacientes sépticos em UTI, encontraram que um valor RLM mais baixo é independentemente preditivo de mau prognóstico em pacientes sépticos. Portanto, o RLM pode facilitar a estratificação do prognóstico em pacientes sépticos (HU *et al.*, 2020).

Os valores de creatinina e ureia foram estatisticamente superiores no grupo de pacientes que não sobreviveram no presente estudo, desde o início da internação na UTI e ao longo do tempo.

Em 340 pacientes, divididos entre sobreviventes e não sobreviventes, os níveis de creatinina sérica e débito urinário no primeiro dia de internação foram preditores úteis para letalidade em 28 dias, nos pacientes com *sepse* que necessitaram de terapia renal substitutiva contínua (CHO *et al.*, 2018).

Imam *et al.*, (2017) demonstraram, ainda, que a insuficiência renal aguda está altamente associada com a letalidade em pacientes sépticos em uma UTI. Associado a isso, em pacientes com *sepse*, a letalidade para aqueles que possuem complicações de insuficiência renal aguda (IRA) são significativamente maiores comparados a pacientes sem IRA (HSU, 2019). *Sepse* foi o principal fator associado com a lesão renal aguda (75%) em pacientes internados em UTI e que, para esses pacientes, foram verificados os piores desfechos, com 38% de letalidade em comparação a lesão renal não séptica (PINHEIRO *et al.*, 2019).

A IRA é uma síndrome onde ocorre a deterioração e persistente da função renal. A creatinina é o exame mais usado para avaliar e acompanhar a função renal.

Entretanto, seus níveis são elevados apenas quando a filtração glomerular se encontra abaixo de 50% (TITAN, 2013). Assim, é necessário e importante o desenvolvimento de ferramentas capazes de identificar precocemente essa síndrome, principalmente em pacientes com sepse.

Os valores de FiO_2 e PaO_2 foram estatisticamente diferentes entre os grupos. Esses parâmetros merecem atenção, uma vez que o escore SOFA utiliza a relação entre a PaO_2/FiO_2 como componente de avaliação da disfunção respiratória (SINGER *et al.*, 2016). No entanto, observou-se que os valores de PaO_2 no T1 e T2 foram maiores estatisticamente no grupo NS comparado ao S. No T3 os valores de PaO_2 dos dois grupos foram semelhantes estatisticamente.

Pôde-se concluir que, para o grupo de indivíduos deste estudo, os valores de creatinina, ureia e FiO_2 apresentaram elevados desde o início da internação para os pacientes que evoluíram para o óbito. A RNL despertou atenção especial, uma vez que, para os pacientes que faleceram, a relação aumentou ao longo do tempo, diferente dos pacientes que sobreviveram, que mostraram redução ao longo do tempo. Esses resultados confirmam achados de outros estudos, que trazem a RNL como marcador de prognóstico clínico importante para sepse.

5. CONCLUSÃO

Alterações ao longo do tempo foi confirmado para a RNL. Os pacientes com sepse que foram a óbito apresentaram uma elevação de RNL ao longo do tempo, confirmando o potencial desse marcador no prognóstico da sepse.

Verificou para os parâmetros bioquímicos ureia, creatinina, FiO_2 valores maiores desde o início do período de internação para os pacientes que não sobreviveram. Concluindo que parâmetros bioquímicos já disponíveis em resultados laboratoriais devem ser explorados como candidatos ao diagnóstico ou prognóstico para sepse.

Algumas limitações foram identificadas. Primeiro, o pequeno número de pessoas com *sepse* acompanhadas; segundo o fato de não ter sido realizada comparações com outros grupos, como pessoas saudáveis ou indivíduos com infecção sem disfunção. Assim, estudos com maior número de indivíduos são necessários para que sejam feitas melhores inferências.

REFERÊNCIAS

- CHO, A. Y. *et al.* Clinical characteristics of sepsis-induced acute kidney injury in patients undergoing continuous renal replacement therapy. **Renal Failure**, v. 40, n. 1, p. 403-409, 2018.
- DE PROST, N. *et al.* Unrevealing culture-negative severe sepsis. **Crit Care.**, V. 17, n.5, p. 1001, 2013.
- DURMUS, E. *et al.* Relações Neutrófilo-Linfócito e Plaqueta-Linfócito Como Preditores de Insuficiência Cardíaca. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 105, n. 6, p. 606-613, 2015.
- FARKAS, J. D. The complete blood count to diagnose septic shock. **J Thorac Dis.**, v. 12, n. 1, p. 16-21, 2020.
- GEORGE, A. *et al.* The Relevance of Platelet Count and Platelet Lymphocyte Ratio in Sepsis - A Retrospective Study. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 10, p. 199-202, 2021.
- GUANG, Fu. *et al.* Platelet–Monocyte Aggregates: Understanding Mechanisms and Functions in Sepsis, **SHOCK**: V. 55, n.2, p. 156-166, February 2021 doi: 10.1097/SHK.0000000000001619
- GÜROL, G. *et al.* Are there standardized cutoff values for neutrophil-lymphocyte ratios in bacteremia or sepsis? **J Microbiol Biotechnol.**, v. 25, n. 4, p. 521-525, 2015.
- HSU YC, Hsu CW. Pacientes com lesão renal aguda séptica em serviço de emergência: os fatores de risco e sua correlação com o lactato sérico. **Am J Emerg Med.** V. 37, p. 204–8, 2019. <https://doi.org/10.2215/CJN.04360514> .
- HU, X. *et al.* Effect of lymphocyte-to-monocyte ratio on survival in septic patients: an observational cohort study. **Archives of Medical Science**, np, 2020. doi:10.5114/aoms.2020.92692.
- HUANG, Z. *et al.* Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in sepsis: A meta-analysis. **Am J Emerg Med.**, v. 38, n. 3, p. 641-647, 2020.
- IAPICHINO, G. *et al.* Daily monitoring of biomarkers of sepsis in complicated long-term ICU-patients: can it support treatment decisions? **Minerva Anestesiol** v.76, n.10, p. 814 – 823, 2010.
- IMAM, M. H. *et al.* Serum procalcitonin level may predict AKI in ICU patients with sepsis. **Conference ASN Kidney Week**, np, 2017. Disponível em: https://fmed.stafpu.bu.edu.eg/INTERNAL%20MEDICINE/297/publications/Ahmed%20Wageh%20Mahdey%20_4.pdf Acesso: 15 set. 2020.
- JAGER, C. P. C. *et al.* The neutrophil-lymphocyte count ratio in patients with

community-acquired pneumonia. **PLoS One**, v. 7, n. 10, pp.e46561, 2012.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046561>

KANTE, M. *et al.* Bacterial profile of blood stream infections and antibiotic susceptibility pattern of isolates. **Int. J. Curr. Microbiol.**, v. 3, n. 12, p. 222-233, 2014.

KAUSHIK, R. *et al.* Diagnostic and Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Early and Late Phase of Sepsis. **Indian J Crit Care Med.**, v. 22, n. 9, p. 660-663, 2018.

LEE, J. S. *et al.* Reference values of neutrophil-lymphocyte ratio, lymphocyte-monocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio, and mean platelet volume in healthy adults in South Korea. **Medicine (Baltimore)**, v.97, n. 26, p. e11138, 2018.
doi:10.1097/MD.00000000000011138

LEVY, M. M. *et al.* The surviving sepsis campaign bundle: 2018 update. **Intensive Care Med.**, v. 44, n. 6, p. 925-928, 2018.

LIU, X. *et al.* Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Sepsis: A Prospective Observational Study. **Mediators of Inflammation**, v. 54, n. 12, 8 pages, 2016.

MACHADO, F. R. *et al.* SPREAD Investigators; Latin American Sepsis Institute Network. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet Infect Dis.**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.

MARTINS, E. C. *et al.* Neutrophil-lymphocyte ratio in the early diagnosis of sepsis in a intensive care unit: a case-control study. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 31, n. 1, p. 63-70, 2019.

MAWLA, M. A. A. *et al.* Assessment of seasonal variation on neonatal sepsis. **Bull Natl Res Cent.**, v. 45, n. 29, np, 2021.

MESTANZA, C. L. *et al.* Clinical factors influencing mortality risk in hospital-acquired sepsis. **Journal of Hospital Infection.**, v, 98, n. 2, p. 194-201, 2018.

MULATU, H. A. *et al.* Prevalence and outcome of sepsis and septic shock in intensive care units in Addis Ababa, Ethiopia: A prospective observational study. **African Journal of Emergency Medicine**, v. 11, n. 1, p. 188-195, 2021.

NEIRA, R. A. Q.; HAMACHER, S.; JAPIASSÚ, A. M. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. **PLoS One.**, v. 13, n. 4, p.1-15, 2018.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195873>

ÖNDER, A.; ÇOBAN, Ö. G.; ADANIR, A. S. Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, v. 25, n. 1, p. 43-48, 2021.

ORAK, M. *et al.* An investigation of the effects of the mean platelet volume, platelet distribution width, platelet/lymphocyte ratio, and platelet counts on mortality in patients with sepsis who applied to the emergency department. **Niger J Clin Pract.**, v. 21, n. 5, p. 667-671, 2018.

PÁEZ, J. L. V. *et al.* Índices de neutrófilos / linfócitos e plaquetas / linfócitos como preditores de mortalidade na sepse. **Rev Fac Cien Med.**, v. 44, n. 1, p. 57-60, 2019.

PAOLI, C. J. *et al.* Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. **Crit Care Med.**, v. 46, n. 12, p. 1889-1897, 2018.

PINHEIRO, K. H. E. *et al.* Risk factors and mortality in patients with sepsis, septic and non septic acute kidney injury in ICU. **J. Bras. Nefrol.**, v. 41, n. 4, p. 462-471, 2019.

QU, R. *et al.* Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. **J Med Virol.**, v. 92, n. 9, p. 1533-1541, 2020.

RATZINGER, F. *et al.* Utility of sepsis biomarkers and the infection probability score to discriminate sepsis and systemic inflammatory response syndrome in standard care patients, PLoS One, v. 8, n.12, p. e82946, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082946>

RHODES, A. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Med.**, v. 43, n. 3, p. 304-307, 2017.

RIZAL, T. S. The Correlation of Platelet Lymphocyte Ratio (PLR) as 28 Days Sepsis Mortality Predictor in Intensive Care Unit RSMH Palembang. **Journal of Anesthesiology and Clinical Research**, v. 1, n. 2, p. 42-62, 2020.

RYU, J. A. *et al.* Clinical usefulness of procalcitonin and C-reactive protein as outcome predictors in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. PLoS One.V. 10, n. 9, p. e0138150, 2015 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138150>

SAHOO, D. *et al.* Bacteriological analysis of blood culture isolates in patients with sepsis in a tertiary care hospital of eastern India. **International Journal of Contemporary Medical Research**, v. 3, n. 12, p. 3448-3450, 2016.

SepNet Critical Care Trials Group. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. **Intensive Care Med.**, v. 42, n. 12, p. 1980-1989, 2016.

SHANKAR-HARI, M. *et al.* Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 775-787, 2016.

SHEN, Y. *et al.* Platelet-to-lymphocyte ratio as a prognostic predictor of mortality for sepsis: interaction effect with disease severity—a retrospective study. **BMJ Open.**, v. 9, n.1,e022896, 2019.

SILVA, E; ASSUNÇÃO, M. S. C. de e BACKER, D. de. Sepsis e choque séptico. *In:* KNOBEL, E. **Condutas no paciente grave**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2016. pag 115- 137.

SINGER, M. Biomarkers for sepsis – past, present and future. *Qatar Medical Journal* vol. 2019, n. 2, p. 8. 7 Nov. 2019, doi:10.5339/qmj.2019.qccc.8

SINGER, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA**, v. 315, p. 801-810, 2016.

SINHA, S. *et al.* A Study on Bacteriological Profile of Patients Presenting Clinically as Sepsis. **European Journal of Molecular & Clinical Medicine**, v. 7, n. 11, p. 6924-6928, 2021.

SIQUEIRA-BATISTA, R., *et al.* . Atualidades proteômicas na sepse. *Rev. Assoc. Med. Brasil*, v.58, n.3, p.376-382, June 2012.

SUPPIAH, A. *et al.* The prognostic value of the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) in acute pancreatitis: identification of an optimal NLR. **JW Gastrointest Surg.**, v. 17, n. 4, p. 675-681, 2013.

TITAN, S. Org. Princípios Básicos de Nefrologia: In SETTE,L; TITAN, S; ABENSURG, H. Doença renal crônica .Porto Alegre: **Artmed**, p. 296, 2013.

WAITT, P. I. *et al.* Sepsis carries a high mortality among hospitalised adults in Malawi in the era of antiretroviral therapy scale-up: A longitudinal cohort study. **Journal of Infection**, v. 70, n. 1, p. 11-19, 2015.

WASIHUN, A. G. *et al.* Bacteriological profile and antimicrobial susceptibility patterns of blood culture isolates among febrile patients in Mekelle hospital Northern Ethiopia. *SpringerPlus*. V.4, p.314. 2015. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1056-x>

CAPÍTULO III

ANÁLISES PROTEÔMICAS DO SORO DE PACIENTES COM *SEPSE* INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: DIFERENÇAS ENTRE SOBREVIVENTES E NÃO SOBREVIVENTES

CAPÍTULO III – ANÁLISES PROTEÔMICAS DO SORO DE PACIENTES COM SEPSE INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: DIFERENÇAS ENTRE SOBREVIVENTES E NÃO SOBREVIVENTES

RESUMO

O objetivo desse estudo foi identificar as alterações na quantidade e na abundância de *spots* de proteínas do soro sanguíneo de pacientes com sepse, com base no padrão de tempo e desfecho da doença. Foram realizadas análises proteômicas do soro sanguíneo ao longo do tempo para pacientes com sepse, internados em uma Unidade de Terapia Intensiva, que sobreviveram ou que foram a óbito. Como controle, foi utilizado um gel de um indivíduo sem infecção. Os géis analisados apresentaram, em média, 120, 113 e 127 *spots* de proteínas bem definidos e detectáveis estatisticamente para o controle, alta e óbito, respectivamente. O maior número de *spots*, com abundância de proteínas estatisticamente distinta, coube ao contraste entre os tratamentos Alta *versus* Óbito. Dos 24 *spots* de proteínas identificados com diferença significativa, 17 foram exclusivos de Alta e 7 foram comuns a ambos os tratamentos. A análise entre os tempos (T1xT2 e T2xT3) de internação revelou muitos *spots* de proteínas diferencialmente abundantes. Para pacientes com desfecho de Alta, 43 proteínas apresentaram diferença estatística entre os tempos de internação, sendo 18 delas variando na primeira metade da evolução clínica (T1xT2) e 25 proteínas com abundância diferencial na segunda metade do tempo de internação (T2xT3). Para os pacientes que evoluíram para óbito, houve número maior de proteínas alteradas ao longo do tempo. Os géis mostraram 68 proteínas com diferença significativa, das quais 26 corresponderam à primeira metade do tempo de internação (T1xT2) e 42 correspondentes com as alterações do proteoma na segunda metade do tempo de internação (T2xT3). Este estudo indica que algumas proteínas parecem sinalizar seu aparecimento no desenvolvimento da doença ao longo do tempo. Isso mostra a extrema importância de caracterizar algumas proteínas para verificar se existem as diferenças que estão relacionadas, que levaram os pacientes ao óbito ou a sobrevida.

Palavras-chave: Sepse. *Spots* de Proteínas. Tempo de Internação.

1. INTRODUÇÃO

Antes de 1992, a terminologia que definia a resposta sistêmica à infecção era amplamente variada e imprecisa. Para padronizar a nomenclatura, uma conferência de consenso (BONE *et al.*, 1992) definiu *sepse* como uma complicação grave de infecções bacterianas, fúngicas ou virais, apresentando disfunções bioquímicas, causada por resposta inflamatória desregulada e sistêmica do hospedeiro à infecção, com elevado risco de morte (KIM; CHOI, 2020; SINGER *et al.*, 2016). Essa atenção especial foi necessária devido ao fato de o choque séptico ser uma das principais causas de morte em hospitais (BLANCO *et al.*, 2008; GAIESKI *et al.*, 2013; PADKIN *et al.*, 2003), chegando a representar mais da metade dos óbitos, mesmo em países desenvolvidos (KOMOROWSKI *et al.*, 2018; SWEENEY *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2021).

Um fator limitante para a sobrevivência de pacientes sépticos é o diagnóstico tardio. Na tentativa de padronizar um diagnóstico clínico eficiente, o escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) foi criado para avaliar a disfunção orgânica em critérios de *sepse* (Quadro 6). Contudo, esse critério apresenta limitações no reconhecimento prematuro dos sinais infecciosos potencialmente fatais (LOPES FERREIRA *et al.*, 2001; SINGER *et al.*, 2016).

Quadro 6 – Definições de *sepse* e características de identificação.

Sepse	Choque séptico
Sepse é uma disfunção orgânica com risco de óbito, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção.	O choque séptico é um subconjunto da <i>sepse</i> em que as anormalidades subjacentes do metabolismo circulatório e celular são profundas o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade.
A disfunção orgânica pode ser identificada como alteração aguda no escore SOFA total maior ou igual a 2 pontos, conseqüente à infecção.	Pacientes com choque séptico podem ser identificados com um construto clínico de <i>sepse</i> , com hipotensão persistente que requer vasopressores e com nível de lactato sérico maior que 2 mM, apesar da ressuscitação com volume adequado.

Fonte: Elaborado pela autora (2021), adaptado de Singer *et al.* (2016).

Nos últimos anos, os estudos pré-clínicos da *sepse* mudaram o foco da terapia clínica para as interações patógeno-hospedeiro sob uma abordagem bioquímica (CONWAY-MORRIS *et al.*, 2018; KIM; CHOI, 2020; VAN DER POLL; OPAL, 2008). Entretanto, os mecanismos fisiopatológicos e moleculares ainda são incompreendidos (ZHANG *et al.*, 2021). Como o diagnóstico da síndrome séptica é complexo, principalmente no início da doença, a cultura microbiológica ainda é considerada o "padrão ouro" (MOVAHEDIAN *et al.*, 2006).

No entanto, os métodos tradicionais de cultura são demorados, levando ao atraso no diagnóstico microbiano preciso. Além disso, há risco de resultados falso-negativos devido ao uso anterior de antibióticos (MANCINI *et al.*, 2010). Atualmente, o tratamento de primeira linha inclui antimicrobiano padronizado - geralmente antibióticos de amplo espectro -, voltado para patógenos comuns que causam *sepse* (RHODES *et al.*, 2017). No entanto, patógenos que não respondem a antibióticos, como fungos e vírus, também podem causar *sepse*.

Para além do agente etiológico, a heterogeneidade do paciente é dos maiores desafios na *sepse* (COHEN, 2002; CORTES-PUCH; HARTOG, 2016; OPAL *et al.*, 2005). Ou seja, um dos pontos chave na evolução do quadro séptico é como o sistema imune do paciente será modulado para debelar a infecção. Por isso, a descoberta de uma alteração molecular patognomônica é o foco de diversos estudos que visam um diagnóstico antes da evolução da doença. Nesse sentido, compreende-se que o diagnóstico precoce seja crucial e desafiador, uma vez que o manejo da *sepse* é altamente sensível ao tempo (FERRER *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2006; RHODES *et al.*, 2017; VAN DER POLL *et al.*, 2017).

Diante disso, o desenvolvimento de biomarcadores pode ajudar a prever o diagnóstico e o prognóstico da *sepse* (ATKINSON *et al.*, 2001). Marcadores biológicos (biomarcadores) foram definidos por Hulka e Wilcosky (1988) como alterações celulares ou bioquímicas que são mensuráveis em meios biológicos, como tecidos, células ou fluidos humanos. Recentemente, a definição foi ampliada para incluir características biológicas que podem ser objetivamente medidas e avaliadas como um indicador de processos biológicos normais, patogênicos ou de respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (NAYLOR, 2003).

Na prática, os biomarcadores incluem ferramentas e tecnologias que podem ajudar na compreensão da previsão, causa, diagnóstico, progressão, regressão ou

resultado do tratamento da doença. Eles foram avaliados para várias aplicações em pacientes com sepse, incluindo diagnóstico de infecção, prognóstico e orientação terapêutica. Os biomarcadores de *sepse* podem fornecer informações além do que está disponível, usando outras métricas, de forma a auxiliar na tomada de decisão clínica e melhorar o gerenciamento do paciente (FENG *et al.*, 2021; MANETTI *et al.*, 2021).

Dentre os alvos pesquisados, as citocinas pró-inflamatórias podem ser biomarcadores sensíveis para avaliar a gravidade e mortalidade da doença (BOZZA *et al.*, 2007; MERA *et al.*, 2011; PUNYADEERA *et al.*, 2010). Predominantemente, a *sepse* é reconhecida como condição inflamatória aguda mediada pela ativação do sistema imunológico inato, desencadeada pela infecção. Biomarcadores inflamatórios derivados do hospedeiro têm sido propostos para auxiliar no diagnóstico da *sepse* (REYES *et al.*, 2020), discriminando entre causas infecciosas e não infecciosas de inflamação sistêmica em pacientes criticamente enfermos (MARSHALL; REINHART, 2009; ZUPANČIČ *et al.*, 2021). Além disso, os biomarcadores inflamatórios podem representar uma ferramenta diagnóstica complementar para caracterizar os principais agentes etiológicos, incluindo origem bacteriana, fúngica ou viral em pacientes com *sepse* (FRANEKOVÁ *et al.*, 2021; WONG *et al.*, 2021).

Pierrakos *et al.*, (2020) ao revisar os principais estudos sobre biomarcador em *sepse*, observou uma diversidade considerável nos métodos usados pelos pesquisadores. A maioria dos biomarcadores foi proposta como sendo útil para o diagnóstico de *sepse* simplesmente porque eles aumentaram ou diminuíram em maior extensão em pacientes sépticos, do que em pacientes não sépticos ou indivíduos saudáveis. Muitos estudos avaliaram a sensibilidade e a especificidade do biomarcador para o diagnóstico de *sepse*, mas a identificação da *sepse* foi frequentemente baseada na constelação de achados clínicos e laboratoriais não específicos; na ausência de uma ferramenta de diagnóstico “padrão ouro”, este método não pode demonstrar de forma conclusiva o valor do biomarcador no que diz respeito ao diagnóstico de *sepse* (PIERRAKOS *et al.*, 2020).

Atualmente, pesquisadores buscam integrar a biologia de sistemas com o objetivo de desvendar os mecanismos envolvidos nas interações patógeno-hospedeiro e na resposta imune induzida pela *sepse* (DING *et al.*, 2020; SORRENTINO *et al.*, 2020), muitas vezes visando antever a evolução do quadro

clínico do paciente por meio de inteligência artificial (GOH *et al.*, 2021). Essa visão agregadora do sistema biológico pode revelar novas janelas moleculares para direcionar o entendimento da doença. Para isso, a biologia de sistemas deve ser enriquecida com o grande número de informações bioquímicas pertencentes aos diversos níveis ômicos que incluem metagenômica, epigenômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (BARBEIRO *et al.*, 2019; MANGIONI *et al.*, 2020).

Análises proteômicas têm sido utilizadas em diversas situações, mostrando serem úteis na compreensão das diferenças moleculares entre os pacientes com sepse e aqueles saudáveis, bem como entre os pacientes com sepse que evoluíram com melhor prognóstico e aqueles que evoluíram para o óbito. Diversos estudos têm identificados proteínas diferencialmente expressas entre esses indivíduos, sugerindo que tais diferenças sejam as responsáveis por complicações na saúde de pacientes com sepse (CAMBIAGHI *et al.*, 2018; LANGLEY *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2017).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi identificar alterações na quantidade e na abundância de spots de proteínas do soro sanguíneo de pacientes com sepse, com base no padrão de tempo e desfecho da doença.

2. MÉTODOS

2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Este estudo teve início em 2011 com aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Viçosa, sob número 088/2011 (Anexo 1). Foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do responsável legal de cada paciente antes da inclusão no estudo. Foram excluídos indivíduos menores de 18 anos, aqueles que permanecerem menos de 24 horas na UTI, gestantes e pacientes para os quais não houve concordância para participação no estudo.

Nesse período estava em vigência as definições de *Sepsis-2*, foram incluídos no estudo então os pacientes que apresentavam os critérios de *sepsis* segundo Levy *et al.* (2003). Foram coletados dados clínicos e amostras de sangue de 19 pacientes com *Sepsis-2* que deram entrada na UTI. As amostras de sangue venoso (5mL sem anticoagulante) dos participantes foram colhidas em tubos do Sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson), e foram rapidamente centrifugadas a 1100g por 15 minutos, para separação do plasma e do soro.

Em 2019, dando seguimento a pesquisa, foram selecionados os pacientes que tinham amostras de sangue ao longo do tempo e que apresentassem os critérios definidos pelo último consenso de *sepsis* (*Sepsis-3*), ou seja, pacientes com disfunção orgânica caracterizado com um SOFA de 2 pontos ou mais (SINGER *et al.*, 2016). Dos 19 pacientes, 07 apresentaram todos os critérios definidos.

Amostras de soro foram selecionados para análises proteômicas ao longo do tempo em três estágios: T1, T2 e T3. O T1 refere ao início do diagnóstico com *sepsis*, T2 é aproximadamente na metade do período de internação e T3 é o último dia de internação antes do desfecho alta ou óbito. Assim, para cada paciente o intervalo entre os dias foi diferente. Foi colhida também uma amostra de soro de um indivíduo sem infecção (n=1), para as comparações.

2.2 PREPARO DA AMOSTRA

As amostras foram precipitadas com TCA/acetona, segundo adaptações do proposto por Wu *et al.* (2014). Essa etapa visou remover compostos secundários que

interferem na eletroforese bidimensional (2-DE), como os lipídeos, compostos fenólicos e pigmentos. Para isso, 200 μ L de amostra foi adicionada a 1300 μ L de solução contendo ácido tricloroacético (TCA) 10% e acetona 80%. A mistura resultante foi centrifugada a 15000 g, 4 °C, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1000 μ L da solução TCA/acetona anteriormente utilizada. Um novo ciclo de centrifugação foi aplicado às amostras e o pellet foi recuperado para que duas lavagens com acetona 80% fossem realizadas. Uma terceira lavagem do pellet foi realizada com etanol 80% e, após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi secado em temperatura ambiente. Por fim, o pellet foi solubilizado em 350 μ L de tampão de amostra para 2-DE, contendo ureia, tiourea e CHAPS, com o auxílio de um sonicador de haste por dois ciclos de 5 pulsos com 4 s cada.

2.3 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)

A focalização isoelétrica (IEF) foi realizada em IPG strip pH 3-10 (GE Healthcare) de 24 cm. Inicialmente, as fitas foram reidratadas por 14-20 h com 450 μ L de tampão de reidratação [ureia 7 M, thiourea 2 M, CHAPS (2%, bromofenol blue 0,002%), IPG-buffer 2%, DTT (Ditiotreitol) 0,2%], com a adição do reagente DeStreak 50% (GE Healthcare). Os extratos proteicos foram separados na primeira dimensão, usando o sistema de focalização IPGphor3 (GE Healthcare).

As fitas foram lavadas em tampão de equilíbrio contendo ureia 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol 30% (v/v), SDS 4% (m/v), DTT 1% (m/v) e iodoacetamida 2,5% (m/v), durante 15 min à temperatura ambiente. As fitas IPG foram transferidas para um gel de poliacrilamida 12% e selado com agarose 0,5%. As corridas de SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença dodecil sulfato sódico) correram no sistema EthanDalt Six (GE Healthcare) a 20 mA/gel por 10 h. Após as corridas, os géis foram fixados por 16 h em solução de etanol 40% e ácido acético 10%.

2.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DIFERENCIAL DOS SPOTS NOS GÉIS 2DE

Para detectar o total de proteínas, os géis foram corados em solução de Coomassie coloidal por 48 h, e lavados posteriormente com água ultrapura para eliminar o excesso de solução colorante. Os géis foram digitalizados com o

ImageScanner III (GE Healthcare) e as imagens calibradas com o Labscan software (GE Healthcare). Os proteomas dos três tratamentos foram comparados com o software ImageMaster2D Platinum 7 (GE Healthcare) para a determinação de *spots* de proteínas com abundância diferencial. Os *spots* considerados como diferencialmente expressas foram os que tiveram valores de *odds ratio* acima de 1,0 e ANOVA com $p < 0,05$. Foram utilizadas três réplicas biológicas para cada tratamento.

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISE ENTRE OS TRATAMENTOS CONTROLE, ALTA E ÓBITO

As imagens obtidas dos géis foram analisadas pelo pacote computacional ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), e os *spots* com boa resolução foram utilizados para análises comparativas (Tabela 3). Os géis apresentaram, em média, 120, 113 e 127 *spots* bem definidos e detectáveis estatisticamente, para o controle, alta e óbito, respectivamente. Além disso, 17,699% dos *spots* identificados nos géis relativos ao tratamento Alta foram coincidentes, ou seja, estavam presentes em todos os pacientes. Da mesma forma, os *spots* coincidentes no tratamento Óbito foi de 18,897%, já o tratamento controle obteve 100% de coincidências porque correspondia a amostras obtidas a partir de um indivíduo.

Tabela 3 – Resultado geral da comparação proteômica.

Item	Controle	Alta	Óbito
Média de <i>spots</i> por tratamento	120	113	127
Porcentagem de coincidência nos tratamentos	100%	17,699%	18,897%

Fonte: Dados da pesquisa.

Em seguida, as análises comparativas das réplicas entre as classes para cada tratamento foram realizadas (Tabela 4). Na primeira comparação, Controle *versus* Alta, 3 *spots* apresentaram abundância diferencial ($p < 0,05$), estando presentes em ambos os tratamentos. A segunda classe foi constituída da análise entre Controle *versus* Óbito e 5 *spots* foram observados ($p < 0,05$), sendo 3 deles exclusivos ao Controle, enquanto 2 eram comuns tanto ao Controle quanto Óbito. O maior número de *spots* com abundância de proteínas estatisticamente distinta coube ao contraste entre os tratamentos Alta *versus* Óbito. Dos 24 *spots* identificados com diferença significativa, 17 foram exclusivos de Alta e 7 foram comuns a ambos os tratamentos.

Tabela 4 – Análise proteômica comparativa das classes nas três condições estudadas.

Item	Controle versus Alta		Controle versus Óbito		Alta versus Óbito	
	Controle	Alta	Controle	Óbito	Alta	Óbito
Total de spots com diferenças significativas ($p < 0,05$)	3		5		24	
Quantidade de spots exclusivos de cada tratamento (mach count = 1)	0	0	3	0	17	0
Abundância diferencial: spots com aumento ou diminuição da abundância nos tratamentos (mach count = 2)	3		2		7	

Fonte: Dados da pesquisa.

As imagens representativas dos perfis proteômicos relativos aos tratamentos Controle, Alta e Óbito estão representadas na Figura 5. Os géis referentes aos demais tratamentos mostraram semelhança e foram, portanto, reproduzíveis.

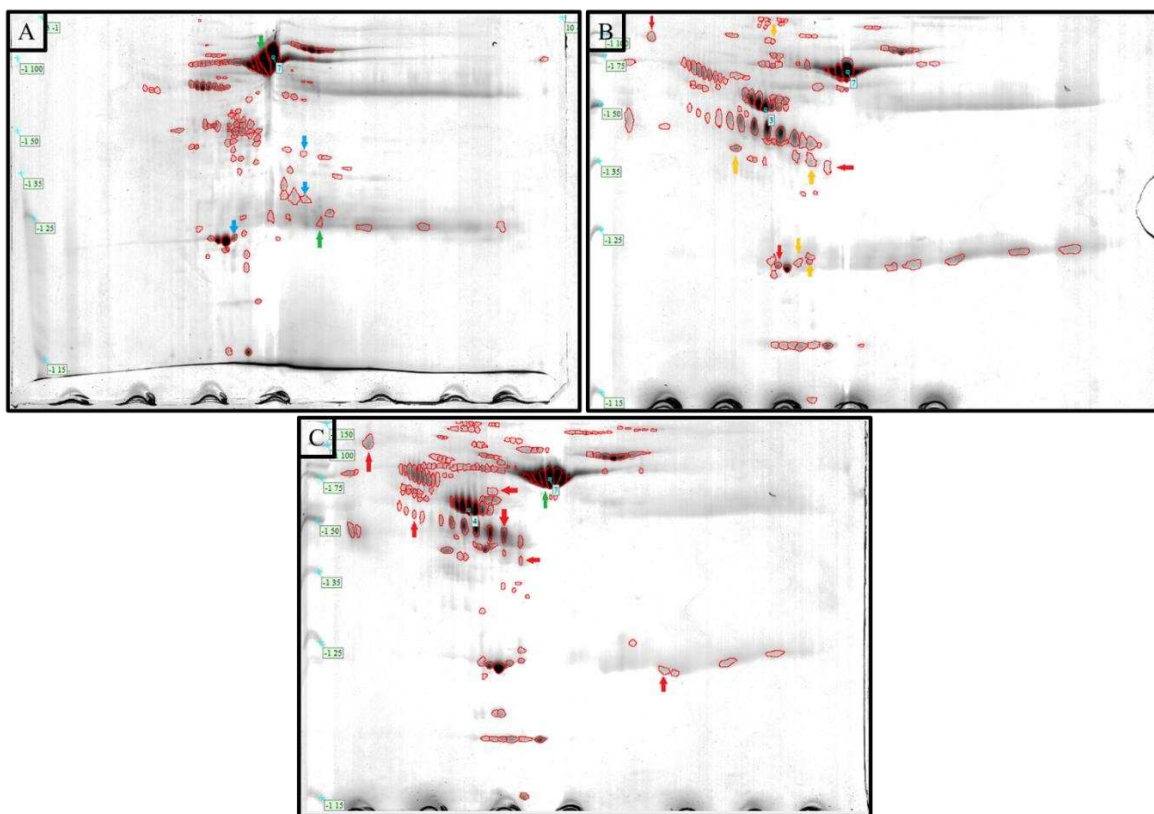


Figura 5 – Imagens representativas de géis 2-DE para proteômica comparativa entre os tratamentos Controle (1A), Alta (1B) e Óbito (1C).

Legenda: Spots estatisticamente diferentes comuns nos três tratamentos (\rightarrow). Spots estatisticamente diferentes comuns em Controle versus Alta (\rightarrow). Spots estatisticamente diferentes comuns em Alta versus Óbito (\rightarrow). Spots exclusivos de cada tratamento com diferença estatisticamente significativa (referente à comparação Alta versus Óbito; a comparação Controle versus Alta não apresentou spots exclusivos) (\rightarrow). Proteínas separadas por um gradiente de pH 3-10 na primeira dimensão e 12,5% SDS-PAGE na segunda dimensão; gel colorado com Coomassie. 1A: Tratamento controle (gel 29615). 1B: Tratamento Alta (gel 12470). 1C: Tratamento Óbito (gel 12471). Fonte: Dados da pesquisa.

A tabela 5 mostra os *spots* diferencialmente abundantes identificados entre os géis dos tratamentos, analisados par a par a uma significância de $p < 0,05$. Os valores de peso molecular e *pl* apresentados são teóricos. Por meio da análise bidimensional das proteínas, identificamos 159 *spots*, sendo 134 deles provenientes dos tratamentos *Alta versus Óbito*, 11 para a comparação entre os tratamentos *Alta versus Controle* e 14 para os tratamentos *Óbito versus Controle*.

Tabela 5 – Lista dos *spots* identificados entre os tratamentos *Alta*, *Óbito* e *Controle*.

Tratamento	Spot ID	Match ID	pl teórico	MW teórico
<i>Alta versus Óbito</i>	2721	24	5,14731	22
<i>Alta versus Óbito</i>	1534	24	5,08776	24
<i>Alta versus Óbito</i>	1043	24	5,07299	23
<i>Alta versus Óbito</i>	2529	24	5,20354	23
<i>Alta versus Óbito</i>	1005	24	5,18284	25
<i>Alta versus Óbito</i>	2085	24	5,12842	22
<i>Alta versus Óbito</i>	2629	24	5,01108	23
<i>Alta versus Óbito</i>	591	24	5,20523	25
<i>Alta versus Óbito</i>	2623	24	5,09888	22
<i>Alta versus Óbito</i>	2641	24	5,24781	23
<i>Alta versus Óbito</i>	1639	24	5,12449	23
<i>Alta versus Óbito</i>	2300	37	5,2851	39
<i>Alta versus Óbito</i>	1103	37	5,23288	44
<i>Alta versus Óbito</i>	2237	37	5,20129	45
<i>Alta versus Óbito</i>	1970	37	5,3541	43
<i>Alta versus Óbito</i>	3151	37	5,29416	42
<i>Alta versus Óbito</i>	2497	37	5,29725	42
<i>Alta versus Óbito</i>	2546	37	5,3236	41
<i>Alta versus Óbito</i>	2552	37	5,49076	45
<i>Alta versus Óbito</i>	1594	37	5,34289	43
<i>Alta versus Óbito</i>	1059	37	5,22226	41
<i>Alta versus Óbito</i>	2118	53	3,50525	98
<i>Alta versus Óbito</i>	1428	53	3,57124	109
<i>Alta versus Óbito</i>	1036	53	3,5137	103
<i>Alta versus Óbito</i>	915	53	3,61672	110
<i>Alta versus Óbito</i>	1852	53	3,49795	92
<i>Alta versus Óbito</i>	703	53	3,4826	107
<i>Alta versus Óbito</i>	1819	53	3,40514	99
<i>Alta versus Óbito</i>	1737	53	3,54422	96
<i>Alta versus Óbito</i>	1841	53	3,52042	107
<i>Alta versus Óbito</i>	1531	53	3,55181	92

Continua.

Continuação da Tabela 5.

Tratamento	Spot ID	Match ID	pl teórico	MW teórico
Alta versus Óbito	575	53	3,34346	68
Alta versus Óbito	2403	53	3,54924	105
Alta versus Óbito	2264	53	3,47712	85
Alta versus Óbito	2264	53	3,48539	88
Alta versus Óbito	3054	53	3,58806	95
Alta versus Óbito	1457	53	3,51182	91
Alta versus Óbito	929	53	3,47667	91
Alta versus Óbito	2782	56	5,14961	63
Alta versus Óbito	967	56	5,13376	68
Alta versus Óbito	1934	56	5,04823	65
Alta versus Óbito	1863	56	5,14605	60
Alta versus Óbito	1857	56	5,05712	62
Alta versus Óbito	1806	56	5,10617	66
Alta versus Óbito	2035	56	5,15607	63
Alta versus Óbito	608	56	5,2735	56
Alta versus Óbito	2492	56	5,1721	68
Alta versus Óbito	2945	56	5,08962	61
Alta versus Óbito	2729	61	7,34055	24
Alta versus Óbito	1372	61	7,25799	25
Alta versus Óbito	1209	61	7,34405	23
Alta versus Óbito	3025	61	7,30804	24
Alta versus Óbito	1145	61	7,34086	25
Alta versus Óbito	2390	61	7,47498	23
Alta versus Óbito	3101	61	7,04495	24
Alta versus Óbito	696	61	7,23396	25
Alta versus Óbito	2261	61	7,3328	40
Alta versus Óbito	1737	61	7,17576	24
Alta versus Óbito	2039	61	7,548	24
Alta versus Óbito	3160	61	7,34194	25
Alta versus Óbito	2951	61	7,47965	24
Alta versus Óbito	2320	71	5,72375	35
Alta versus Óbito	1807	71	5,61367	40
Alta versus Óbito	1335	71	5,66438	40
Alta versus Óbito	1214	71	5,6627	37
Alta versus Óbito	3064	71	5,76624	40
Alta versus Óbito	1166	71	5,71332	42
Alta versus Óbito	2396	71	5,76519	34
Alta versus Óbito	2590	71	5,61303	33
Alta versus Óbito	2241	71	5,42637	38
Alta versus Óbito	1945	71	5,52943	38
Alta versus Óbito	2317	82	5,50328	35

Continua.

Continuação da Tabela 5.

Tratamento	Spot ID	Match ID	pl teórico	MW teórico
Alta versus Óbito	1793	82	5,41192	41
Alta versus Óbito	1108	82	5,43836	40
Alta versus Óbito	1004	82	5,45563	37
Alta versus Óbito	2462	82	5,56141	40
Alta versus Óbito	975	82	5,52144	42
Alta versus Óbito	2022	82	5,55367	35
Alta versus Óbito	2580	82	5,28697	36
Alta versus Óbito	2113	83	5,01181	104
Alta versus Óbito	1830	83	4,99709	115
Alta versus Óbito	1854	83	5,06012	88
Alta versus Óbito	3109	83	4,99055	101
Alta versus Óbito	2329	87	6,64469	30
Alta versus Óbito	1798	87	6,49093	32
Alta versus Óbito	1355	87	6,50913	33
Alta versus Óbito	1223	87	6,55627	30
Alta versus Óbito	3028	87	6,66431	33
Alta versus Óbito	2310	88	4,83268	36
Alta versus Óbito	1107	88	4,80137	41
Alta versus Óbito	1002	88	4,79389	39
Alta versus Óbito	2461	88	4,89068	41
Alta versus Óbito	974	88	4,91874	43
Alta versus Óbito	2078	280	5,53604	22
Alta versus Óbito	2631	280	5,44202	23
Alta versus Óbito	588	280	5,55825	25
Alta versus Óbito	2076	281	5,38401	22
Alta versus Óbito	2632	281	5,31205	23
Alta versus Óbito	590	281	5,41973	25
Alta versus Óbito	2014	282	4,59081	38
Alta versus Óbito	2557	282	4,63713	44
Alta versus Óbito	572	282	4,70029	44
Alta versus Óbito	1961	287	4,96538	48
Alta versus Óbito	2501	287	4,92215	60
Alta versus Óbito	561	287	5,02873	61
Alta versus Óbito	1202	308	5,62219	67
Alta versus Óbito	3003	308	5,74373	80
Alta versus Óbito	924	308	5,75846	73
Alta versus Óbito	1075	312	5,48264	15
Alta versus Óbito	2597	312	5,6492	15
Alta versus Óbito	1152	312	5,18962	17
Alta versus Óbito	1031	314	6,76334	25
Alta versus Óbito	2508	314	6,83987	26

Continua.

Continuação da Tabela 5.

Tratamento	Spot ID	Match ID	pl teórico	MW teórico
<i>Alta versus Óbito</i>	1189	314	6,80813	28
<i>Alta versus Óbito</i>	1003	317	4,90418	38
<i>Alta versus Óbito</i>	2463	317	4,99871	41
<i>Alta versus Óbito</i>	1167	317	5,01354	43
<i>Alta versus Óbito</i>	1001	318	4,72412	40
<i>Alta versus Óbito</i>	2458	318	4,84116	41
<i>Alta versus Óbito</i>	973	318	4,85779	43
<i>Alta versus Óbito</i>	995	319	5,2508	42
<i>Alta versus Óbito</i>	2442	319	5,3701	45
<i>Alta versus Óbito</i>	965	319	5,33409	48
<i>Alta versus Óbito</i>	949	335	6,96141	77
<i>Alta versus Óbito</i>	2331	335	7,00868	87
<i>Alta versus Óbito</i>	904	335	7	84
<i>Alta versus Óbito</i>	928	344	6,62605	84
<i>Alta versus Óbito</i>	2319	344	6,66881	95
<i>Alta versus Óbito</i>	893	344	6,66591	89
<i>Alta versus Óbito</i>	925	346	6,41222	87
<i>Alta versus Óbito</i>	2315	346	6,46399	97
<i>Alta versus Óbito</i>	887	346	6,42889	92
<i>Alta versus Óbito</i>	924	347	4,99871	89
<i>Alta versus Óbito</i>	883	347	5,08352	96
<i>Alta versus Controle</i>	2744	5	5,87762	67
<i>Alta versus Controle</i>	2827	5	6,02273	94
<i>Alta versus Controle</i>	2727	9	6,69291	26
<i>Alta versus Controle</i>	2494	9	6,55682	29
<i>Alta versus Controle</i>	2724	12	5,40223	22
<i>Alta versus Controle</i>	1533	12	5,30538	24
<i>Alta versus Controle</i>	1117	12	5,44064	24
<i>Alta versus Controle</i>	1041	12	5,30032	23
<i>Alta versus Controle</i>	2526	12	5,43762	23
<i>Alta versus Controle</i>	1001	12	5,40181	25
<i>Alta versus Controle</i>	2515	12	5,59091	23
<i>Óbito versus Controle</i>	2228	5	5,73023	73
<i>Óbito versus Controle</i>	1824	5	5,82468	68
<i>Óbito versus Controle</i>	1976	5	5,91036	71
<i>Óbito versus Controle</i>	3133	5	5,89538	70
<i>Óbito versus Controle</i>	2909	5	5,84948	67
<i>Óbito versus Controle</i>	2897	5	5,89213	68
<i>Óbito versus Controle</i>	1916	5	5,88119	71
<i>Óbito versus Controle</i>	950	5	5,90858	66
<i>Óbito versus Controle</i>	2827	5	6,02273	94

Continua.

Continuação da Tabela 5.

Tratamento	Spot ID	Match ID	pl teórico	MW teórico
Óbito <i>versus</i> Controle	2494	9	6,55682	29
Óbito <i>versus</i> Controle	2998	10	6,79551	24
Óbito <i>versus</i> Controle	2909	10	6,73864	25
Óbito <i>versus</i> Controle	2868	17	6,525	41
Óbito <i>versus</i> Controle	2841	19	9,75227	98

Fonte: Dados da pesquisa.

3.2 ANÁLISE ENTRE OS TEMPOS DE INTERNAÇÃO

A análise entre os tempos de internação revelou muitos spots diferencialmente abundantes. Quarenta e três proteínas apresentaram diferença estatística entre os tempos de internação para pacientes com desfecho de Alta, sendo 18 delas variando na primeira metade da evolução clínica, e 25 proteínas com abundância diferencial na segunda metade do tempo de internação. Para pacientes que evoluíram para óbito, houve número maior de proteínas alteradas ao longo do tempo. Os géis mostraram 68 proteínas com diferença significativa, das quais 26 corresponderam à primeira metade do tempo de internação e 42 às alterações do proteoma que precederam aos óbitos dos pacientes (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de spots diferencialmente abundantes ao longo do tempo de internação para os diferentes tratamentos.

Item	Alta 1 <i>versus</i> Alta 2	Alta 2 <i>versus</i> Alta 3	Óbito 1 <i>versus</i> Óbito 2	Óbito 2 <i>versus</i> Óbito 3
Total de <i>spots</i> com diferenças significativas ($p < 0,05$)	18	25	26	42

Fonte: Dados da pesquisa.

Das 43 proteínas que apresentaram alteração na quantidade de proteínas ao longo do tempo no grupo Alta, apenas 3 estavam presentes nos géis correspondentes aos tempos 1 e 2. Os demais *spots* tiveram *match count* igual a 1, indicando presença e ausência da proteína (Tabela 7).

Tabela 7 – Lista dos spots identificados entre os tempos para o tratamento Alta.

Tratamento	Match count	Spot ID	Match ID	pl teórico	MW teórico
Alta 1 versus Alta 2	1	2785	335	5,1542	79
Alta 1 versus Alta 2	1	2773	344	3,31234	42
Alta 1 versus Alta 2	1	2771	343	6,89272	26
Alta 1 versus Alta 2	1	2767	346	6,96161	25
Alta 1 versus Alta 2	1	2753	318	5,16798	54
Alta 1 versus Alta 2	1	2752	70	5,18635	56
Alta 1 versus Alta 2	1	2727	319	6,69291	26
Alta 1 versus Alta 2	1	2723	317	5,33563	23
Alta 1 versus Alta 2	1	2658	75	2,60039	12
Alta 1 versus Alta 2	1	2334	308	9,77723	29
Alta 1 versus Alta 2	1	2314	45	4,72933	36
Alta 1 versus Alta 2	2	2311	26	4,66962	36
Alta 1 versus Alta 2	1	2262	312	4,51804	53
Alta 1 versus Alta 2	1	2157	314	3,85203	74
Alta 1 versus Alta 2	1	2146	43	10,1493	80
Alta 1 versus Alta 2	1	2138	316	5,25755	85
Alta 1 versus Alta 2	2	2123	76	5,52395	97
Alta 1 versus Alta 2	2	2115	53	5,72375	104
Alta 2 versus Alta 3	1	1255	335	4,02412	58
Alta 2 versus Alta 3	1	1250	344	5,2463	32
Alta 2 versus Alta 3	1	1244	280	5,55466	110
Alta 2 versus Alta 3	1	1235	343	5,61994	110
Alta 2 versus Alta 3	1	1230	346	4,84791	101
Alta 2 versus Alta 3	1	1228	318	4,89968	99
Alta 2 versus Alta 3	1	1226	35	6,6373	25
Alta 2 versus Alta 3	1	1224	26	6,41447	26
Alta 2 versus Alta 3	1	1219	319	4,84116	27
Alta 2 versus Alta 3	1	1218	282	4,99421	27
Alta 2 versus Alta 3	1	1062	317	5,34084	18
Alta 2 versus Alta 3	1	1061	308	5,23955	18
Alta 2 versus Alta 3	1	1060	281	5,13376	18
Alta 2 versus Alta 3	1	998	9	5,57267	42
Alta 2 versus Alta 3	1	982	23	5,21029	58
Alta 2 versus Alta 3	1	974	11	4,30322	66
Alta 2 versus Alta 3	1	963	312	5,48714	69
Alta 2 versus Alta 3	1	962	88	5,02347	70
Alta 2 versus Alta 3	1	959	314	4,87492	71
Alta 2 versus Alta 3	1	957	287	6,13537	70
Alta 2 versus Alta 3	1	956	316	6,25691	73
Alta 2 versus Alta 3	1	955	277	6,33119	74
Alta 2 versus Alta 3	1	948	41	4,31672	75
Alta 2 versus Alta 3	1	945	29	5,12251	78
Alta 2 versus Alta 3	1	943	8	4,23569	76

Fonte: Dados da pesquisa.

Essa elevada quantidade de *spots* com *match count* igual a 1 detectados entre os tempos do tratamento Alta também esteve presente entre os tempos de internação de pacientes que evoluíram para óbito. Dos 68 *spots* que apresentaram proteínas diferencialmente abundantes, apenas 2 constavam em ambos os conjuntos de géis comparados (Tabela 8).

Tabela 8 – Lista dos spots identificados entre os tempos para o tratamento Óbito.

Tratamento	Match count	Spot ID	Match ID	pl teórico	MW teórico
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2284	176	4,41576	76
Óbito 1 versus Óbito 2	2	2276	41	5,36109	81
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2253	183	5,19228	33
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2225	184	5,90129	74
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2216	181	6,73858	138
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2215	182	6,84662	136
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2214	74	6,97042	132
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2213	166	7,07396	133
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2120	180	5,68521	134
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2119	75	5,19228	131
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2114	186	4,96045	129
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2043	247	5,33408	32
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2022	164	4,63183	39
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2013	244	4,9582	41
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2011	62	5,03473	41
Óbito 1 versus Óbito 2	1	2010	42	4,81865	42
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1987	168	4,67235	48
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1982	174	4,1164	51
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1953	52	4,07814	61
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1950	160	4,17492	61
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1948	185	4,91769	61
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1940	248	4,08039	63
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1932	158	4,08264	65
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1931	173	3,93633	65
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1929	204	4,01286	66
Óbito 1 versus Óbito 2	1	1927	50	4,23569	66
Óbito 2 versus Óbito 3	1	2045	176	3,41831	44
Óbito 2 versus Óbito 3	1	2036	183	3,54959	121
Óbito 2 versus Óbito 3	1	2031	184	6,76701	75
Óbito 2 versus Óbito 3	1	2004	45	5,12047	131
Óbito 2 versus Óbito 3	1	2001	102	5,5054	102
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1995	105	6,5178	74
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1994	181	6,47552	74
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1991	182	6,4733	72
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1990	166	6,43102	74

Continua.

Continuação Tabela 8.

Tratamento	Match count	Spot ID	Match ID	pl teórico	MW teórico
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1989	180	6,4288	72
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1987	39	6,37762	72
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1986	186	6,3843	74
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1982	164	6,69358	75
Óbito 2 versus Óbito 3	2	1980	41	6,58233	75
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1968	116	7,60807	12
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1967	3	7,19644	12
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1966	100	7,14971	12
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1965	10	7,10744	12
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1964	59	7,00954	12
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1830	110	6,17292	18
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1828	62	6,10839	18
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1826	106	6,23967	18
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1820	168	5,28957	21
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1815	108	5,07152	22
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1808	127	5,14495	24
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1803	174	5,22505	24
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1793	160	5,54323	26
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1787	55	5,04927	27
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1786	56	4,68214	27
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1781	185	4,84901	29
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1780	114	4,84234	30
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1777	122	5,79466	32
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1758	121	4,83121	41
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1757	158	4,55308	41
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1755	133	5,03369	42
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1754	137	4,83121	42
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1753	32	4,98474	42
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1740	173	4,29053	45
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1737	135	4,33503	47
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1618	204	5,2918	73
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1615	138	5,21615	74
Óbito 2 versus Óbito 3	1	1611	13	5,14495	74

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados deste trabalho mostraram diferenças importantes na quantidade e na abundância diferencial dos *spots* de proteínas nos grupos controle, alta e óbito. Diferença maior foi identificada nas comparações realizadas entre alta e óbito. Em relação as análises realizadas ao longo do tempo, identificamos um número maior de *spots* com diferenças significativas nas comparações realizadas entre o T2 e T3.

4. DISCUSSÃO

Apesar da ausência da identificação das proteínas diferencialmente encontradas, percebe-se grande potencial neste trabalho, uma vez que houve diferenças importantes na abundância de *spots* de proteínas no soro sanguíneo entre os dois grupos (sobreviventes e óbito) e ao longo do tempo, principalmente do T2 para T3 para o grupo que foi a óbito.

Um estudo longitudinal confirma alterações proteicas ao longo do tempo ao avaliar a abundância de proteínas no soro sanguíneo de 20 indivíduos com sepse, coletado em cinco momentos – no primeiro, no segundo, terceiro, quinto e sétimo dia após a admissão – a partir do início do diagnóstico. Foram analisados 49 *spots* de proteínas para os quais a abundância mudou, pelo menos, duas vezes ao longo do tempo (HAYASHI *et al.*, 2019).

Diferenças específicas entre sobreviventes e não sobreviventes foram encontradas em um estudo ao comparar diferenças na abundância de proteínas no soro de pacientes durante as primeiras 12 horas após o diagnóstico de choque séptico e no dia 28 de internação. As proteínas identificadas foram relacionadas com a inflamação e vias de sinalização citoprotetora (KALENKA *et al.*, 2006).

Também, um estudo integrando características clínicas, metabólica e proteômica de pacientes com *sepse* na chegada ao pronto-socorro do hospital e após 24 horas de internação, encontrou diferenças entre sobreviventes e não sobreviventes. Os diferentes perfis de proteínas e metabólitos estiveram relacionados ao transporte de ácidos graxos, β -oxidação, gliconeogênese e ciclo do ácido cítrico (LANGLEY *et al.*, 2013).

Outro estudo que também realizou a integração de dados metabólicos com proteômicos, mostrou a importância dos lipídios circulantes e da cascata de coagulação na progressão do choque séptico ao comparar pacientes sobreviventes e não sobreviventes, de acordo com a mortalidade em 28 dias (CAMBIAGHI *et al.*, 2018).

Diferenças na expressão da proteína foram encontradas na comparação entre pacientes com *sepse* e indivíduos saudáveis. O estudo comparou a expressão proteica no soro sanguíneo de 85 pacientes no início da *sepse*, com 67 indivíduos saudáveis e encontrou significativamente 20 *spots* de proteínas diferentemente

expressos no grupo dos indivíduos com sepse. A identificação por análise de espectrometria de massas revelou desregulação em seis proteínas diferentes expressas nos indivíduos com sepse. Dessas proteínas, 50% foram validadas por ELISA: Antitrombina-III, Clusterina e Amiloide A Sérica (GARCIA-OBREGON *et al.*, 2018).

Análises proteômica realizadas no plasma sanguíneo de pacientes com *sepse* decorrente de pneumonia adquirida na comunidade, comparados com voluntários saudáveis, na admissão e após 7 dias de acompanhamento, encontraram proteínas diferencialmente expressas relacionadas a alterações no citoesqueleto, montagem celular, metabolismo lipídico e respostas imunes em pacientes sépticos (SHARMA *et al.*, 2017).

O conhecimento dos diferentes perfis proteômicos na evolução do quadro séptico é de grande importância na busca de biomarcadores eficientes, uma vez que moléculas como proteína C reativa, procalcitonina, proteína do fator de von Willebrand, interleucinas e outras proteínas pró-inflamatórias importantes, foram propostas como marcadores para a gravidade de *sepse* (GRONDMAN *et al.*, 2020; KLEIN *et al.*, 2021). No entanto, nenhuma dessas moléculas obteve ampla aceitação clínica (VENTETUOLO; LEVY, 2008).

Pode-se considerar, ainda, que os diferentes perfis proteômicos aqui descritos constituem um banco de dados de proteínas candidatas a biomarcadores da *sepse*, tanto para proteínas marcadoras de um prognóstico de melhora do paciente, extraídas dos tratamentos Alta, quanto para proteínas marcadoras do agravamento clínico, por meio do tratamento óbito.

Os papéis precisos da maioria dos biomarcadores no manejo de pacientes sépticos não são bem definidos e, dos muitos biomarcadores estudados, apenas alguns foram avaliados em estudos grandes ou repetidos. Além disso, há uma carência de estudos que avaliam a alteração proteômica em relação ao tempo e pacientes que contrastaram entre alta e óbito. Por isso, a continuação deste estudo visa identificar os *spots* diferencialmente abundantes por meio de espectrometria de massas e posterior busca de similaridade em banco de dados. Após essa identificação das proteínas, espera-se identificar as principais vias envolvidas no desenvolvimento da doença.

5. CONCLUSÃO

A análise de *spots* de proteínas obtidas nos géis 2-DE mostrou diferenças entre os grupos estudados e ao longo do tempo. Alta e óbito apresentou maiores números de *spots* com diferenças significativas, e a comparação ao longo do tempo, mostrou diferença maiores no grupo óbito entre T2 e T3.

Este estudo de análise proteômica produziu dois resultados principais: ratificou que a análise de proteoma é uma ferramenta útil para apontar alterações precoces na abundância de proteínas em pacientes com sepse, e mostrou que pode haver alterações de proteínas específicas em isoformas, a serem confirmadas após identificação dos *spots* por espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

- ATKINSON, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001.
- BARBEIRO, H. V.; BARBEIRO, D. F.; SORIANO, F. G. **Sepsis: Future role of omics in diagnosis and therapy**. Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers. Elsevier, 2019. pp. 281–289.
- BLANCO, J. *et al.* Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: A Spanish multicentre study. **Critical Care**, v. 12, n. 6, p. R158, 2008.
- BONE, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644–1655, 1992.
- BOZZA, F. A. *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: A multiplex analysis. **Critical Care**, v. 11, n. 2, p. R492007.
- CAMBIAGHI, A. J. B. *et al.* An Innovative Approach for The Integration of Proteomics and Metabolomics Data In Severe Septic Shock Patients Stratified for Mortality. **Sci Rep.**, v. 8, n. 6681, np, 2018.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–891, 2002.
- CONWAY-MORRIS, A.; WILSON, J.; SHANKAR-HARI, M. Immune Activation in Sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 34, n. 1, p. 29–42, 2018.
- CORTES-PUCH, I.; HARTOG, C. S. Change is not necessarily progress: Revision of the sepsis definition should be based on new scientific insights. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 194, n. 1, p. 16–18, 2016.
- DING, W. *et al.* Clinical Multi-Omics Study on the Gut Microbiota in Critically Ill Patients After Cardiovascular Surgery Combined With Cardiopulmonary Bypass With or Without Sepsis (MUL-GM-CSCP Study): A Prospective Study Protocol. *Frontiers in Medicine*, v. 8, n.7, p. 269, Jul 2020. 2020
- FENG, A. *et al.* (2021). Identification of S1PR3 gene signature involved in survival of sepsis patients. **BMC Medical Genomics**, v. 14, n. 1, p. 43, 2021.
- FERRER, R. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: Results from a guideline-based performance improvement program. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 8, p. 1749–1755, 2014.
- FRANEKOVÁ, J. *et al.* Changes in Sepsis Biomarkers after Immunosuppressant Administration in Transplant Patients. **Mediators of Inflammation**, vol. 2021, 9 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8831659>

GAIESKI, D. F. *et al.* Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the united states. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 5, p. 1167–1174, 2013.

GARCIA-OBREGON, S. *et al.* Identification of a panel of serum protein markers in early stage of sepsis and its validation in a cohort of patients. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 4, p. 465–472, 2018.

GOH, K. H. *et al.* Artificial intelligence in sepsis early prediction and diagnosis using unstructured data in healthcare. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2021.

GRONDMAN, I. *et al.* Biomarkers of inflammation and the etiology of sepsis. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2020.

HAYASHI, S. *et al.* Multiple biomarkers of sepsis identified by novel time-lapse proteomics of patient serum. **PLoS One**, v. 14, n. 9, p1-25, 2019.

HULKA, B. S.; WILCOSKY, T. Biological markers in epidemiologic research. **Archives of Environmental Health**, v. 43, n. 2, p. 83–89, 1988.

KALENKA, A. M. D. *et al.* Changes in the Serum Proteome of Patients with Sepsis and Septic Shock. **Anesthesia & Analgesia**, v. 103, n. 6, p. 1522-1526, 2006.

KIM, M. H.; CHOI, J. H. (2020). An update on sepsis biomarkers. **Infection and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2020.

KLEIN, H. J. *et al.* Response of routine inflammatory biomarkers and novel Pancreatic Stone Protein to inhalation injury and its interference with sepsis detection in severely burned patients. **Burns**, v. 47, n. 2, p. 338–348, 2021.

KOMOROWSKI, M. *et al.* The Artificial Intelligence Clinician learns optimal treatment strategies for sepsis in intensive care. **Nature Medicine**, v. 24, n. 11, p. 1716–1720, 2018.

KUMAR, A. *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 6, p. 1589–1596, 2006.

LANGLEY, R. J. *et al.* An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. *Sci Transl Med*.v.5, n.195, pp.195ra95, 2013.
doi:10.1126/scitranslmed.3005893

LEVY, M. M. *et al.* SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med**, v. 31, p. 1250-1256, 2003.

LOPES FERREIRA, F. *et al.* Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. **Journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 14, p. 1754–1758, 2001.

MANCINI, N. *et al.* The era of molecular and other non-culture-based methods in

diagnosis of sepsis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 235–251, 2010.

MANETTI, A. C. *et al.* Micrnas and sepsis-induced cardiac dysfunction: A systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–15, 2021.

MANGIONI, D. *et al.* Toward Rapid Sepsis Diagnosis and Patient Stratification: What's New from Microbiology and Omics Science. **Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 7, p. 1039–1047, 2020.

MARSHALL, J. C.; REINHART, K. Biomarkers of sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 7, p. 2290–2298, 2009.

MERA, S. *et al.* Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. **Apmis**, v. 119, n. 2, p. 155–163, 2011.

MOVAHEDIAN, A. H. *et al.* Bacterial culture of neonatal sepsis. **Iranian Journal of Public Health**, v. 35, n. 4, p. 84–89. 2006.

NAYLOR, S. Biomarkers: Current perspectives and future prospects. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 3, n. 5, p. 525–529, 2003.

OPAL, S. M. *et al.* The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 7, p. 504–512, November 2005. <https://doi.org/10.1086/432007>

PADKIN, A. *et al.* (2003). Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 9, p. 2332–2338, 2003.

PIERRAKOS, C. *et al.* Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. **Crit Care**, v. 24, n.1, p. 287, 2020.

PUNYADEERA, C. *et al.* A biomarker panel to discriminate between systemic inflammatory response syndrome and sepsis and sepsis severity. **Journal of Emergencies, Trauma and Shock**, v. 3, n. 1, p. 26–35, 2010.

REYES, M. *et al.* An immune-cell signature of bacterial sepsis. **Nature Medicine**, v. 26, n. 3, p. 333–340, 2020.

RHODES, A. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 3, p. 304–377, 2017.

SHARMA, N. K., *et al.* Proteomic study revealed cellular assembly and lipid metabolism dysregulation in sepsis secondary to community-acquired pneumonia. **Sci Rep.**, v. 7, n. 15606, 2017.

SINGER, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n.

8, p. 801–810, 2016.

SORRENTINO, J. T. *et al.* Decoding Glycoproteome Remodeling in Sepsis through Integrative Multi-Omics Analysis and Parts-Based Data Representation. **The FASEB Journal**, v. 34, p. 1, 2020.

SWEENEY, T. E. *et al.* A community approach to mortality prediction in sepsis via gene expression analysis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 694. 2018. doi:10.1038/s41467-018-03078-2.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Host-pathogen interactions in sepsis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 32–43, 2008.

VAN DER POLL, T. *et al.* The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 7, p. 407–420, 2017.

VENTETUOLO, C. E.; LEVY, M. M. Biomarkers: Diagnosis and Risk Assessment in Sepsis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 29, n. 4, p. 591–603, 2008.

WONG, H. R. *et al.* Biomarkers for Estimating Risk of Hospital Mortality and Long-Term Quality-of-Life Morbidity after Surviving Pediatric Septic Shock: A Secondary Analysis of the Life after Pediatric Sepsis Evaluation Investigation*. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 22, n. 1, p. 8–15, 2021.

WU, X. *et al.* Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. **Nature Protocols**, v. 9, n. 2, p. 362–374, 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Microfluidics for sepsis early diagnosis and prognosis: A review of recent methods. **Analyst**, v. 146, n. 7, p. 2110–2125, 2021.

ZHENG, X. *et al.* (2021). Long non-coding RNA pairs to assist in diagnosing sepsis. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 275, 16 Apr 2021,

ZUPANČIČ, U. *et al.* Graphene Enabled Low-Noise Surface Chemistry for Multiplexed Sepsis Biomarker Detection in Whole Blood. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 16, p.11, 2021.

4. CONCLUSÃO GERAL

As conclusões da presente tese de doutorado, confrontada com os objetivos específicos do estudo, podem ser assim apresentadas:

Objetivo específico 1. Descrever os principais microrganismos e avaliar a resistência antimicrobiana em amostras clínicas de pacientes internados com *seps* em uma UTI de adultos.

Conclusão 1.

Os microrganismos isolados, relacionados à colonização, foram a *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Acinetobacter* spp. A infecção do trato urinário foi a mais frequente e o principal microrganismo relacionado a infecção foi a *Pseudomonas aeruginosa*. Maior resistência antimicrobiana foi observado para o ciprofloxacino em todas as culturas investigadas. Esses achados reforçam a impotência das culturas de vigilância em UTI, as quais podem ajudar no controle da disseminação de microrganismos multirresistentes.

Objetivo específico 2. Comparar os parâmetros bioquímicos e as relações entre neutrófilo/linfócitos (RNL), plaquetas/linfócitos (RPL) e linfócitos/monócitos (RLM) de pacientes de uma UTI, que apresentaram *seps*.

Conclusão 2.

Observou-se que há diferenças ao longo do tempo entre os pacientes com *seps* que sobreviveram e não sobreviveram. Os pacientes que foram a óbito apresentaram aumento ao longo do tempo para os valores de RNL, ao contrário dos doentes que sobreviveram, os quais apresentaram queda nesses valores ao longo do tempo. Os pacientes com *seps* que foram a óbito apresentaram valores de creatinina, ureia, FiO₂ superiores comparado aos sobreviventes ao longo do tempo. Parâmetros bioquímicos como RNL e outros devem ser explorados como candidatos ao diagnóstico ou prognóstico de *seps*.

Objetivo específico 3. Identificar alterações na quantidade e na abundância de *spots* de proteínas do soro sanguíneo de pacientes com *seps*, com base no padrão de tempo e desfecho da doença.

Conclusão 3.

Pacientes com *seps* apresentaram alterações nos *spots* de proteína quanto ao tempo e desfecho da doença nas comparações realizadas entre pacientes que

sobreviveram e não sobreviveram. Os pacientes que evoluíram para óbito, apresentaram abundância maior de *spots* de proteínas comparado aos sobreviventes ao longo tempo principalmente nas comparações realizadas entre os tempos T2 e T3. Desse modo, as análises realizadas, indicam que foram encontrados *spots* de proteínas candidatos a biomarcador para sepse, tanto relacionado ao prognóstico da doença quanto do agravamento clínico.

ANEXO

ANEXO 1 – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-1269

Of. Ref. N° 088/2011/Comitê de Ética

Viçosa, 08 de julho de 2011.

Prezado Professor:

Cientificamos V. S^a. de que o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, em sua 5ª Reunião de 2011, realizada nesta data, analisou e aprovou, sob o aspecto ético, o projeto de pesquisa intitulado *Avaliação clínica e análise proteômica de pacientes com sepse internados em unidade de terapia intensiva.*

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Junqueira Del Carlo'.

Professor Ricardo Junqueira Del Carlo
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Vice-Presidente em exercício

Professor
Rodrigo Siqueira Batista
Departamento de Medicina e Enfermagem