

MARIANA BENEVIDES SANTOS PAIVA

Avaliação da utilidade diagnóstica da procalcitonina e da
proteína C reativa em pacientes críticos com síndrome
respiratória aguda grave e suspeita de infecção pelo vírus
influenza A H1N1 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2012

MARIANA BENEVIDES SANTOS PAIVA

Avaliação da utilidade diagnóstica da procalcitonina e da
proteína C reativa em pacientes críticos com síndrome
respiratória aguda grave e suspeita de infecção pelo vírus
influenza A H1N1 2009

Dissertação apresentada no curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

Co-orientador: Prof. Fernando Antônio Botoni

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof^a. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Francisco José Penna

DEPARTAMENTO DE CLINICA MÉDICA

Chefe do departamento: Prof^a. Anelise Impilziere Nogueira

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr. (Coordenador)

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Subcoordenador)

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Jr.

Antônio Vaz de Macedo (Representante discente)

De que serve a bondade
Quando os bondosos são logo abatidos, ou são abatidos
Aqueles para quem foram bondosos?

De que serve a liberdade
Quando os livres têm que viver entre os não-livres?

De que serve a razão
Quando só a sem-razão arranja a comida de que cada um precisa?

Em vez de serdes só bondosos, esforçai-vos
Por criar uma situação que torne possível a bondade, e melhor;
A faça supérflua!

Em vez de serdes só livres, esforçai-vos
Por criar uma situação que a todos liberte
E também o amor da liberdade
Faça supérfluo!

Em vez de serdes só razoáveis, esforçai-vos
Por criar uma situação que faça da sem-razão dos indivíduos
Um mau negócio!

Bertold Brecht

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Vandack, por acreditar que era possível, por me guiar nessa caminhada algumas vezes difícil e permanecer sempre como um grande exemplo de médico, professor e amigo a ser seguido.

Ao meu co-orientador Prof. Botoni, por me fazer acreditar na terapia intensiva.

À equipe do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG e do Laboratório Geraldo Lustosa, no Hospital Risoleta Tolentino Neves, que permitiu e realizou as dosagens de procalcitonina e proteína C reativa do projeto com presteza e competência.

Ao Prof. Antônio Lúcio e à colega Aline Miranda, pela realização das dosagens de citocinas.

Aos estudantes de medicina Guilherme e Jamila, pela ajuda na coleta de dados.

À equipe do CTI do Hospital Risoleta Tolentino Neves, pelo incentivo e apoio em um momento árduo para todos nós.

Aos amigos da UCO, por acreditarem desde o início que poderíamos fazer mais e por tornarem o ambiente sempre inspirador para o aprendizado.

Aos pacientes, pela participação nesse estudo.

Ao Guigo e à Clara, pela compreensão da ausência e pela paciência exigida.

À minha mãe, por sempre me trazer calma nos momentos difíceis.

Ao meu pai, por me ensinar a estudar.

A toda a minha família, pela confiança.

Ao Felipe, um feliz reencontro no meio dessa caminhada, pelos momentos maravilhosos que provam que tudo vale a pena.

RESUMO

Na vigência de uma pandemia de gripe, existe dificuldade em se diferenciar, à admissão do paciente no centro de terapia intensiva, se o quadro de insuficiência respiratória aguda é causado pelo vírus influenza ou por outros agentes infecciosos, ou ainda se se trata de um processo não infeccioso. O objetivo do presente estudo foi avaliar a utilidade da procalcitonina e da proteína C reativa na identificação etiológica e na caracterização da gravidade em pacientes internados no CTI com síndrome gripal aguda grave e suspeita de infecção pelo vírus influenza A H1N1 pandêmico. Adicionalmente, avaliou-se o comportamento de quatro citocinas (fator de necrose tumoral- α , interferon- γ , interleucina-1 β e interleucina-10) nesses pacientes. Todos os biomarcadores foram dosados à admissão, e nos dias 3, 5 e 7 da internação em 35 pacientes internados no centro de terapia intensiva de dois hospitais universitários, com infecção suspeita pelo vírus 2009 influenza A H1N1. Três grupos foram constituídos: (i) 12 (34.3%) pacientes com infecção confirmada pelo 2009 influenza A H1N1; (ii) 6 (17.1%) pacientes com influenza sazonal; e (iii) 17 (48.6%) pacientes com *swabs* negativos para vírus influenza. Os níveis de procalcitonina à admissão ($p=0,005$) e no terceiro dia ($p=0,015$), e de proteína C reativa no terceiro dia ($0,024$), encontravam-se elevados nos pacientes com infecção confirmada pelo 2009 influenza A H1N1 comparados aos dois outros grupos estudados. Considerando-se as citocinas avaliadas, o nível sérico de interleucina-1 β à admissão mostrou-se mais elevado nos pacientes com infecção pelo 2009 influenza A H1N1 em relação aos outros grupos ($p=0,014$). A proteína C reativa nos dias 3, 5 e 7 ($p=0,047$, $p=0,012$ e $p=0,008$, respectivamente) e a procalcitonina nos dias 5 e 7 ($p=0,019$ e $p=0,001$, respectivamente) apresentaram níveis mais baixos nos pacientes que sobreviveram. Em conclusão, observou-se níveis mais altos de procalcitonina, proteína C reativa e interleucina 1 β nos pacientes críticos com síndrome respiratória aguda grave causada pelo influenza A H1N1 em comparação aos pacientes com insuficiência respiratória por outra etiologia. Considerando-se toda a população estudada, os níveis de procalcitonina nos dias 5 e 7, e de proteína C reativa nos dias 3, 5 e 7 após a admissão associaram-se à mortalidade intra-hospitalar.

Palavras-chave: 2009 influenza A H1N1, procalcitonina, proteína C reativa, biomarcador, sensibilidade, especificidade.

ABSTRACT

During the 2009 influenza A H1N1 pandemic it became difficult to differentiate viral infection from other conditions in patients admitted to the Intensive Care Unit. We sought to evaluate the utility of circulating serum levels of procalcitonin and C-reactive protein to differentiate the 2009 influenza A H1N1 infection from other conditions in patients admitted to the intensive care unit with severe acute respiratory illness during the pandemic; and to investigate the behavior of circulating levels of four cytokines (tumor necrosis factor- α , interferon- γ , interleukin-1 β and interleukin-10) in those patients. To this, we performed prospective measurements of these molecules in 35 consecutive patients admitted to two University Hospitals' intensive care units with suspected 2009 influenza A H1N1 pneumonia on admission and on days 3, 5 and 7. Three groups were constituted: (i) 12 (34.3%) patients with confirmed 2009 influenza A H1N1 infection; (ii) 6 (17.1%) patients with seasonal influenza infection; (iii) 17 (48.6%) patients with negative swabs for influenza virus. Circulating levels of PCT at inclusion and on day 3, and CRP on day 3, were significantly higher among subjects with confirmed 2009 influenza A H1N1 infection compared the other two groups of critically ill patients, $p=0.005$, $p=0.015$ and $p=0.024$, respectively. Regarding the tested cytokines, baseline levels of interleukin-1 β were significantly higher among patients of 2009 influenza A H1N1 group compared to the other groups ($p=0.014$). CRP levels on day 3, 5 and 7 ($p=0.047$, $p=0.012$ and $p=0.008$, respectively) and PCT levels on days 5 and 7 ($p=0.019$ and $p=0.001$, respectively), were significantly higher in non-surviving patients. In conclusion, we found higher levels of procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-1 β among critically ill patients with severe acute respiratory illness due to 2009 influenza A H1N1 compared to those cases related to seasonal influenza infection and non-influenza diagnoses. In the analysis including the 35 patients, procalcitonin on days 5 and on day 7, and C-reactive protein on days 3, day 5 and day 7 following admission were associated with all-cause hospital mortality.

Key words: 2009 influenza A H1N1, procalcitonin, C-reactive protein, biomarker, sensitivity, specificity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 2009 H1N1: vírus 2009 influenza A H1N1
- AKIN: *Acute Kidney Injury Network*
- APACHE II: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*
- AUC: *Area under the receiver operating characteristic curve*
- CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention
- CI: *Confidence Interval*
- CRP: *c-reactive protein*
- CT: calcitonina
- CTI: Centro de Terapia Intensiva
- DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- ECMO: *Extracorporeal Membrane Oxygenation*
- ELISA: *Enzyme linked immunoassay*
- FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
- FUNED: Fundação Ezequiel Dias
- IC: Intervalo de confiança
- ICU: *Intensive care unit*
- IFN- γ : Interferon gama
- IL-10: Interleucina 10, *interleukin 10*
- IL-1 β : Interleucina 1 beta, *Interleukin 1beta*
- IL-6: Interleucina 6
- INF- δ : interferon delta
- IQR: Interquartile range
- LOS: *Length of stay*
- mg/dL: miligramas por decilitro
- mm³: milímetros cúbicos
- ng/mL: nanogramas por mililitro
- PCR: Proteína C reativa
- PCT: Procalcitonina, *procalcitonin*
- pg/ml: picograma por mililitro

- PSI: *Pneumonia Severity Index*
- RIDT: *Rapid influenza diagnostic test*
- ROC: Receiver operating characteristic curve
- RT-PCR: *Real Time Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction*
- SARA: Síndrome da angústia respiratória do adulto
- SD: Standard deviation
- SIRS: Síndrome da resposta inflamatória sistêmica, *systemic inflammatory response syndrome*
- SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment Score*
- SRAG: Síndrome respiratória aguda grave
- TLR: Toll-like receptor
- TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa, *tumor necrosis fator alpha*
- UCO: CTI clínico e Unidade Coronariana

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1. Estrutura molecular e morfologia da PCR humana. Extraído de PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, M. B. J. Clin. Invest., 2003 _____ 24

Figura 2. A importância do teste de mensuração da PCT utilizado. Extraído de CHRIST-CRAIN, M.; MULLER, B. Swiss Medical Weekly, 2005 _____ 29

Gráficos

Gráfico 1. Incidência de influenza pandêmica por região geográfica e semana epidemiológica de início de sintomas. Brasil, SE 16 a 47 de 2009. Extraído de informe epidemiológico influenza pandêmica (H1N1) 2009, edição número 11, dezembro __ 17

Gráfico 2. Níveis de procalcitonina observados em quatro momentos de acordo com o respectivo grupo (Figure 1. Circulating levels of procalcitonin observed in the studied patients at the four points of measurement, according to the respective group) ____ 48

Gráfico 3. Níveis de proteína C reativa observados em quatro momentos de acordo com o respectivo grupo (Figure 2. Circulating levels of C-reactive protein observed in the studied patients at the four points of measurement, according to the respective group) _____ 48

Gráfico 4. Comportamento dos níveis séricos de proteína C reativa durante os primeiros sete dias de acompanhamento nos três grupos estudados (Figure 3. Behavior of circulating levels of CRP during the first seven days of follow up in the three studied groups) _____ 50

Gráfico 5. Comportamento dos níveis séricos de procalcitonina durante os primeiros sete dias de acompanhamento nos três grupos estudados (Figure 4. Behavior of circulating levels of PCT during the first seven days of follow up in the three studied groups) _____ 51

Gráfico 6. Valores de SOFA à admissão por sistema orgânico _____ 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doses recomendadas de oseltamivir para crianças de 1 a 12 anos, de acordo com o peso. Extraído de Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância Epidemiológica da influenza, versão III, 5 de agosto de 2009, Ministério da Saúde, Brasil _____22

Tabela 2. Características dos grupos estudados (Table 1. Patients' main characteristics)
_____46

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A- Formulário individual para o registro das características clínicas e laboratoriais _____ 73

Apêndice B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido / Paciente _____ 79

Apêndice C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido / Responsável _____ 80

LISTA DE ANEXOS

Anexo A- Parecer do comitê de ética em pesquisa da UFMG _____ 85

Anexo B- Ata da defesa de dissertação _____ 86

Anexo C- Declaração de aprovação _____ 87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 VÍRUS INFLUENZA A H1N1 PANDEMICO	16
2.1.1 Epidemiologia	16
2.1.2 Características clínicas	18
2.1.3 Diagnóstico	19
2.1.4 Tratamento	20
2.1.4.1 Terapia anti-viral	20
2.1.4.2 Tratamento de suporte clínico	22
2.2 MARCADORES DE INFECÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA	23
2.2.1 Proteína C reativa	24
2.2.2 Procalcitonina	27
2.2.3 Citocinas	31
2.2.3.1 Fator de necrose tumoral alfa	32
2.2.3.2 Interleucina 1 beta	33
2.2.3.3 Interferon gama	34
2.2.3.4 Interleucina 10	34
2.3 BIOMARCADORES NA INFECÇÃO PELO VÍRUS 2009 INFLUENZA A H1N1	35
3. JUSTIFICATIVA	38
4.1. OBJETIVO GERAL	39
4.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	39
5. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	40
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. APÊNDICES	73
10. ANEXOS.....	85

1. INTRODUÇÃO

Em março e abril de 2009 foram identificados os primeiros casos de infecção por um novo vírus influenza A H1N1 de origem suína (2009 H1N1). O alerta partiu da OMS, que comunicou aos seus países membros a ocorrência de casos de gripe no México e nos Estados Unidos. Desde então, houve disseminação rápida do vírus, e em junho de 2009 a Organização Mundial de Saúde elevou o alerta de pandemias para o nível mais alto, identificado como “Fase 6”. Até 11 de outubro desse mesmo ano, considerado o fim da primeira onda e início da segunda, já haviam sido confirmados laboratorialmente aproximadamente 400.000 casos, em 160 países, com 4735 mortes informadas à Organização Mundial de Saúde (Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009, 2009; LAGACE-WIENS, RUBINSTEIN e GUMEL, 2010).

Na vigência de uma pandemia de gripe, existe dificuldade em se diferenciar, à admissão do paciente no Centro de Terapia Intensiva (CTI), se o quadro de insuficiência respiratória aguda é causado pelo vírus influenza ou por outros agentes infecciosos, ou ainda se se trata de um processo não infeccioso. Por fim, podem ocorrer infecções mistas, bacterianas e virais, as quais podem ser concomitantes ou subsequentes (ROTHBERG e HAESSLER, 2010). A pesquisa viral nas secreções respiratórias pela técnica de *Real Time Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction* (RT-PCR) não se mostra útil para a decisão terapêutica inicial, já que os resultados demandam entre 48h e 72h para serem liberados (BOGGILD e MCGEER, 2010). Sabe-se que os dados clínicos e a contagem de leucócitos não são suficientemente confiáveis para diferenciar infecção bacteriana e viral, ou para identificar outros tipos de acometimento pulmonar (CHRIST-CRAIN e OPAL, 2010). Nesse contexto, a dosagem de marcadores inflamatórios pode ser útil. A proteína C reativa tem sido tradicionalmente utilizada para esse fim, entretanto, questiona-se a sua capacidade de distinguir entre os diferentes processos (FLOOD, BADIK e ARONOFF, 2008). Mais recentemente, a procalcitonina começou a ser utilizada para auxiliar no diagnóstico, definir o

prognóstico, e guiar a terapia antimicrobiana de pacientes com suspeita de infecções respiratórias (HARBARTH *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2008; NOBRE *et al.*, 2008).

Este estudo teve como objetivo avaliar a utilidade da procalcitonina e da proteína C reativa na diferenciação dos processos causados pelo 2009 H1N1 de outras síndromes infecciosas, notadamente bacterianas, e de processos não infecciosos, em pacientes internados no CTI com síndrome respiratória aguda grave (SRAG) durante uma pandemia de gripe. Investigou-se também o comportamento de quatro citocinas séricas nesses pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VÍRUS INFLUENZA A H1N1 PANDEMICO

Em março de 2009 foram identificados os primeiros casos de infecção humana pelo 2009 H1N1 no México (PEREZ-PADILLA *et al.*, 2009). Esse subtipo de influenza A não havia sido identificado anteriormente em humanos, sendo um híbrido de duas cepas suínas, uma cepa humana e uma cepa aviária de influenza (DAWOOD *et al.*, 2009). Várias cepas isoladas nos Estados Unidos eram geneticamente idênticas às isoladas no México, comprovando a transmissão interpessoal, uma característica essencial para a disseminação viral rápida e de amplo alcance (Update: swine influenza A (H1N1) infections--California and Texas, April 2009, 2009).

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

A primeira onda da epidemia seguiu o curso típico de influenza. No México houve crescimento da incidência entre 9 e 24 de abril de 2009, com um pico em 26 de abril e rápido declínio, chegando a zero em 25 de maio. A duração aproximada foi de 12 semanas. A taxa de infecção confirmada foi de aproximadamente cinco por 100.000 habitantes, mas este número está provavelmente subestimado, devido à elevada proporção de casos subclínicos (Update: novel influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-May, 2009, 2009).

Com o aumento da vigilância em vários países após a notificação da Organização Mundial de Saúde, foram identificados surtos no Canadá, Estados Unidos, Oriente Médio, Leste da Ásia e Europa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a). Nos Estados Unidos a epidemia teve seu ápice em 20 de junho e o nadir em 25 de agosto (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2010a). Alguns países do hemisfério sul relataram o aparecimento do vírus mais tardiamente e uma maior duração da onda de epidemia. A epidemia teve duração aproximada de 18 semanas na Austrália e 13 semanas na Nova Zelândia (BAKER *et al.*, 2009; Pandemic (H1N1) Influenza 2009, 2010). A taxa de mortalidade geral foi menor que 0.5%, mas há incertezas em relação às notificações (BAUTISTA *et al.*, 2010). A taxa de mortalidade considerando-se os

casos sintomáticos foi estimada em 0,048% nos Estados Unidos e 0,026% no Reino Unido (DONALDSON *et al.*, 2009; PRESANIS *et al.*, 2009). Em contraste com o influenza sazonal, a maioria dos casos graves causados pelo vírus pandêmico ocorre entre as crianças e adultos jovens, e aproximadamente 90% das mortes ocorreram entre aqueles com menos de 65 anos (BAUTISTA *et al.*, 2010).

No Brasil foram confirmados 30.055 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) por algum vírus influenza entre 19 de abril e 28 de novembro de 2009. O 2009 H1N1 foi responsável por 93% dos casos, enquanto o influenza sazonal foi identificado em apenas 7% deles. A taxa de incidência de SRAG no Brasil foi de 14,5 casos para cada 100.000 habitantes, com taxas mais elevadas nas regiões sul e sudeste (66,2/100.000 e 9,7/100.000 respectivamente) em relação às outras regiões (Gráfico 1). A pandemia teve duração aproximada de 18 semanas, com o pico de incidência entre os dias 2 e 8 de agosto de 2009, que correspondem à semana epidemiológica 31 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b).

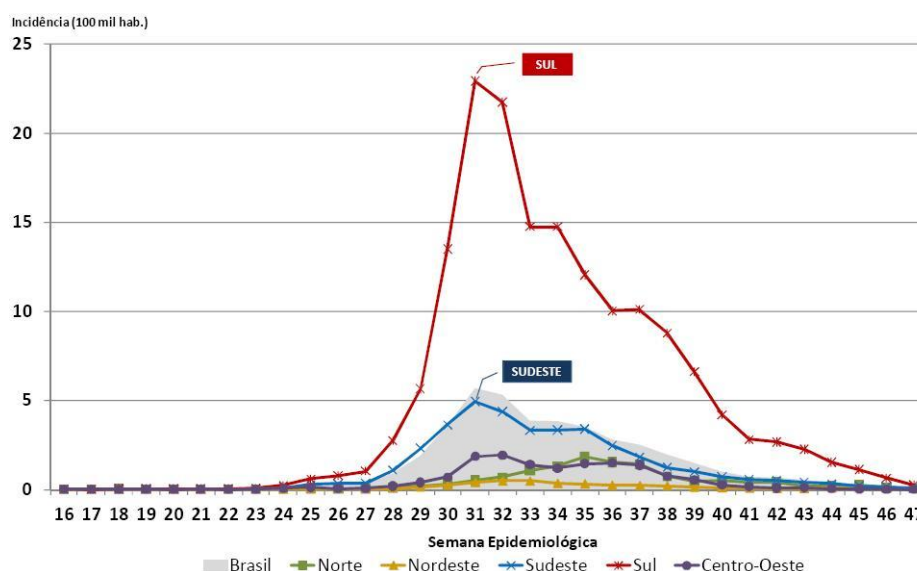


Gráfico 1- Incidência de influenza pandêmica por região geográfica e semana epidemiológica de início de sintomas. Brasil, SE 16 a 47 de 2009. Extraído de informe epidemiológico influenza pandêmica (H1N1) 2009, edição número 11, dezembro de 2009.

Dentre os 27.850 casos de SRAG confirmados por 2009 H1N1, 1.632 (5,8%) evoluíram para óbito. A taxa de mortalidade pelo 2009 H1N1 no Brasil foi de 0,85 para

cada 100.000 habitantes, com maiores taxas observadas nas regiões sul e sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b).

2.1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

O período de incubação do 2009 H1N1 é de aproximadamente um dia e meio a três dias, similar ao influenza sazonal (CAUCHEMEZ *et al.*, 2009; LESSLER *et al.*, 2009). Na ausência de complicações, a carga de RNA viral tem um pico no dia de início dos sintomas, com queda gradual subsequente (TO, CHAN, *et al.*, 2010). A carga viral, entretanto, encontra-se mais elevada na nasofaringe de pacientes com SRAG e apresenta uma redução lenta naqueles pacientes com necessidade de cuidados intensivos (TO, HUNG, *et al.*, 2010). Um relato francês demonstrou a presença de RNA viral nas secreções respiratórias de dois pacientes 14 e 28 dias após o início dos sintomas (FLEURY *et al.*, 2009).

A infecção pelo 2009 H1N1 pode causar uma sintomatologia ampla, desde apenas sintomas respiratórios leves até a SRAG. A maioria dos pacientes, felizmente, desenvolve a forma mais branda da doença. Os principais sintomas descritos são febre, tosse e faringite. Sintomas gastrointestinais são mais frequentes nos pacientes infectados pelo 2009 H1N1 que pelo influenza sazonal (DAWOOD *et al.*, 2009; JAIN *et al.*, 2009). O Ministério da Saúde do Brasil definiu a SRAG como uma síndrome presente em indivíduo de qualquer idade apresentando doença respiratória aguda caracterizada por febre superior a 38°C, tosse e dispneia. O principal sintoma de diferenciação entre um caso leve e uma possível infecção grave é a dispneia, determinando acompanhamento, início de terapia antiviral e avaliação de necessidade de hospitalização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

Considerando-se os exames laboratoriais, nos pacientes que foram hospitalizados, observou-se tanto leucocitose como leucopenia. Dos pacientes com pneumonia grave acompanhados no México, muitos apresentaram também elevação de aminotransferases, de desidrogenase láctica e de creatinofosfoquinase (PEREZ-PADILLA *et al.*, 2009).

As possíveis complicações da infecção pelo 2009 H1N1 são: pneumonia viral primária, pneumonia bacteriana secundária e exacerbação de doenças pulmonares pré-existentes como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). A principal síndrome clínica responsável pela hospitalização e internação em CTI foi pneumonia viral difusa associada à hipoxemia grave e Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA). Alguns pacientes também desenvolveram choque e insuficiência renal aguda concomitante (KUMAR *et al.*, 2009; WEBB *et al.*, 2009). A coinfeção bacteriana foi suspeitada ou diagnosticada em 20 a 24% dos pacientes admitidos em CTIs do Canadá, Austrália e Nova Zelândia (KUMAR *et al.*, 2009; WEBB *et al.*, 2009). Em três trabalhos com necropsias de pacientes com infecção confirmada pelo 2009 H1N1, demonstrou-se a presença de bactérias no pulmão em 26 a 38% dos casos. Os principais agentes etiológicos encontrados foram *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009, 2009; MAUAD *et al.*, 2010; SHIEH *et al.*, 2010). A infecção viral é sabidamente um desencadeante de exacerbações de doenças pulmonares crônicas. Dentre os pacientes hospitalizados com infecção pelo H1N1, história pregressa de asma estava presente em 24 a 50% e de DPOC em 36% (JAIN *et al.*, 2009; LOUIE *et al.*, 2009).

2.1.3 DIAGNÓSTICO

Considerando-se que o diagnóstico confirmatório da infecção pelo 2009 H1N1 não altera a condução clínica inicial dos pacientes, a coleta de material para pesquisa do vírus durante a pandemia era recomendada apenas quando o resultado fosse importante para a gerência (isolamento de contatos, gestão de leitos hospitalares etc.) ou para vigilância epidemiológica. Em geral realizava-se o teste apenas em pacientes hospitalizados, com fatores de risco para complicações ou em deterioração clínica (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2009b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

O teste diagnóstico de maior acurácia na identificação do 2009 H1N1 nas secreções respiratórias é a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

(RT-PCR). A sua sensibilidade varia entre 90 a 100% e a especificidade é de 100% (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2009b; BOGGILD e MCGEER, 2010). Os testes rápidos de diagnóstico de influenza (rapid influenza diagnostic test, RIDT) não devem ser utilizados devido à baixa sensibilidade, que varia entre 40 e 69% (Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus - United States, 2009, 2009). Os espécimes clínicos ideais utilizados para o diagnóstico são os *swabs* ou aspirados de nasofaringe colhidos nos primeiros dias após o início dos sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a; BOGGILD e MCGEER, 2010). As secreções traqueais dos pacientes submetidos à intubação orotraqueal também podem ser utilizadas, havendo inclusive alguns relatos de maior sensibilidade que o material de nasofaringe (BLYTH, IREDELL e DWYER, 2009). O tempo necessário para a obtenção do resultado definitivo da RT-PCR pode variar, entretanto, de um a vários dias, de acordo com a capacidade e expertise do laboratório local (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2009b), impossibilitando sua utilização para decisões terapêuticas iniciais.

2.1.4 TRATAMENTO

O tratamento da infecção pelo 2009 H1N1 envolve ações específicas, como o uso de antivirais, e terapias de suporte clínico, que dependem da gravidade do paciente.

2.1.4.1 TERAPIA ANTIVIRAL

O 2009 H1N1 é susceptível aos inibidores de neuroaminidase, oseltamivir e zanamivir, mas geralmente resistente aos inibidores de canais de íon M2, amantadina e rimantadina (ITOH *et al.*, 2009). A terapia precoce com oseltamivir em pacientes com infecção pelo 2009 H1N1 aparentemente reduziu a duração da hospitalização e o risco de progressão para formas mais graves (JAIN *et al.*, 2009; LOUIE *et al.*, 2010).

O tratamento precoce com oseltamivir durante a pandemia foi indicado nos pacientes com doença não complicada que apresentavam fatores de risco para progressão e naqueles que desenvolviam formas mais graves da infecção. Os pacientes previamente saudáveis que desenvolviam apenas doença leve não apresentavam

benefício com a terapia antiviral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2010b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b).

Os fatores de risco identificados para o desenvolvimento de formas graves são (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a):

- Imunodepressão: indivíduos transplantados, pacientes com câncer, em tratamento para a síndrome da imunodeficiência adquirida ou em uso de medicação imunossupressora;
- Condições crônicas: hemoglobinopatias, cardiopatias, pneumopatias, doenças renais crônicas, doenças metabólicas (*diabetes mellitus* e obesidade mórbida com índice de massa corporal > 40);
- Idade inferior a dois ou superior a 60 anos de idade;
- Gestação: independente da idade gestacional.

Os pacientes que apresentam dispneia, associada à febre superior a 38°C e tosse, preenchem os critérios para SRAG e devem iniciar o uso de oseltamivir imediatamente, independente da presença de outro sinais ou sintomas de gravidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

O oseltamivir deve ser iniciado o mais rapidamente possível nos pacientes que apresentam indicação para o seu uso. Ele deve ser administrado na posologia de um comprimido de 75mg a cada 12 horas, por cinco dias, para adultos. Para crianças entre um e doze anos, com menos de 40 kg, deve-se seguir o esquema de acordo com o peso (Tabela 1). Os pacientes obesos e aqueles em uso de sonda nasointestinal devem fazer uso da dose de 150 mg, duas vezes ao dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a). Pacientes graves, sob ventilação mecânica, também devem receber a dose de 150 mg de oseltamivir, a cada 12 horas, por 10 dias, de acordo com recomendação da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b).

Tabela 1- Doses recomendadas de oseltamivir para crianças de 1 a 12 anos, de acordo com o peso. Extraído de Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância Epidemiológica da influenza, versão III, 5 de agosto de 2009, Ministério da Saúde, Brasil.

Peso	Dose	Frequência
Menos de 15kg	30 mg	Duas vezes ao dia
De 15 a 23 kg	45 mg	Duas vezes ao dia
De 23 a 40 kg	60 mg	Duas vezes ao dia
Mais de 40 kg	75 mg	Duas vezes ao dia

2.1.4.2 TRATAMENTO DE SUPORTE CLÍNICO

O tratamento de suporte clínico varia de acordo com a gravidade da doença. Em casos leves é recomendado repouso, hidratação e antitérmicos. Entretanto 1 a 10% dos pacientes desenvolvem complicações da infecção pelo 2009 H1N1, com necessidade de hospitalização. Nesses casos, além do início imediato do oseltamivir, usualmente é indicada a administração de oxigênio suplementar e antimicrobianos. Como não há como obter um diagnóstico de certeza de infecção pelo 2009 H1N1 à admissão desses pacientes, além da impossibilidade de se descartar uma infecção bacteriana primária ou secundária, recomenda-se o início de antibioticoterapia empírica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Insuficiência respiratória rapidamente progressiva pode acometer 10 a 30% dos pacientes hospitalizados, demandando admissão ao CTI. No caso de evolução para pneumonia viral e SARA está indicada a ventilação mecânica invasiva, associada à estratégia de ventilação protetora (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Essa recomendação é baseada no estudo ARDSNet, que demonstrou uma redução do risco relativo de óbito em 22% no grupo ventilado com volume corrente reduzido (6 ml/kg de peso ideal) e pressão de *plateau* máxima de 30 cmH₂O (Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network,

2000). A estratégia de administração conservadora de fluidos também deve ser considerada, na tentativa de se reduzir o tempo de ventilação mecânica e a oxigenação (WIEDEMANN *et al.*, 2006). Em CTIs em que há experiência e tecnologia disponível, o uso de oxigenação por membrana extracorpórea (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO), ventilação em decúbito prono e ventilação em alta frequência podem ser terapias de resgate (DAVIES *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009).

2.2 MARCADORES BIOLÓGICOS DE INFECÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Os métodos tradicionais para diferenciar pneumonia bacteriana e viral incluem sistemas de classificação de sintomas e os resultados de estudos microbiológicos (CARRIGAN, SCOTT e TABRIZIAN, 2004). A capacidade de ambos os métodos em prever, com acurácia e precocidade, a ocorrência de infecção bacteriana em pacientes com resposta inflamatória sistêmica é bastante limitado (VINCENT, 1997; CARRIGAN *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2007).

O repertório de moléculas protéicas relacionados à sepse é extenso e inclui citocinas, quimiocinas, mediadores de adesão, receptores solúveis e proteínas de fase aguda (CARRIGAN *et al.*, 2004). Surpreendentemente, há ainda apenas dados limitados sobre a resposta de muitas delas, especialmente as citocinas, aos processos inflamatórios associados à infecção, o que dificulta a elaboração de conclusões mais consistentes (KELLUM *et al.*, 2007).

As citocinas, embora desempenhem um papel crucial na resposta imune inata do hospedeiro às infecções, possuem aplicabilidades clínica e diagnóstica ainda limitadas, já que estão implicadas na resposta precoce aos insultos infecciosos, possuindo tempos de meia-vida muito curtos (CARRIGAN *et al.*, 2004; REINHART, MEISNER e BRUNKHORST, 2006). A proteína C reativa (PCR) e a procalcitonina (PCT), em grande parte devido às maiores facilidades das técnicas diagnósticas, dos menores custos associados, e da cinética mais favorável à aplicabilidade clínica, foram os marcadores biológicos mais amplamente estudados para detecção de infecção bacteriana em

pacientes com síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (CARRIGAN *et al.*, 2004; REINHART *et al.*, 2006)

2.2.1. PROTEÍNA C REATIVA

A PCR, descoberta em 1930 e assim denominada por ser capaz de precipitar o polissacarídeo-C da parede celular do *Streptococcus pneumoniae*, foi a primeira proteína de fase aguda a ser descrita, sendo um marcador sensível de inflamação e dano tecidual (TILLET e FRANCIS, 1930). Pertence à família das pentraxinas, sendo composta por cinco subunidades idênticas de polipeptídeos não-glicosilados que adquirem uma configuração anular (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003). É produzida pelos hepatócitos sob estímulo principal da interleucina-6 (IL-6), atingindo seus valores de pico após cerca de 48 horas da ocorrência do insulto. Sua meia-vida é de aproximadamente 19 horas e sua concentração mediana em indivíduos saudáveis é de 0,8 mg/dL, sendo que o valor de 10 mg/dL engloba 99% da população considerada normal. Suas concentrações séricas não estão sujeitas às variações diurnas ou de alimentação (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003; HO e LIPMAN, 2009) e, à exceção da falência hepática fulminante, não há outras patologias que reduzem seus níveis no sangue. Poucas drogas (*e.g.* estatinas, niacina e fibratos) são capazes de diminuir suas concentrações séricas. De maneira oposta, algumas condições específicas como obesidade, tabagismo, *diabetes mellitus*, sedentarismo e terapia hormonal com estrogênios ou progestágenos estão associadas à elevação discreta dos níveis séricos de PCR (HO e LIPMAN, 2009).

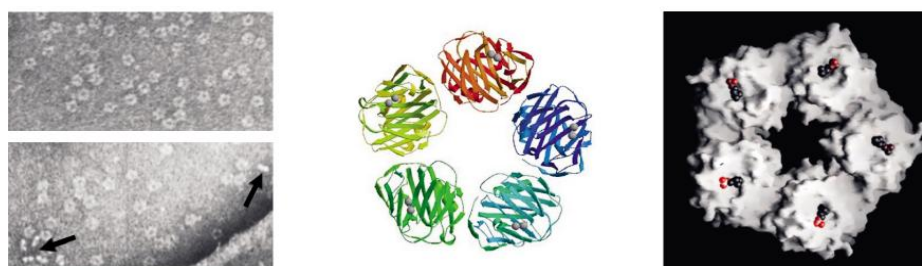


Figura 1. Estrutura molecular e morfologia da PCR humana. Extraído de PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, M. B. J. Clin. Invest., 2003.

A PCR possui propriedades pró e anti-inflamatórias: (1) ativa o sistema complemento após ligar-se a polissacárides bacterianos; (2) dificulta a adesão de granulócitos às células endoteliais e a síntese de superóxidos; (3) estimula a síntese de antagonistas do receptor de interleucina-1 (IL-1) (REINHART *et al.*, 2006).

Diversas condições inflamatórias sabidamente associam-se à elevação dos níveis séricos de PCR, incluindo infecções bacterianas e fúngicas, infecções virais graves com quadros de SARA, doenças inflamatórias sistêmicas como artrite reumatóide, necrose tecidual como infarto do miocárdio e pancreatite, politraumas, cirurgias, neoplasia malignas e possivelmente, uso abusivo de algumas drogas. Há algumas exceções de doenças inflamatórias sistêmicas que se associam a um aumento apenas discreto, ou até mesmo ausente, dos níveis de PCR, como por exemplo, a esclerodermia, a dermatomiosite, o lúpus eritematoso sistêmico, a retocolite ulcerativa, leucemias e doença do hospedeiro *versus* enxerto (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003; REINHART *et al.*, 2006; HO e LIPMAN, 2009).

Apesar da PCR ser considerada como um marcador bioquímico de inflamação não específico, sua avaliação e acompanhamento podem contribuir para: (1) triagem de doenças orgânicas específicas; (2) monitoramento da resposta ao tratamento de condições inflamatórias e infecciosas (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003; COUTO *et al.*, 2007; LISBOA *et al.*, 2008); (3) detecção de infecção intercorrente em indivíduos imunocomprometidos ou portadores de doenças inflamatórias associadas a uma modesta ou ausente resposta de fase aguda (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003). Tem sido postulado que as avaliações consecutivas e dinâmicas dos níveis de PCR interpretadas dentro do contexto clínico têm maior utilidade prática que a análise isolada de seus níveis (HO e LIPMAN, 2009).

Alguns estudos avaliaram a capacidade da PCR em diagnosticar pneumonia comunitária em adultos e crianças. Eles demonstraram superioridade da PCR em relação a outros marcadores, entretanto sua sensibilidade e especificidade não foram suficientes para a PCR ser recomendada como biomarcador definitivo de infecção bacteriana (SMITH e LIPWORTH, 1995; ALMIRALL *et al.*, 2004; FLOOD *et al.*, 2008). Em

pacientes críticos, o uso da PCR combinada aos valores de temperatura teve melhor desempenho que qualquer um dos parâmetros isolados para o diagnóstico de pneumonia associada à ventilação mecânica (POVOA *et al.*, 2005).

Também foi observada a correlação entre os níveis de PCR e o curso clínico da pneumonia comunitária grave, com níveis persistentemente altos sugerindo complicações (COELHO *et al.*, 2007). Outro estudo demonstrou que quando a PCR encontra-se em níveis iniciais > 100 mg/L, ou quando ocorre redução menor do que 50% até o 4º dia de tratamento antimicrobiano, o paciente apresenta maior mortalidade aos 30 dias, maior necessidade de ventilação mecânica e ou de aminas vasoativas, e maior frequência de pneumonia complicada (empiema, abscessos) O valor de predição negativa da PCR < 100 mg/L para esses desfechos foi semelhante ao dos escores CURB65 e PSI (CHALMERS, SINGANAYAGAM e HILL, 2008).

Apesar dos resultados descritos acima, como desvantagem, além da falta de especificidade relativa às diferentes naturezas dos processos inflamatórios, a PCR tem uma meia-vida longa e a sua cinética pode não refletir fidedignamente a dinâmica do processo inflamatório e/ou infeccioso, podendo encontrar-se em níveis normais ou baixos na fase inicial de resposta ao insulto e permanecer significativamente elevada durante a fase inicial de melhora do processo inflamatório (HO e LIPMAN, 2009).

A PCR, quando utilizada em conjunto com outros dados clínico-laboratoriais, pode se tornar uma importante adjuvante no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com pneumonia. Os trabalhos até o momento, entretanto, não permitem estabelecer a PCR como biomarcador isolado confiável na diferenciação entre pneumonias bacterianas e virais. Outro fato a ser considerado é a ausência de trabalhos publicados com dosagem de PCR em pacientes com síndrome respiratória aguda grave de etiologia viral anteriormente à pandemia.

2.2.2. PROCALCITONINA

A PCT é um polipeptídeo precursor da calcitonina (CT), um hormônio envolvido na homeostase do cálcio. A PCT é encontrada no soro de indivíduos saudáveis, sendo inicialmente liberada na forma de um polipeptídeo composto por 116 aminoácidos que, após rápida clivagem por dipeptidases séricas, transforma-se em peptídeo constituído por 114 aminoácidos. Após a tradução do RNA mensageiro da CT, a PCT é clivada enzimaticamente em peptídios menores, originando a forma madura da CT, constituída por 32 aminoácidos (CHRIST-CRAIN e MULLER, 2005; REINHART *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2007; BECKER, SNIDER e NYLEN, 2008).

Em condições fisiológicas, a transcrição do gene CALC-I, codificador da CT, é suprimida nos tecidos extra-tireoidianos, restringindo sua expressão pelas células C da tireóide e pelas células neuroendócrinas dos pulmões (BECKER *et al.*, 2008). Entretanto, em situações de inflamação e/ou infecção, a transcrição do gene CALC-I é estimulada por citocinas inflamatórias, em especial a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e por toxinas bacterianas, ativando a produção de precursores da CT por outros tecidos antes suprimidos (SIMON *et al.*, 2004; BECKER *et al.*, 2008). A partir de uma injúria inflamatória, todos os tecidos do corpo passam a ser capazes de produzir os precursores da CT, mas o fígado, os rins, os pulmões, os músculos e o tecido adiposo se destacam como as principais fontes originárias destes peptídios, liberando na corrente sanguínea as formas ainda imaturas da CT. É por isso que, em situações de sepse, os níveis séricos da PCT elevam-se, não sendo acompanhados por um aumento das concentrações da forma madura deste hormônio no sangue. De maneira oposta, a produção de precursores da CT pode ser inibida por outras citocinas, como o interferon- δ (INF- δ) liberado nas infecções virais (CHRIST-CRAIN e MULLER, 2005).

Contrastando com a meia-vida curta de aproximadamente 10 minutos da CT, a meia-vida da PCT é de cerca de 24 horas e, em indivíduos saudáveis, seus níveis séricos são geralmente inferiores a 0,05 ng/mL (DANDONA *et al.*, 1994; BECKER *et al.*, 2008).

A elevação da concentração sérica de PCT na sepse foi inicialmente descrita em 1993 por Assicot *et al.*, que sugeriram também a sua relação com os níveis de gravidade desta condição (ASSICOT *et al.*, 1993). A partir da injeção de endotoxina derivada de *Escherichia coli* em voluntários saudáveis, os níveis de PCT no soro passam a ser detectados de duas a quatro horas após o insulto, sucedendo o aumento das citocinas inflamatórias, como o TNF- α , e mantendo um *plateau* entre oito e vinte e quatro horas (DANDONA *et al.*, 1994).

Além das infecções bacterianas, outras etiologias já foram descritas como capazes de determinar aumento dos níveis séricos de PCT. Dentre elas, citam-se as cirurgias de grande porte, politraumas, queimaduras, infarto agudo do miocárdio, disfunção hepática, terapias anticélulas T e infecções fúngicas. Entretanto, tais condições parecem determinar apenas um aumento moderado das concentrações de PCT, se comparado às elevações determinadas pela sepse grave e pelo choque séptico (CARRIGAN *et al.*, 2004; REINHART *et al.*, 2006). Além disso, nas infecções bacterianas localizadas, desacompanhadas de resposta inflamatória sistêmica, os níveis séricos de PCT podem aumentar apenas discretamente, exigindo a realização de testes com alta sensibilidade para prever a presença de infecções nestes casos (REINHART *et al.*, 2006).

Na propedêutica das infecções, a acurácia diagnóstica da PCT e os valores de referência estabelecidos dependem diretamente da sensibilidade da técnica utilizada. Os testes realizados a partir de técnicas de luminometria (LUMItest[®]PCT, Brahms) são úteis na detecção dos níveis elevados de PCT nos casos de infecções bacterianas sistêmicas graves, mas têm a desvantagem de serem relativamente insensíveis, com poder máximo de detecção entre 0,3-0,5 ng/mL, ou seja, no mínimo dez vezes superior às concentrações encontradas em indivíduos saudáveis. Os testes colorimétricos (PCT[®]Q, Brahms) têm a vantagem de exibirem os resultados em 30 minutos, mas são apenas semi-quantitativos, não sendo sensíveis o suficiente para a detecção de aumentos discretos da PCT. Os testes disponíveis comercialmente com maior sensibilidade na detecção dos níveis de PCT são o Kryptor[®]PCT da Brahms e o

VIDAS® PCT da BioMerieux, com capacidades de detecção de níveis de 0,05 ng/mL, que representam o limite máximo de PCT encontrado na grande maioria dos indivíduos saudáveis (CHRIST-CRAIN e MULLER, 2005; BECKER *et al.*, 2008).

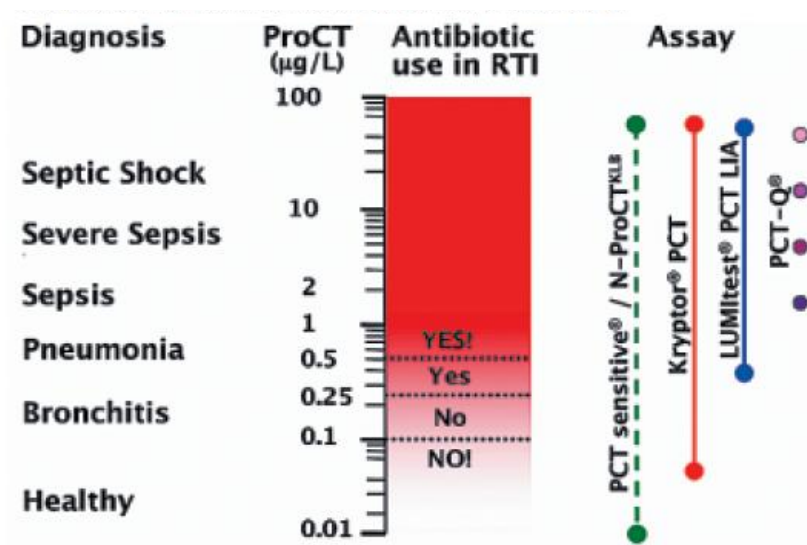


Figura 2. A importância do teste de mensuração da PCT utilizado. Os pontos de corte para a prescrição de antibióticos nas infecções do trato respiratório foram validados em ensaios clínicos. Extraído de CHRIST-CRAIN, M.; MULLER, B. Swiss Medical Weekly, 2005.

Como marcador diagnóstico de infecção, a PCT tem uma série de vantagens sobre outros biomarcadores: (1) sua cinética acompanha de maneira mais precisa o processo infeccioso, com elevação de seus níveis séricos precoce e rapidamente após a instalação do insulto e decréscimo de suas concentrações na fase inicial de controle da infecção pelo sistema imune (SCHUETZ, CHRIST-CRAIN e MULLER, 2009); (2) sua produção, em contraste a outros marcadores incluindo a própria PCR, não é afetada pelo uso de drogas anti-inflamatórias (CHRIST-CRAIN e MULLER, 2005); (3) apresenta maior acurácia no diagnóstico de infecções em pacientes com resposta inflamatória sistêmica (HARBARTH *et al.*, 2001; SIMON *et al.*, 2004; UZZAN *et al.*, 2006); (4) correlaciona-se com o nível de gravidade da sepse e suas implicações prognósticas em pacientes infectados e criticamente enfermos (JENSEN *et al.*, 2006); (5) pode servir como guia terapêutico útil na prescrição de antibióticos para pacientes sépticos (NOBRE *et al.*, 2008; HOCHREITER *et al.*, 2009). Comparando-a com a PCR, a PCT tem a desvantagem de ser menos amplamente difundida nos diferentes serviços de saúde e

estar associada a um custo de realização significativamente mais elevado (HO e LIPMAN, 2009).

Considerando a pneumonia comunitária grave, vários estudos avaliaram a PCT na definição diagnóstica e prognóstica. Em uma análise *post hoc* planejada de 545 pacientes com infecção do trato respiratório, utilizando o teste Kryptor®PCT, a inclusão de valores de PCT e PCR aos sinais e sintomas clínicos (i.e. febre, tosse, produção de escarro, ausculta torácica anormal e dispneia) aumentou a área sob a curva ROC (area under the receiver operating characteristic curve, AUC) de 0,79 para 0,92 no diagnóstico de pneumonia bacteriana. O valor de AUC combinado foi maior do que o obtido para qualquer marcador isolado (MULLER *et al.*, 2007). Três estudos avaliaram a utilidade da PCT para guiar o início da antibioticoterapia em pacientes com infecções do trato respiratório inferior, obtendo resultados positivos. Em todos eles o uso da PCT reduziu a exposição aos antibióticos e os efeitos adversos a eles associados, sem comprometer os desfechos clínicos (CHRIST-CRAIN *et al.*, 2006; BRIEL *et al.*, 2008; SCHUETZ, CHRIST-CRAIN, THOMANN, *et al.*, 2009).

Outro trabalho multicêntrico também realizado com o teste de maior sensibilidade mostrou a utilidade da PCT associada ao Índice de Gravidade de Pneumonia (Pneumonia Severity Index, PSI) e ao CURB-65 para definição prognóstica. Naqueles pacientes em grupos de maior risco de acordo com a avaliação clínica, um nível de PCT menor que 0,1 ng/mL, foi capaz de prever uma menor mortalidade (HUANG *et al.*, 2008). Recentemente outro estudo multicêntrico com pacientes com pneumonia grave em uso de ventilação mecânica demonstrou que PCT está associada à gravidade e é um bom marcador de morbi-mortalidade. Os pacientes incluídos apresentavam pneumonia comunitária ou hospitalar (associadas ou não à ventilação mecânica), e os níveis de PCT se correlacionaram ao grau de disfunção orgânica, independente da origem da pneumonia (BLOOS *et al.*, 2011).

Apesar das inúmeras vantagens da PCT sobre outros biomarcadores, ela ainda não se estabeleceu como ferramenta definitiva e indiscutível no diagnóstico de infecção em pacientes com SIRS. Um número cada vez maior de evidências tem

surgido indicando suas limitações em estabelecer de forma acurada este diagnóstico (CARRIGAN *et al.*, 2004). Em meta-análise publicada em 2007, a acurácia estimada da PCT no diagnóstico de infecção em pacientes criticamente enfermos foi baixa, com as médias dos valores de sensibilidade e especificidade iguais a 71% e AUC igual a 0,78. Os estudos incluídos nesta meta-análise utilizaram pontos de corte bastante distintos, variando de 0,5 a 20 ng/mL (TANG *et al.*, 2007). Importante ressaltar que na meta-análise em questão, a capacidade da PCT em diagnosticar a presença de infecção em pacientes com SIRS não foi comparado a de outros biomarcadores.

Como qualquer teste diagnóstico, o uso de biomarcadores deve ser um adjunto do julgamento clínico, mas não um substituto. Como descrito acima, o melhor desempenho da PCT na infecção do trato respiratório inferior ocorreu quando ela foi utilizada em conjunto com a avaliação dos sintomas e escores de gravidade. Outro ponto importante refere-se ao conhecimento das características do teste a ser utilizado, principalmente no que se refere à sensibilidade e aos pontos de corte dos diferentes marcadores. Há ainda a possibilidade de associação de diversos marcadores para melhor acurácia diagnóstica e prognóstica. Em todo caso a PCT permanece como um biomarcador de utilidade na prática clínica, tendo apenas o seu custo como barreira para a disseminação do seu uso (REINHART *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2008; SCHUETZ, CHRIST-CRAIN e MULLER, 2009; CHRIST-CRAIN e OPAL, 2010).

2.2.3 CITOCINAS

Citocinas são proteínas secretadas por células da imunidade inata e adaptativa que regulam vários processos imunes. Elas são produzidas em resposta a microorganismos e outros antígenos, sendo que diferentes moléculas estimulam respostas diversas de células envolvidas na imunidade e inflamação (ABBAS, 2007).

As propriedades gerais das citocinas são (ABBAS, 2007):

- A secreção de uma citocina é um evento breve e autolimitado;
- As ações das citocinas são geralmente pleotrópicas e redundantes;

- As citocinas influenciam com frequência a síntese a ação de outras citocinas;
- As citocinas podem agir localmente ou de forma sistêmica;
- As citocinas iniciam sua ação através da ligação a receptores de membrana específicos nas células alvo;
- Sinais externos regulam a expressão dos receptores de citocinas e, portanto, a capacidade de resposta das células à ação das citocinas;
- As respostas celulares à maioria das citocinas consistem de alterações na expressão de genes nas células alvo, resultando na ativação de novas funções e, em alguns casos, na proliferação dessas células;
- As respostas celulares às citocinas são estritamente reguladas, e mecanismos de *feedback* negativo existem para inibir essas respostas.

2.2.3.1 FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

O fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) é o principal mediador da resposta inflamatória aguda às bactérias com coloração negativa ao Gram e outros microorganismos infecciosos. Ele é também o principal responsável por muitas das complicações sistêmicas das infecções graves (PFEFFER, 2003). O seu nome deriva de sua identificação original como um fator que causava necrose de tumores (GRANGER *et al.*, 1969).

A maior fonte celular de TNF- α são os macrófagos ativados, apesar de células T ativadas, células NK e mastócitos poderem secretar também essa proteína. O estímulo mais potente para a produção de TNF- α pelos macrófagos é a ligação de lipopolissacáride e outros produtos microbianos aos receptores toll (Toll Like Receptor, TLR). A principal ação fisiológica do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos aos sítios de infecção e ativar essas células para erradicar os microorganismos (ABBAS, 2007). A produção excessiva de TNF- α , entretanto, tem efeitos deletérios e pode alterar o equilíbrio hemodinâmico e metabólico. Na sepse, TNF- α é produzido em altos níveis sendo responsável, juntamente com outras citocinas, pelo colapso circulatório (TRACEY *et al.*, 1986).

Alguns estudos avaliaram o perfil dos níveis de TNF- α durante a sepse e o choque séptico. Concentrações elevadas de TNF- α durante essas complicações infecciosas foram descritas em vários trabalhos, entretanto sempre com uma grande variação dos níveis dessa citocina entre os pacientes estudados (PINSKY *et al.*, 1993; FRIEDLAND *et al.*, 1996). Aparentemente os níveis de citocinas estão mais relacionados à gravidade do paciente e à rapidez da instalação do quadro séptico, mas não ao foco infeccioso ou bactéria causadora da infecção (DAMAS *et al.*, 1997). Os níveis mais altos de TNF- α foram geralmente encontrados na primeira dosagem após a instalação do choque séptico, com queda rápida, e também flutuação nos dias subsequentes (DAMAS *et al.*, 1997; RICHE *et al.*, 2000). Na maioria dos estudos, entretanto, os níveis de TNF- α não se correlacionaram aos escores ou marcadores de gravidade, nem à evolução clínica dos pacientes (PINSKY *et al.*, 1993; FRIEDLAND *et al.*, 1996; DAMAS *et al.*, 1997).

A administração de anticorpos neutralizadores de TNF- α foi inclusive considerada uma terapia promissora no bloqueio da resposta inflamatória exagerada (TRACEY *et al.*, 1987). Porém os estudos com pacientes com sepse não demonstraram os benefícios esperados, e houve inclusive uma tendência a maior mortalidade (PFEFFER, 2003; LIN e YEH, 2005).

2.2.3.2 INTERLEUCINA 1 BETA

A interleucina 1 beta (IL-1 β), assim como o TNF- α , é um mediador da resposta inflamatória à infecções e outros estímulos. A principal fonte de IL-1 β são os macrófagos ativados (ABBAS, 2007). IL-1 β induz a expressão de ciclooxigenase do tipo 2, fosfolipase A do tipo 2 e óxido nítrico sintase induzível, sendo responsável pela produção de prostaglandina-E2, fator ativador de plaquetas e óxido nítrico. Como consequência ocorre febre, redução da tolerância à dor, vasodilatação e hipotensão. Uma ação pró-inflamatória importante da IL-1 β é a capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, promovendo a infiltração de células inflamatórias nos espaço extravascular (DINARELLO, 2009).

Os estudos que avaliaram o comportamento da IL-1 β na sepse e no choque séptico também demonstraram pequena correlação entre os níveis dessa citocina e a evolução clínica dos pacientes (CASEY, BALK e BONE, 1993; PINSKY *et al.*, 1993; FRIEDLAND *et al.*, 1996). Em um trabalho com pacientes com SARA, contudo, a persistência de níveis elevados de citocinas associou-se a um desfecho desfavorável. Níveis elevados de IL-1 β e IL-6 foram indicadores independentes de óbito nesses pacientes (MEDURI *et al.*, 1995).

2.2.3.3 INTERFERON GAMA

O interferon gamma (IFN- γ) é a principal citocina ativadora de macrófagos, com funções essenciais na imunidade inata e adquirida. Apesar de ter alguma ação antiviral, o IFN- γ não é uma citocina antiviral potente, e sua principal função é a ativação de células efectoras do sistema imune (ABBAS, 2007).

Alguns trabalhos experimentais demonstraram a presença de um papel importante do IFN- γ no desenvolvimento da injúria pulmonar em camundongos (YIN *et al.*, 1999; YAMADA *et al.*, 2004). Um estudo que avaliou o comportamento do IFN- γ em pacientes com choque, entretanto, não conseguiu demonstrar elevação de seus níveis em nenhum dos subgrupos (i.e. séptico, não séptico, presença de disfunção de múltiplos órgãos). Também não houve correlação do IFN- γ com a mortalidade (PINSKY *et al.*, 1993).

2.2.3.4 INTERLEUCINA 10

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória. Durante a infecção ela inibe a atividade de células Th1, células natural killer e macrófagos, que apesar de serem responsáveis pelo clareamento de bactérias, também contribuem para lesão tecidual. Como consequência, IL-10 impede uma defesa eficaz contra microorganismos, mas reduz o dano secundário ao processo inflamatório. Várias células são capazes de produzir IL-10, sendo que sua principal fonte varia em cada tecido e durante as fases agudas ou crônicas de uma infecção (COUPER, BLOUNT e RILEY, 2008).

Desde 1994, vários estudos dosaram a IL-10 em pacientes sépticos, demonstrando uma grande variação nos níveis dessa citocina (MARCHANT *et al.*, 1994; OBERHOLZER, OBERHOLZER e MOLDAWER, 2002). Foram detectados níveis mais altos naqueles pacientes que desenvolviam choque séptico, comparando-se com os que apresentavam somente sepse (MARCHANT *et al.*, 1994). Também se observou correlação entre os níveis séricos de IL-10 e de TNF- α , além do escore *Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation* (APACHE). Considerando-se esses resultados, IL-10 parece estar correlacionada tanto quanto à gravidade da resposta inflamatória quanto aos níveis de citocinas pró-inflamatórias (OBERHOLZER *et al.*, 2002). Em outro trabalho com pacientes críticos com SARA foram dosadas citocinas pró e anti-inflamatórias no lavado bronchoalveolar, demonstrando uma resposta anti-inflamatória predominante logo após o início da síndrome. Os mediadores anti-inflamatórios, incluindo IL-10, tiveram suas concentrações máximas detectadas entre o primeiro e terceiro dia da SARA, retornando a valores normais no 14º dia (PARK *et al.*, 2001).

Dois estudos experimentais avaliaram o papel da IL-10 nas infecções por influenza. O primeiro comprovou a indução da produção de níveis elevados de IL-10 de forma rápida e transitória pelo trato respiratório de camundongos após a infecção pelo vírus Influenza (SUN *et al.*, 2009). O segundo demonstrou que IL-10 foi deletéria para a regulação da resposta imune ao vírus influenza. Camundongos knockout para IL-10 foram mais resistentes à infecção viral, apresentando um maior clareamento do vírus, menor morbidade e menor mortalidade (SUN, TORRES e METZGER, 2010).

2.3 BIOMARCADORES NA INFECÇÃO PELO VÍRUS 2009 INFLUENZA A H1N1

Durante a pandemia pelo 2009 H1N1 alguns trabalhos avaliaram o comportamento de biomarcadores em pacientes com apresentação clínica mais grave, necessitando de internação hospitalar. A PCT e a PCR foram os marcadores mais estudados, mas algumas citocinas também foram pesquisadas.

Os primeiros relatos publicados, com poucos pacientes, apresentaram resultados contraditórios. Cunha *et al* detectou elevação de PCT em pacientes com infecção pelo 2009 H1N1 e sem evidência de infecção bacteriana concomitante. Questiona-se, entretanto, o diagnóstico de coinfeção bacteriana, o qual se baseou apenas na presença de infiltrados focais à radiografia de tórax (CUNHA, SYED e STROLLO, 2010). Outro trabalho observacional, retrospectivo, demonstrou uma maior acurácia da PCR em relação à PCT para a detecção de infecção ou coinfeção bacteriana nos pacientes com infecção suspeita pelo 2009 H1N1. A AUC foi de 0,88 para a PCT (intervalo de confiança [IC] 95% 0,73 – 1,01) e 0,97 (IC 95% 0,92 – 1,03) para a PCR (INGRAM *et al.*, 2010). Já Guervilly *et al.* não encontraram diferenças entre os níveis de PCR dos pacientes com infecção isolada pelo 2009 H1N1 e daqueles que tinham infecção mista. De todos os biomarcadores avaliados, apenas a PCT nas primeiras 24 horas após a admissão estava significativamente elevada nos pacientes com coinfeção bacteriana. Entretanto, os pacientes com infecção isolada pelo 2009 H1N1 que necessitaram de cuidados intensivos também apresentaram níveis elevados de PCT (mediana 2,6 ng/ml, intervalo interquartil 0,9-11,2 ng/ml). Concluiu-se que enquanto níveis de PCT abaixo de 0,5 ng/ml sugeriam fortemente infecção viral isolada, níveis mais elevados não necessariamente eram diagnósticos de pneumonia bacteriana (GUERVILLY *et al.*, 2010).

Dois estudos avaliaram o comportamento desses biomarcadores em pacientes críticos com suspeita de infecção pelo 2009 H1N1 (PIACENTINI *et al.*, 2010; CUQUEMELLE *et al.*, 2011). O primeiro trabalho, observacional e prospectivo, dosou PCT e PCR à admissão e 24, 48 e 120 horas após, no soro de 22 pacientes admitidos no CTI com o diagnóstico inicial de pneumonia adquirida na comunidade. A infecção pelo 2009 H1N1 foi confirmada em 10 pacientes. Não houve diferença entre os pacientes H1N1-positivos e H1N1-negativos considerando-se os níveis de PCR em qualquer momento da dosagem. Em ambos os grupos os níveis de PCT estavam mais elevados à admissão, com redução progressiva posterior. Os níveis de PCT nos pacientes H1N1-positivos eram inferiores aos dos pacientes com infecção bacteriana confirmada em todas as dosagens (PIACENTINI *et al.*, 2010). Cuquemelle *et al.*, por sua vez, conduziram um estudo multicêntrico retrospectivo em 23 CTIs na França, com o

objetivo de avaliar a acurácia da PCT no diagnóstico da coinfeção bacteriana naqueles pacientes com infecção pelo 2009 H1N1 confirmada. Nesse trabalho, com um valor de corte de 0,8 ng/ml, a PCT foi capaz de discriminar satisfatoriamente a infecção bacteriana isolada da infecção mista, com uma AUC de 0,9 (IC 95% 0,78-1) (CUQUEMELLE *et al.*, 2011). O estudo, entretanto, por ser retrospectivo, analisou os resultados de pacientes com diagnóstico confirmado de H1N1, o que não representa a realidade na prática clínica.

A resposta imune à infecção viral foi estudada por alguns grupos através da determinação de citocinas séricas pró e anti-inflamatórias (BERMEJO-MARTIN *et al.*, 2009; HAGAU *et al.*, 2010; TO, HUNG, *et al.*, 2010; TAKANO *et al.*, 2011). Os resultados variaram de acordo com a população e a gravidade dos pacientes. Um dos trabalhos procurou caracterizar de forma ampla a resposta inflamatória ao 2009 H1N1 com a dosagem de 29 citocinas e quimiocinas. Nesse estudo, pacientes que desenvolveram as formas mais graves da infecção apresentaram hipercitocinemia de perfil Th1 e Th17 comparados aos pacientes com formas leves e controles saudáveis. Tanto TNF- α e IFN- γ , mediadores da resposta Th1, quanto IL-10, encontravam-se elevados nos pacientes hospitalizados em relação aos pacientes ambulatoriais e os controles (BERMEJO-MARTIN *et al.*, 2009). Níveis mais altos de citocinas nos pacientes infectados pelo 2009 H1N1 que faleceram devido à SARA foram demonstrados em outro trabalho. Após estratificação por tempo após o início dos sintomas, IL-10 correlacionou-se com a gravidade da infecção (TO, HUNG, *et al.*, 2010). TNF- α também foi um marcador de gravidade em pacientes críticos no estudo por Hagau *et al.* (HAGAU *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Na vigência de uma pandemia, existe dificuldade em se diferenciar, à admissão do paciente, se o quadro de insuficiência respiratória aguda é causado pelo vírus influenza ou por outros agentes infecciosos, ou ainda se se trata de um processo não infeccioso. Por fim, podem ocorrer infecções mistas, bacterianas e virais, as quais podem ser concomitantes ou subsequentes. A pesquisa viral nas secreções respiratórias pela técnica de RT-PCR não se mostra útil para a decisão terapêutica inicial, já que os resultados demandam entre 48h e 72h para serem liberados. Sabe-se que os dados clínicos e a contagem de leucócitos não são suficientemente confiáveis para diferenciar infecção bacteriana e viral, ou para identificar outros tipos de acometimento pulmonar. Nesse contexto, seria de grande utilidade a identificação de um biomarcador com boa acurácia diagnóstica, de rápida obtenção e grande disponibilidade, com capacidade de discriminar infecções respiratórias graves causadas pelo 2009 H1N1 de outros agentes infecciosos. A possibilidade de se prever a evolução desses pacientes críticos através dos biomarcadores também seria de grande valia para o manejo desses doentes. Portanto, justifica-se a avaliação da PCT e PCR nessas situações. Para melhor entendimento da resposta inflamatória, também foi realizada a dosagem de algumas citocinas pró (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10).

4 OBJETIVOS

4.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilidade da PCT e da PCR na identificação etiológica e na caracterização da gravidade em pacientes internados no CTI com SRAG e suspeita de infecção pelo vírus 2009 H1N1.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a utilidade da PCR e da PCT na identificação de pacientes infectados pelo 2009 influenza H1N1, diferenciando-os dos demais pacientes com SRAG incluídos no estudo.
- Determinar o comportamento de quatro citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-1 β) nos pacientes com SRAG incluídos no estudo.
- Correlacionar os níveis séricos de PCT, PCR e de quatro outras citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-1 β) com a morbidade e a mortalidade dos pacientes com SRAG.
- Comparar os níveis séricos quatro outras citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-1 β) de pacientes com SRAG nos quais a etiologia por influenza A H1N1 tenha sido descartada com pacientes cuja infecção por esse vírus tenha sido confirmada.

5 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

The behavior and diagnostic utility of procalcitonin and five other inflammatory molecules in critically-ill patients with respiratory distress and suspected 2009 influenza A H1N1 infection

Mariana Benevides Santos Paiva, Fernando Antônio Botoni, Antônio Lúcio Teixeira Jr, Aline Silva de Miranda, Clara Rodrigues Alves de Oliveira, Jamila de Oliveira Abrahão, Guilherme Marques Faria, Vandack Nobre

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Departamento de Clínica Médica, School of Medicine and Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Abstract

Introduction: During the 2009 influenza A H1N1 pandemic it became difficult to differentiate viral infection from other conditions in patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU). **Objectives:** We sought to evaluate the behavior and diagnostic utility of procalcitonin, C-reactive protein and four other molecules in patients with suspected 2009 influenza A H1N1 infection. **Methods:** Serum levels of procalcitonin, C-reactive protein, Tumor Necrosis Factor α , Interferon γ , Interleukin 1β and Interleukin 10 were tested on admission and on days 3, 5 and 7 in 35 patients admitted to two ICUs with suspected 2009 H1N1 infection. **Results:** Twelve patients had confirmed 2009 influenza A H1N1 infection; 6 had seasonal influenza infection, and 17 had negative swabs. Procalcitonin levels at inclusion and on day 3, and C-reactive protein levels on day 3 were higher among subjects with 2009 influenza A H1N1 infection. Baseline levels of Interleukin 1β were higher among 2009 influenza A H1N1 patients compared to the other groups. C-reactive protein on day 3, 5 and 7 and procalcitonin on days 5 and 7 were greater in non-surviving patients. **Conclusion:** Higher levels of procalcitonin, C-reactive protein and Interleukin- 1β might occur in critically ill patients with 2009 H1N1 infection. Neither procalcitonin nor CRP were

useful discriminating severe 2009 H1N1 pneumonia. Higher levels of CRP and procalcitonin seem to identify those with a worse outcome.

Key words: Severe respiratory distress syndrome, C - reactive protein, biomarker, sensitivity, specificity.

Introduction

The 2009 influenza A H1N1 (2009 H1N1) pandemic brought a significant burden on health care services around the world (WEBB *et al.*, 2009; FUNK *et al.*, 2010). This virus was first identified in Mexico and United States (March-April 2009) and quickly spread worldwide (PEREZ-PADILLA *et al.*, 2009; TRIFONOV, KHIABANIAN e RABADAN, 2009). In Brazil, like in some other southern hemisphere countries, the outbreak started in June, lasted approximately 18 weeks, and was responsible for at least 1600 deaths (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b; WEBB *et al.*, 2009).

The 2009 H1N1 infection causes a broad spectrum of clinical syndromes, ranging from afebrile upper respiratory illness to fulminating viral pneumonia and Acute Respiratory Distress Syndrome (DOMINGUEZ-CHERIT *et al.*, 2009; JAIN *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009; WEBB *et al.*, 2009). The Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) performed in respiratory secretions has a sensitivity of 98 to 100% and a specificity of 100% to identify the 2009 H1N1 infection (BOGGILD e MCGEER, 2010), however, with a turn-around time of 2-3 days, its results do not contribute to the initial therapeutic decisions. The use of biomarkers in patients with suspected or confirmed bacterial infection has been largely investigated in the critical care setting. Procalcitonin (PCT) has proved to be accurate in discriminating bacterial from viral infections (GENDREL e BOHUON, 2000; DUBOS *et al.*, 2006). Yet, only a few studies have evaluated the behavior of PCT in patients with severe 2009 H1N1 pneumonia (CUNHA *et al.*, 2010; GUERVILLY *et al.*, 2010; INGRAM *et al.*, 2010; CUQUEMELLE *et al.*, 2011). It has been suggested that the immune response against the 2009 H1N1 might diverge from that observed against the seasonal influenza virus (ITOH *et al.*, 2009). Interestingly, elevated levels of PCT have been observed in patients with viral 2009 H1N1 infection, even when they had no concomitant bacterial infection (CUNHA *et al.*, 2010; GUERVILLY *et al.*, 2010).

In this study we sought to evaluate the behavior and the diagnostic utility of circulating serum levels of PCT in patients with suspected 2009 H1N1 infection and severe acute respiratory illness. In order to further evaluate the immune response in

those individuals, we tested the behavior of C-reactive protein (CRP), Tumor necrosis factor α (TNF- α), Interferon γ (IFN- γ), Interleukin 1 β (IL-1 β) and Interleukin 10 (IL-10) in those patients.

Material and methods

Study setting and subjects

This was a prospective observational study conducted in two mixed, medical and surgical Intensive Care Units (ICUs), placed in two University Hospitals in southeastern Brazil. From August to November 2009 all patients with age ≥ 14 years old admitted to one of the two participant ICUs with suspected 2009 H1N1 infection were evaluated for potential eligibility. The inclusion criteria were: (1) severe acute respiratory illness defined as dyspnea plus bilateral infiltrates on the x-ray; (2) suspicion of 2009 H1N1 infection and lack of any other obvious etiology to explain the respiratory symptoms; and (3) a stay of at least 24h in the ICU. Patients who fulfilled the inclusion criteria were included in the study on the first day of ICU admission. The study was approved by the Universidade Federal de Minas Gerais' Ethic Committee, and a written informed consent was obtained from all patients or the next of kin. To conduct this study and write this report we have observed the Standard for Reporting of Diagnostic accuracy studies checklist and recommendations (BOSSUYT *et al.*, 2003).

Study procedures

A dedicated fellow (MBSP) visited daily the participant ICUs to follow the included subjects and to seek new eligible patients. Variables recorded at inclusion and daily included demographic, clinical and laboratorial data. Radiographic diagnostics and microbiological examinations (i.e., cultures of urine, blood, blind bronchoalveolar lavage and tracheal aspirates) were carried out at the discretion of treating physicians. Severity and organ dysfunction at admission were defined with the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) (KNAUS *et al.*, 1981) and the Sepsis Related Organ Failure Assessment (SOFA) scores (VINCENT *et al.*, 1998). All-cause

hospital mortality, ICU length of stay and hospital length of stay were also recorded. No diagnostic or therapeutic intervention was performed as part of the study protocol.

Identification of the 2009 H1N1

All included patients were submitted to collection of nasopharyngeal swabs or aspirates at admission in the ICUs. These samples were tested for 2009 H1N1 in a public reference laboratory according to the Centers for Disease Control (CDC) RT-PCR Protocol for the Detection and Characterization of Swine Influenza (version 2009) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2009a).

PCR and PCT measurement

Peripheral blood samples were collected in the morning, using vacuum tubes (BD Vacutainer SST II Plus plastic tubes; Becton Dickinson Diagnostic Systems, São Paulo, Brazil). After centrifugation, the serum was stored at -80°C until analysed. Circulating plasma PCT and CRP levels were measured at inclusion (baseline) and on days 3, 5 and 7 following inclusion, up to patients' death or ICU discharge. PCT was tested using an enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELISA) (PCT Vidas Brahms, bioMérieux, France), with an assay sensitivity of 0.05 µg/L, approximately fourfold above mean normal levels. Circulating CRP levels were measured with dry chemistry using Ektachem 950ICR System (Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY, USA). The detection limit for CRP was 7 mg/l. Values above 10 mg/dL were considered abnormal.

Cytokines Measurements

Plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-10 and IL-1 β were measured using ELISA sandwich (Duoset R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), with pairs of marked antibodies. These cytokines were tested at inclusion, and on days 3, 5 and 7, according to the ICU length of stay.

Statistical analysis

Categorical variables are expressed as number and percentage. Continuous variables are stated as mean \pm SD for variables normally distributed and as median and interquartile range (IQR) for non-normally distributed variables. Comparability among the groups was analyzed by the χ^2 tests (Yates' test or Fisher's exact test), two-sample t test, Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test, as appropriate. ROC curves were built in order to establish the accuracy of tested inflammatory molecules in the identification of patients infected by 2009 H1N1 as needed. The positive and the negative predictive values were calculated once the best cut-offs for these molecules were defined. The Spearman test was used to establish correlation between parameters. Collected data was analysed with the SPSS software (SPSS 17.0; SPSS Inc., Chicago, United States). In order to compare the three studied groups regarding the behaviour of CRP and PCT values along the time, i.e. for the four measurements (baseline, day 3, day 5 and day 7), we fitted a linear mixed-effect model using R software (*lme4* and *nlme* packs). Therefore, CRP and PCT levels were transformed to normally distributed variables with square root and natural logarithm calculation, respectively. Significance was reported at a *p* value of 0.05 or less.

Results

Characteristics of the study population

Forty nine patients were assessed for eligibility. Five patients did not meet the inclusion criteria: two patients had an alternate diagnosis and three stayed less than 24 hours in the ICU. From the 44 remaining patients, nine were excluded from the final analysis: in eight patients we were unable to obtain the results for 2009 H1N1 RT-PCR from the reference laboratory, probably due to samples astray, and in one patient the results of circulating levels of PCT on admission were unavailable.

Demographic (i.e., age and gender) and main clinical baseline characteristics (i.e., comorbidities, SOFA score and APACHE score) were similar between included and excluded patients (data not shown). The RT-PCR was performed in a median of 6

(range: 0-16) days after onset of symptoms. Twelve (34.3%) patients had confirmed 2009 H1N1 infection; 6 (17.1%) patients had seasonal influenza infection and 17 (48.6%) patients had negative swabs for influenza virus. The most frequent diagnoses among individuals with negative RT-PCR were undefined pulmonary disease with bilateral infiltrates (5 patients), microbiologically confirmed community-acquired pneumonia (3 patients), severe asthma and pulmonary embolism (2 patients each). The patients' clinical characteristics are displayed on table 1. The SOFA score measured at inclusion was higher among 2009 H1N1 infected individuals compared to the other groups, as was the vasopressors use and the occurrence of acute renal failure (MEHTA *et al.*, 2007).

Table 1- Patients' main characteristics

	influenza A H1N1 (n=12)	Seasonal influenza (n=6)	Negative RT- PCR (n=17)	p ^a
Age (mean±SD)	37.5 (21.6)	39.2 (11.8)	39.7 (22.0)	0.81
Sex (male, %)	6 (50)	1 (17)	7 (41)	0.39
Underlying medical condition (n, %)	8 (67)	3 (50)	10 (59)	0.78
Asthma	0 (0)	1 (17)	3 (18)	
Chronic obstructive pulmonary disease	2 (17)	0 (0)	1 (6)	
Diabetes	1 (8)	0 (0)	2 (12)	
Chronic cardiovascular disease	2 (17)	1 (17)	2 (12)	
Chronic renal disease	1 (8)	0 (0)	0 (0)	
Immunosuppression	1 (8)	1 (17)	1 (6)	
Pregnancy	2 (17)	0 (0)	3 (18)	
Obesity	1 (8)	1 (17)	0 (0)	
Apache 2 (median, IQR)	14.5 (11.0)	11.0 (5.0)	10.0 (8.0)	0.24
SOFA at admission (median, IQR)	6.0 (6.0)	3.0 (2.0)	2.0 (2.0)	0.006
PaO ₂ /FiO ₂ at admission (median, IQR)	160 (127)	200 (119)	172 (136)	0.31
Positive cultures at admission (n, %) ^b	3 (25)	0 (0)	3 (18)	0.32
Blind-BAL or tracheal aspirate	2 (17)	0 (0)	2 (12)	
Blood	2 (17)	0 (0)	1 (6)	
Vasopressors (n, %)	11 (91.7)	3 (50)	8 (47.1)	0.04
Hydrocortisone (n, %)	7 (58.3)	2 (33.3)	9 (52.9)	0.60
Endotracheal intubation (n,%)	11 (91.7)	3 (50)	12 (70.6)	0.14

Mechanical ventilation (median days, IQR)	10 (11)	12 (29)	4 (23)	0.91
Acute kidney injury (n, %) ^c	8 (66.7)	2 (33.3)	3 (17.6)	0.03
Hemodialysis (n, %)	6 (50)	2 (33.3)	3 (17.6)	0.18
ICU LOS (median days, IQR)	12 (14)	17.5 (25)	7 (21)	0.65
Hospital LOS (median days, IQR)	16.5 (21)	28.5 (55)	18 (21)	0.85
Mortality (n, %)	5 (41.7)	0 (0)	6 (35.3)	0.18

LOS- length of stay; IQR- interquartile range; SOFA – sequential organ failure assessment

^a For comparison among the three groups, significant if < 0.05.

^b One patient with H1N1 infection had both the respiratory secretion and the blood cultures positive for *Staphylococcus aureus*.

^c According to the AKIN criteria (MEHTA *et al.*, 2007)

Thirty two (91.4%) patients had blood cultures obtained at admission, and 16 (61.5% of those who underwent tracheal intubation) had respiratory samples tested for bacterial agents. Positive blood culture results were observed in two patients of the 2009 H1N1 group and in one patient with negative RT-PCR. Concerning the respiratory samples, two patients in the 2009 H1N1 group (both with *S. aureus*) and two patients in the negative RT-PCR group (1 with *S. aureus* and 1 with *K. pneumoniae*) had positive results.

Plasma levels of PCT and CRP

Circulating levels of PCT at inclusion and on day 3 were significantly higher among subjects with confirmed H1N1 infection (median 7.22 µg/L, IQR: 95.92), compared to those of the seasonal influenza group (0.28µg/L, IQR: 1.39) and patients without influenza (0.85µg/L, IQR: 3.29); p=0.005 and p=0.015, respectively. Similar results were observed when circulating levels of CRP tested on day 3 were compared among the three groups: median of 179 mg/dl (IQR: 274) in 2009 H1N1 group, 110 mg/dl (IQR: 119) in seasonal influenza group, and 123 mg/dl (IQR: 106) in patients without influenza infection (p=0.024). A smaller, even though still significant, difference was observed for both markers when a subgroup analysis excluding the three patients with bacteremia at inclusion was performed.

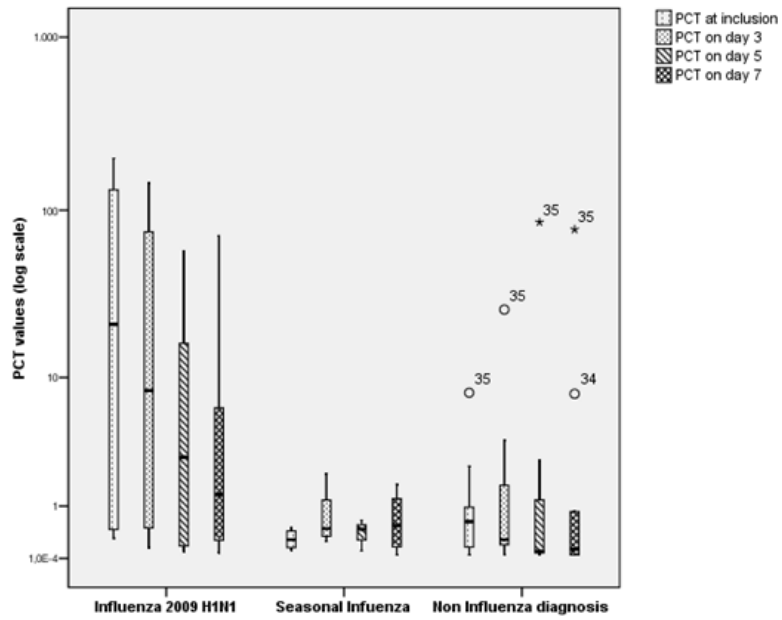


Figure 1. Circulating levels of procalcitonin observed in the studied patients at the four points of measurement, according to the respective group.

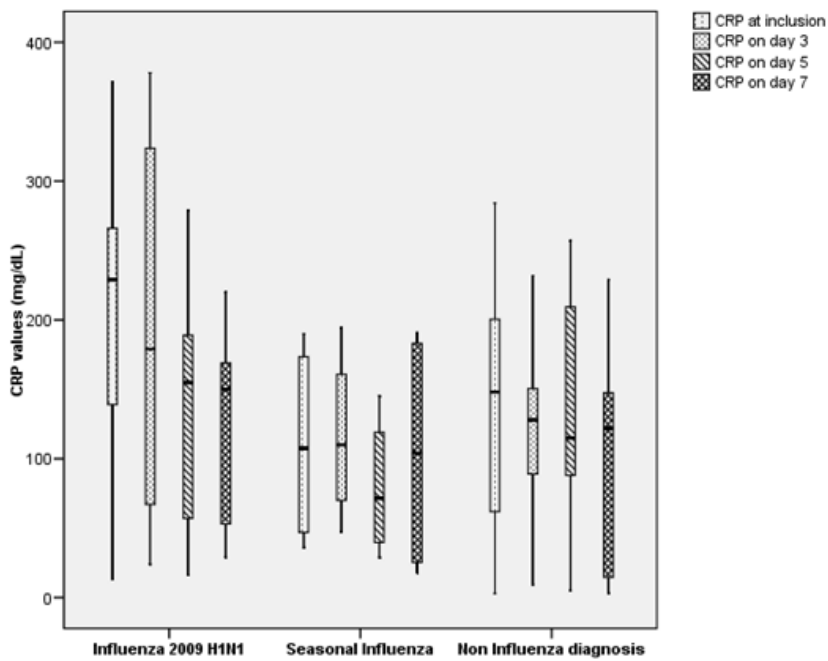


Figure 2. Circulating levels of C-reactive protein observed in the studied patients at the four points of measurement, according to the respective group.

Regarding the behavior of CRP and PCT during the first seven days of follow-up in all studied patients, both markers had a reduction trend along the time ($p=0.003$ for PCT and $p=0.079$ for CRP). The trends were compared among the groups for each marker in an independent manner. For both markers, patients of the 2009 H1N1 group were the main responsible for this trend. Taking into account this whole period of time, the values of CRP and PCT were significantly lower in the seasonal influenza ($p=0.029$ for CRP and $p=0.009$ for PCT, respectively) and non-influenza groups ($p=0.041$ for CRP and $p=0.010$ for PCT, respectively), as compared with H1N1 patients.

Plasma levels of cytokines

Except for the baseline levels of IL-1 β , which revealed to be significantly higher among patients of 2009 H1N1 group ($p=0.014$; figure 3) compared to the other two groups, no other difference was observed concerning the circulating levels of tested cytokines. The AUC for IL-1 β values indicating H1N1 infection was 0.79 (CI, 0.62 to 0.96) and at a cutoff point set at 30 pg/ml, the sensibility was 91% and specificity 65%. The levels of IL-1 β remained significantly higher among patients infected with 2009 H1N1 influenza when the subgroup with bacteremia was excluded from the analysis ($p=0.04$).

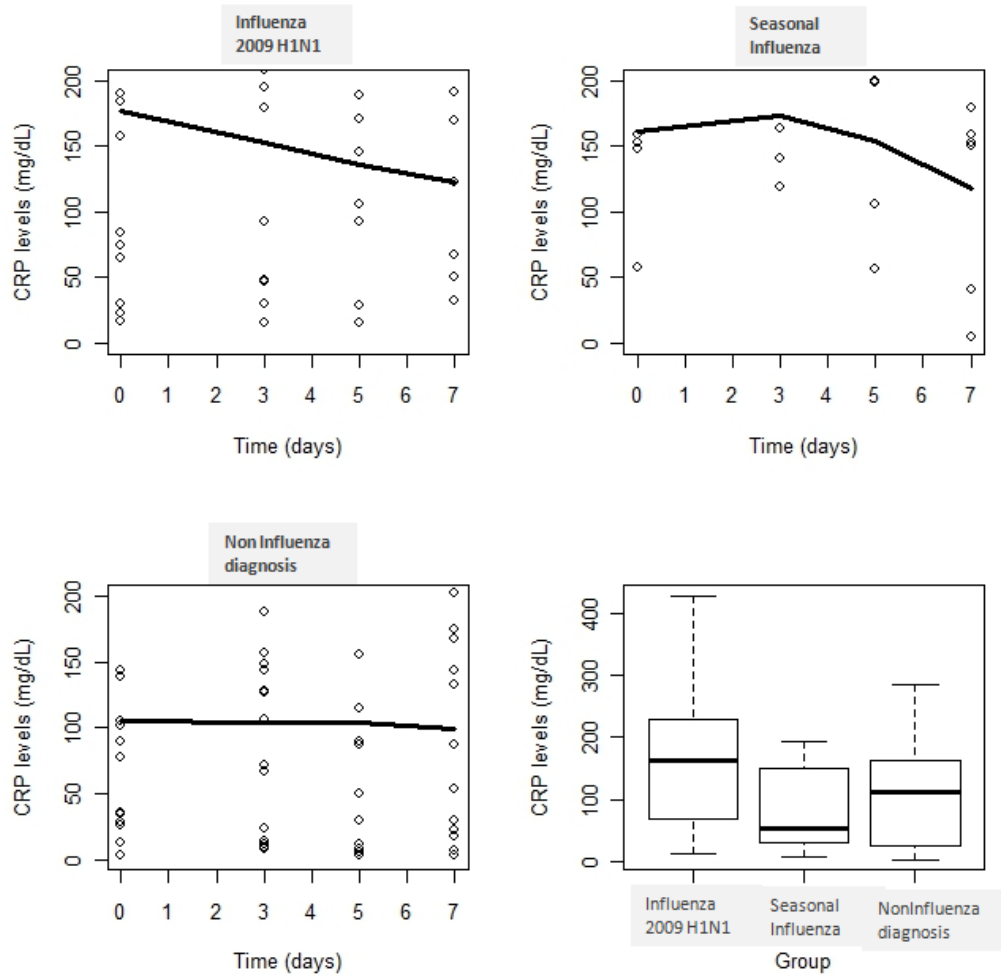


Figure 3. Behavior of circulating levels of CRP during the first seven days of follow up in the three studied groups.

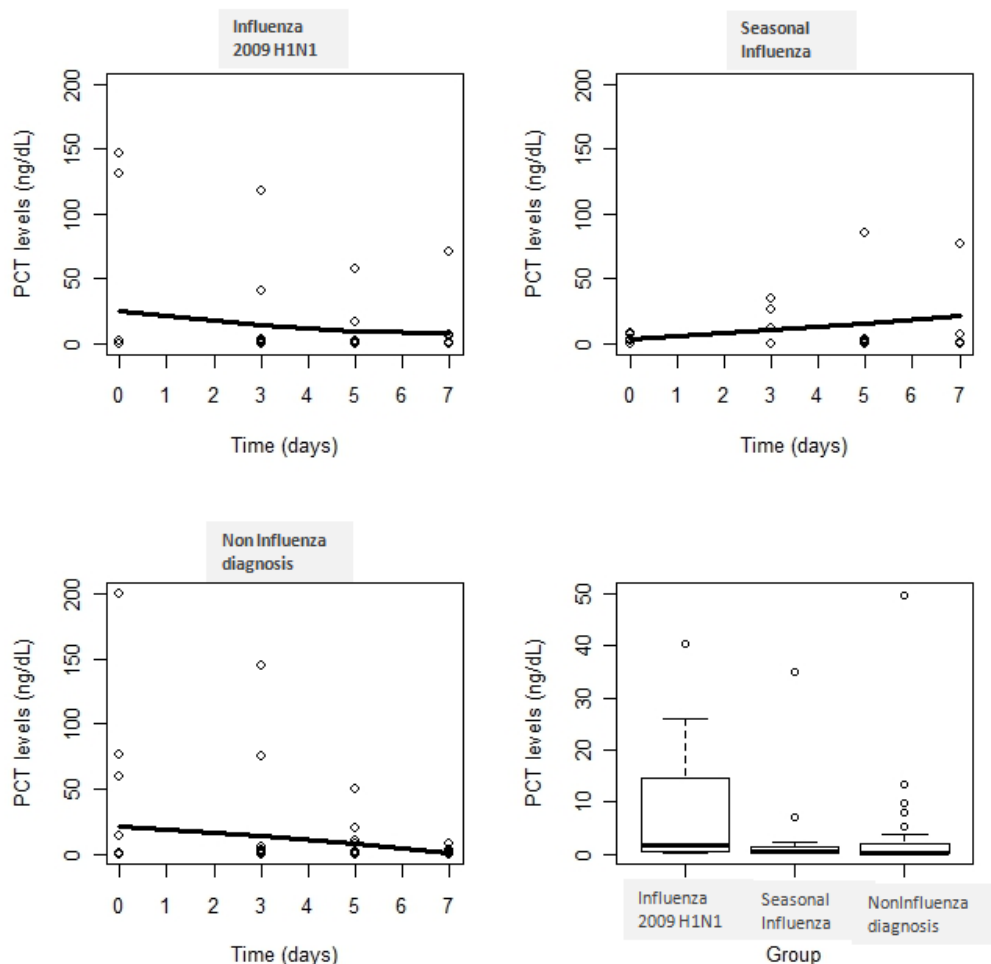


Figure 4. Behavior of circulating levels of PCT during the first seven days of follow up in the three studied groups.

Inflammatory molecules and outcome

We further evaluated the time course of the tested molecules in relation to the in-hospital mortality. Eleven (31.4%) out of the 35 included patients deceased during hospitalization. In the analysis associating CRP and PCT levels with outcome, CRP levels on day 3, 5 and 7 ($p= 0.047$, 0.012 and 0.008) and PCT levels on days 5 and 7 ($p= 0.019$ and 0.001), were significantly higher in non-surviving patients. No studied cytokines was associated to all-cause hospital mortality.

Discussion

In this observational study on critically ill patients with suspected 2009 H1N1 infection, we found higher circulating levels of PCT and CRP among 2009 H1N1 infected individuals compared to patients with seasonal influenza and non-influenza related respiratory distress. IL-1 β levels were also higher among 2009 H1N1 subjects, compared to the two other studied groups on admission. Increased levels of PCT and CRP along the course of the disease were associated with a higher mortality.

Many studies have tested the role of PCT as a tool to differentiate infectious and non-infectious systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (BRUNKHORST, EBERHARD e BRUNKHORST, 1999; UGARTE *et al.*, 1999; MULLER *et al.*, 2000; HARBARTH *et al.*, 2001), as well as to distinguish between bacterial and viral infections (GENDREL e BOHUON, 2000; DUBOS *et al.*, 2006). Most of them found a superiority of PCT over CRP and other markers to discriminate these conditions. Moreover, PCT behavior along the first days of antibiotic therapy seems to be an accurate marker for clinical response and outcome (JENSEN *et al.*, 2006). The higher levels of PCT presented by the patients with 2009 H1N1 infection in the present study calls into question the notion that the levels of this marker would remain normal or only slightly elevated among patients with viral conditions. As suggested by the SOFA scores, the most probable reason to explain our results is the significantly higher severity of the 2009 H1N1 subjects. Increased PCT concentrations have already been shown to be associated with higher values of severity scores (*i.e.*, SOFA score) in critical care patients with sepsis (MEISNER *et al.*, 1999). Both PCT and CRP levels were useless in discriminating 2009 H1N1 infection from other causes of respiratory distress in our study.

Even though this possibility was uniformly present among the 35 studied subjects, we cannot rule out unidentified bacterial co-infection among the 2009 H1N1 patients as a hypothetical reason to explain their elevated CRP and PCT serum levels. Guervilly *et al.* found that patients infected with this virus might present high PCT levels despite the absence of bacterial co-infection (GUERVILLY *et al.*, 2010). Similar

results were found by Cunha *et al.* in subjects with definite/probable 2009 H1N1 diagnosis (CUNHA *et al.*, 2010).

Conversely, several authors have found lower levels of circulating PCT among patients with isolated 2009 H1N1 infection as compared with those with bacterial or mixed (bacterial and viral) infection (INGRAM *et al.*, 2010; PIACENTINI *et al.*, 2010)(12, 28). In a multicentric retrospective study conducted in 23 French ICUs, Cuquemelle *et al.* investigated the initial circulating levels of PCT presented by 52 patients admitted with confirmed 2009 H1N1 infection. They found that PCT levels of 0.8 µg/L combined with alveolar pulmonary infiltrates are strongly suggestive of bacterial co-infection (OR12.9; 95% CI 3.2–51.5) (CUQUEMELLE *et al.*, 2011).

Regarding the tested cytokines, only baseline levels of IL-1β showed to be higher among 2009 H1N1 infected subjects. IL-1β levels have also maintained its association with H1N1 infection in the analysis excluding the patients with bacteremia. At a cutoff of 30 pg/ml, IL-1 β had a good accuracy in identifying patients infected by this virus. This molecule has been found to be elevated in patients with severe 2009 H1N1 infection (TAKANO *et al.*, 2011). It has been shown that a pro-inflammatory response predominates in patients with severe 2009 H1N1 infection (BERMEJO-MARTIN *et al.*, 2009). This inflammatory state might at least partially explain the high levels of CRP and PCT observed.

In our study, PCT levels tested on day 5 and 7 were significantly higher among non-survivors compared to survivors. It has been shown that PCT trends and not baseline values are associated to the outcome in intensive care patients (HARBARTH *et al.*, 2001; CHARLES *et al.*, 2009). Thus, the decrease of PCT levels might have identified individuals with a better outcome. In other words, patients with persistently high PCT levels had higher mortality. Elevated CRP levels have also been associated with poor outcomes in intensive care patients (HO *et al.*, 2008), as well as in patients with severe community-acquired pneumonia (CHALMERS *et al.*, 2008). Therefore, we found that circulating CRP levels, tested on days 3, 5 and 7, were also increased in non-survivors compared to survivors.

This study has several limitations. First, our sample size was small and it was conducted in only two university hospitals. Second, we were not able to obtain lower respiratory samples from some of the patients that underwent invasive mechanical ventilation, which could have been responsible for a small number of negative RT-PCR results. The nasopharyngeal samples, however, were obtained in the acute phase of disease and before institution of antiviral therapy in most cases. Additionally, the sensitivity of RT-PCR for influenza in nasopharyngeal swabs is described as between 97.8 and 100%, and the specificity as 100% (BOGGILD e MCGEER, 2010). Third, we were unable to obtain culture results from respiratory samples in 38.5% of the subjects that underwent tracheal intubation. At last, we did not investigate *Streptococcus pneumoniae* or *Legionella pneumophila* urinary antigens.

In conclusion, in this prospective observational study we found higher levels of PCT, CRP and IL-1 β among critically ill 2009 H1N1 infected patients compared to subjects with seasonal influenza infection and non-influenza diagnoses. Neither PCT nor CRP was useful in the discrimination of severe 2009 H1N1 infection from other causes of respiratory failure. Elevated levels of PCT and CRP might have been due to the greater patients' severity, with a concomitant substantial inflammatory response, even though bacterial co-infection could not be definitely ruled out. IL-1 β had a higher discriminative value for 2009 H1N1 infection and it was not correlated with positive blood or respiratory cultures. Overall, PCT on days 5 and 7 and CRP on days 3, 5 and 7 following admission were associated with all-cause hospital mortality.

Acknowledgements

The authors thank the medical and nursing staff of the Intensive care units and Laboratorial Service at the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais for their participation in the study.

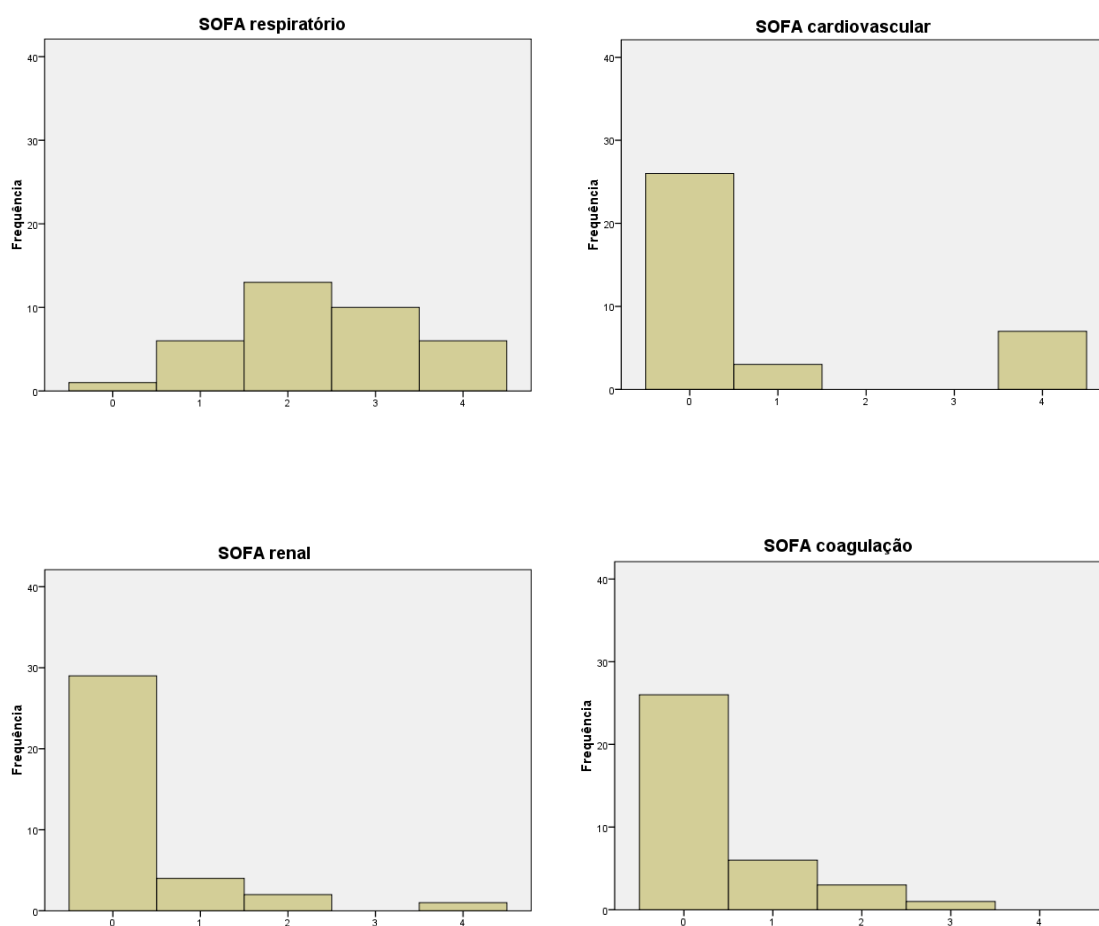
Funding

This study was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Três grandes pandemias por influenza ocorreram no século 20: a pandemia de 1918 a 1919, a pandemia de 1957 a 1958, e a pandemia de 1968. Nenhuma delas, entretanto, apresentou dispersão tão rápida quanto à observada na pandemia pelo 2009 H1N1, promovida pela crescente globalização. A maior disponibilidade de atenção à saúde e tratamentos avançados proporcionou não só um melhor atendimento e caracterização da pandemia, mas elevou os custos médicos diretos associados a ela. À época de seu início, em abril de 2009, foi necessária uma organização rápida dos serviços de saúde para conseguir suprir uma demanda ainda indeterminada. O Brasil, tanto quanto outros países, enfrentou a escassez de leitos hospitalares e de terapia intensiva para atender o crescente número de pacientes com SRAG. Nesse contexto, em Belo Horizonte, foram disponibilizados 10 leitos no CTI do Hospital Risoleta Tolentino Neves e foi aberto o CTI clínico/ Unidade Coronariana (UCO) no Hospital das Clínicas da UFMG, com inicialmente 6 leitos, para atendimento dos pacientes com insuficiência respiratória e suspeita de infecção pelo 2009 H1N1. Naquele momento, a falta de preparo para o enfrentamento da pandemia, tanto de forma assistencial, quanto institucional, trouxe algumas dificuldades no atendimento. Isso se refletiu no extravio de amostras de *swab* orofaríngeo enviadas à Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e na admissão tardia de pacientes. Apesar da dedicação dos profissionais, o início da pandemia foi marcado por dúvidas no manejo dos doentes críticos. A falta de definição diagnóstica trouxe a esses leitos outras afecções respiratórias, além de SRAG. E, nos pacientes admitidos nos CTIs, a terapia empírica anti-viral e anti-bacteriana foi regra, uma vez que os resultados de RT-PCR para o 2009 H1N1 só eram disponibilizados após um mês da coleta, em média. Como tentativa de redução do uso inapropriado de antibióticos e antivirais, além de melhor caracterizar a resposta inflamatória, nós optamos por avaliar os níveis de PCT, PCR e quatro citocinas nos pacientes com SRAG e infecção suspeita pelo 2009 H1N1.

De forma interessante, observou-se durante o estudo que vários dos pacientes com SRAG apresentavam injúria pulmonar grave à admissão, mas ainda sem insuficiência de outros órgãos. Alguns deles inclusive faleceram devido à hipóxia refratária às medidas terapêuticas disponíveis. Infelizmente em nenhum dos hospitais que o estudo foi realizado havia a disponibilidade de ECMO. Esse fenômeno pode ser confirmado com uma análise mais profunda dos valores de SOFA. Nota-se uma grande diferença entre os valores de SOFA para o sistema respiratório em relação aos outros sistemas, com valores 3 e 4 registrados frequentemente (Gráfico 6). Portanto, ao se considerar os somente valores totais de SOFA e APACHE II, não se tem uma noção da real gravidade dos pacientes.



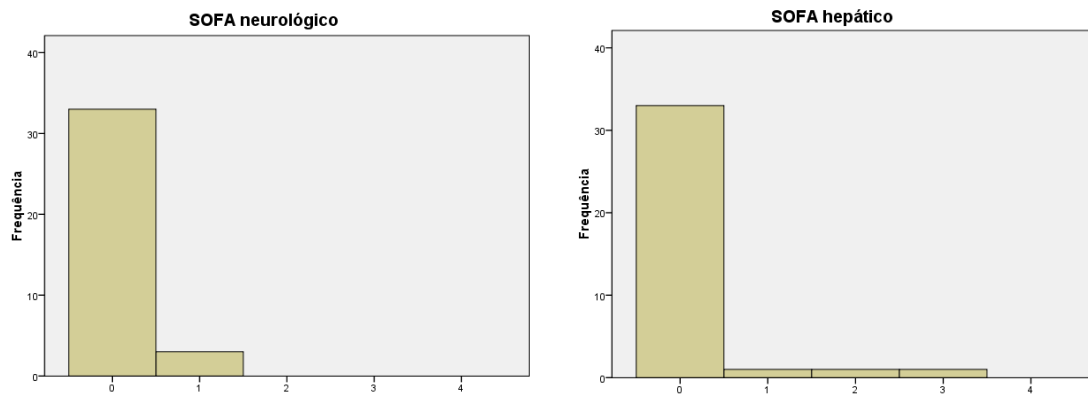


Gráfico 6. Valores de SOFA à admissão por sistema orgânico (n=35).

A admissão tardia de pacientes com quadro respiratório grave, e que já estavam em uso de antimicrobianos há mais de 48hs, motivou médicos assistentes a não coletar amostras de secreção do trato respiratório inferior de alguns desses doentes num primeiro momento. Desse modo, foram obtidas amostras de 61,5% dos pacientes submetidos à intubação orotraqueal. É possível que os resultados do trabalho, com valores mais altos dos marcadores naqueles pacientes com infecção pelo 2009 H1N1, sejam devido à falha de detecção de infecção bacteriana secundária. Mesmo considerando as limitações, entretanto, o estudo pelo seu caráter prospectivo, espelhou a realidade vivida pelos profissionais de saúde no atendimento aos doentes com SRAG durante a pandemia. Nesse contexto nem a PCT ou a PCR foram úteis no diagnóstico da infecção pelo vírus 2009 H1N1. Apesar de IL-1 β ter sido um marcador de infecção pelo vírus pandêmico, com boa sensibilidade e especificidade razoável, sua aplicabilidade é reduzida, e outros trabalhos são necessários para confirmar esses achados. Os níveis de PCT e PCR à admissão não se correlacionaram à mortalidade, contudo a persistência de valores elevados desses marcadores nos dias subsequentes esteve associada a um desfecho clínico desfavorável. A evolução dos níveis de PCT e de PCR foi capaz de identificar aqueles pacientes que mantiveram resposta inflamatória vigorosa, apesar das medidas terapêuticas instituídas. Não se pode afirmar se os níveis elevados desses biomarcadores foram causados por um processo inflamatório mais exacerbado secundário ao próprio vírus influenza, ou se devido à infecção bacteriana superposta. Mas de qualquer forma os resultados desse estudo não autorizam a utilização desses marcadores para definir a suspensão de antivirais ou antibióticos.

7 CONCLUSÕES

- Nesse estudo foram encontrados níveis mais altos de PCT, PCR e IL-1 β entre pacientes críticos infectados pelo 2009 H1N1, comparados com pacientes infectados pelo influenza sazonal e pacientes com RT-PCR negativo.
- Nem PCT ou PCR foram úteis para o diagnóstico de infecção pelo 2009 H1N1.
- IL-1 β foi capaz de discriminar a infecção pelo 2009 H1N1 com acurácia razoável.
- PCT no 5º e 7º dia e PCR no 3º, 5º e 7º dias após a admissão foram associados à mortalidade intra-hospitalar.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. Cytokines. In: (Ed.). **Cellular and Molecular Immunology**. 6 ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2007. cap. 12, p.267-301. ISBN 978-1-4160-3122-2.

ALMIRALL, J. *et al.* Contribution of C-reactive protein to the diagnosis and assessment of severity of community-acquired pneumonia. *Chest*, v. 125, n. 4, p. 1335-42, Apr 2004.

ASSICOT, M. *et al.* High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*, v. 341, n. 8844, p. 515-8, Feb 27 1993.

Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 58, n. 38, p. 1071-4, Oct 2 2009.

BAKER, M. G. *et al.* Pandemic influenza A(H1N1)v in New Zealand: the experience from April to August 2009. *Euro Surveill*, v. 14, n. 34, 2009.

BAUTISTA, E. *et al.* Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med*, v. 362, n. 18, p. 1708-19, May 6 2010.

BECKER, K. L.; SNIDER, R.; NYLEN, E. S. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med*, v. 36, n. 3, p. 941-52, Mar 2008.

BERMEJO-MARTIN, J. F. *et al.* Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care*, v. 13, n. 6, p. R201, 2009.

BLOOS, F. *et al.* Multinational, observational study of procalcitonin in ICU patients with pneumonia requiring mechanical ventilation: a multicenter observational study. *Crit Care*, v. 15, n. 2, p. R88, 2011.

BLYTH, C. C.; IREDELL, J. R.; DWYER, D. E. Rapid-test sensitivity for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*, v. 361, n. 25, p. 2493, Dec 17 2009.

BOGGILD, A. K.; MCGEER, A. J. Laboratory diagnosis of 2009 H1N1 influenza A virus. *Crit Care Med*, v. 38, n. 4 Suppl, p. e38-42, Apr 2010.

BOSSUYT, P. M. *et al.* Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD Initiative. *Ann Intern Med*, v. 138, n. 1, p. 40-4, Jan 7 2003.

BRIEL, M. *et al.* Procalcitonin-guided antibiotic use vs a standard approach for acute respiratory tract infections in primary care. *Arch Intern Med*, v. 168, n. 18, p. 2000-7; discussion 2007-8, Oct 13 2008.

BRUNKHORST, F. M.; EBERHARD, O. K.; BRUNKHORST, R. Discrimination of infectious and noninfectious causes of early acute respiratory distress syndrome by procalcitonin. *Crit Care Med*, v. 27, n. 10, p. 2172-6, Oct 1999.

CARRIGAN, S. D.; SCOTT, G.; TABRIZIAN, M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clin Chem*, v. 50, n. 8, p. 1301-14, Aug 2004.

CASEY, L. C.; BALK, R. A.; BONE, R. C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*, v. 119, n. 8, p. 771-8, Oct 15 1993.

CAUCHEMEZ, S. *et al.* Household transmission of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in the United States. *N Engl J Med*, v. 361, n. 27, p. 2619-27, Dec 31 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1). 6 de outubro de 2009 2009a. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf>. Acesso em: 18 de março de 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Interim Recommendations for Clinical Use of Influenza Diagnostic Tests During the 2009-10 Influenza Season 29 de setembro de 2009 2009b. Disponível em: < http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidance/diagnostic_tests.htm >. Acesso em: 3 de janeiro de 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Updated CDC Estimates of 2009 H1N1 Influenza Cases, Hospitalizations and Deaths in the United States, April 2009 – April 10, 2010. 2010a. Disponível em: < http://www.cdc.gov/h1n1flu/estimates_2009_h1n1.htm >. Acesso em: 2 de janeiro de 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Updated Interim Recommendations for the Use of Antiviral Medications in the Treatment and Prevention of Influenza for the 2009-2010 Season. 2010b. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/h1n1flu/recommendations.htm> >. Acesso em: 5 de janeiro de 2012.

CHALMERS, J. D.; SINGANAYAGAM, A.; HILL, A. T. C-reactive protein is an independent predictor of severity in community-acquired pneumonia. *Am J Med*, v. 121, n. 3, p. 219-25, Mar 2008.

CHARLES, P. E. *et al.* Procalcitonin kinetics within the first days of sepsis: relationship with the appropriateness of antibiotic therapy and the outcome. *Crit Care*, v. 13, n. 2, p. R38, 2009.

CHRIST-CRAIN, M.; MULLER, B. Procalcitonin in bacterial infections--hype, hope, more or less? *Swiss Med Wkly*, v. 135, n. 31-32, p. 451-60, Aug 6 2005.

CHRIST-CRAIN, M.; OPAL, S. M. Clinical review: the role of biomarkers in the diagnosis and management of community-acquired pneumonia. *Crit Care*, v. 14, n. 1, p. 203, 2010.

CHRIST-CRAIN, M. *et al.* Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 174, n. 1, p. 84-93, Jul 1 2006.

COELHO, L. *et al.* Usefulness of C-reactive protein in monitoring the severe community-acquired pneumonia clinical course. *Crit Care*, v. 11, n. 4, p. R92, 2007.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, v. 180, n. 9, p. 5771-7, May 1 2008.

COUTO, R. C. *et al.* C-reactive protein-guided approach may shorten length of antimicrobial treatment of culture-proven late-onset sepsis: an intervention study. *Braz J Infect Dis*, v. 11, n. 2, p. 240-5, Apr 2007.

CUNHA, B. A.; SYED, U.; STROLLO, S. Swine influenza (H1N1) pneumonia: elevated serum procalcitonin levels not due to superimposed bacterial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*, v. 35, n. 5, p. 515-6, May 2010.

CUQUEMELLE, E. *et al.* Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study. *Intensive Care Med*, v. 37, n. 5, p. 796-800, May 2011.

DAMAS, P. *et al.* Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med*, v. 25, n. 3, p. 405-12, Mar 1997.

DANDONA, P. *et al.* Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 79, n. 6, p. 1605-8, Dec 1994.

DAVIES, A. *et al.* Extracorporeal Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA*, v. 302, n. 17, p. 1888-95, Nov 4 2009.

DAWOOD, F. S. *et al.* Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*, v. 360, n. 25, p. 2605-15, Jun 18 2009.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, v. 27, p. 519-50, 2009.

DOMINGUEZ-CHERIT, G. *et al.* Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA*, v. 302, n. 17, p. 1880-7, Nov 4 2009.

DONALDSON, L. J. *et al.* Mortality from pandemic A/H1N1 2009 influenza in England: public health surveillance study. *BMJ*, v. 339, p. b5213, 2009.

DUBOS, F. *et al.* Serum procalcitonin and other biologic markers to distinguish between bacterial and aseptic meningitis. *J Pediatr*, v. 149, n. 1, p. 72-6, Jul 2006.

Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 58, n. 30, p. 826-9, Aug 7 2009.

FLEURY, H. *et al.* Prolonged shedding of influenza A(H1N1)v virus: two case reports from France 2009. *Euro Surveill*, v. 14, n. 49, 2009.

FLOOD, R. G.; BADIK, J.; ARONOFF, S. C. The utility of serum C-reactive protein in differentiating bacterial from nonbacterial pneumonia in children: a meta-analysis of 1230 children. *Pediatr Infect Dis J*, v. 27, n. 2, p. 95-9, Feb 2008.

FRIEDLAND, J. S. *et al.* Plasma proinflammatory cytokine concentrations, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) III scores and survival in patients in an intensive care unit. *Crit Care Med*, v. 24, n. 11, p. 1775-81, Nov 1996.

FUNK, D. J. *et al.* Practical lessons from the first outbreaks: clinical presentation, obstacles, and management strategies for severe pandemic (pH1N1) 2009 influenza pneumonitis. *Crit Care Med*, v. 38, n. 4 Suppl, p. e30-7, Apr 2010.

GENDREL, D.; BOHUON, C. Procalcitonin in pediatrics for differentiation of bacterial and viral infections. *Intensive Care Med*, v. 26 Suppl 2, p. S178-81, Mar 2000.

GRANGER, G. A. *et al.* Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature*, v. 221, n. 5186, p. 1155-7, Mar 22 1969.

GUERVILLY, C. *et al.* Significance of high levels of procalcitonin in patients with influenza A (H1N1) pneumonia. *J Infect*, v. 61, n. 4, p. 355-8, Oct 2010.

HAGAU, N. *et al.* Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Crit Care*, v. 14, n. 6, p. R203, 2010.

HARBARTH, S. *et al.* Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 164, n. 3, p. 396-402, Aug 1 2001.

HO, K. M. *et al.* C-reactive protein concentration as a predictor of in-hospital mortality after ICU discharge: a prospective cohort study. *Intensive Care Med*, v. 34, n. 3, p. 481-7, Mar 2008.

HO, K. M.; LIPMAN, J. An update on C-reactive protein for intensivists. *Anaesth Intensive Care*, v. 37, n. 2, p. 234-41, Mar 2009.

HOCHREITER, M. *et al.* Procalcitonin to guide duration of antibiotic therapy in intensive care patients: a randomized prospective controlled trial. *Crit Care*, v. 13, n. 3, p. R83, 2009.

HUANG, D. T. *et al.* Risk prediction with procalcitonin and clinical rules in community-acquired pneumonia. *Ann Emerg Med*, v. 52, n. 1, p. 48-58 e2, Jul 2008.

INGRAM, P. R. *et al.* Procalcitonin and C-reactive protein in severe 2009 H1N1 influenza infection. *Intensive Care Med*, v. 36, n. 3, p. 528-32, Mar 2010.

ITOH, Y. *et al.* In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*, v. 460, n. 7258, p. 1021-5, Aug 20 2009.

JAIN, S. *et al.* Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med*, v. 361, n. 20, p. 1935-44, Nov 12 2009.

JENSEN, J. U. *et al.* Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. *Crit Care Med*, v. 34, n. 10, p. 2596-602, Oct 2006.

KELLUM, J. A. *et al.* Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med*, v. 167, n. 15, p. 1655-63, Aug 13-27 2007.

KNAUS, W. A. *et al.* APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med*, v. 9, n. 8, p. 591-7, Aug 1981.

KUMAR, A. *et al.* Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA*, v. 302, n. 17, p. 1872-9, Nov 4 2009.

LAGACE-WIENS, P. R.; RUBINSTEIN, E.; GUMEL, A. Influenza epidemiology--past, present, and future. *Crit Care Med*, v. 38, n. 4 Suppl, p. e1-9, Apr 2010.

LESSLER, J. *et al.* Outbreak of 2009 pandemic influenza A (H1N1) at a New York City school. *N Engl J Med*, v. 361, n. 27, p. 2628-36, Dec 31 2009.

LIN, W. J.; YEH, W. C. Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. *Shock*, v. 24, n. 3, p. 206-9, Sep 2005.

LISBOA, T. *et al.* C-reactive protein correlates with bacterial load and appropriate antibiotic therapy in suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*, v. 36, n. 1, p. 166-71, Jan 2008.

LOUIE, J. K. *et al.* Severe 2009 H1N1 influenza in pregnant and postpartum women in California. *N Engl J Med*, v. 362, n. 1, p. 27-35, Jan 7 2010.

LOUIE, J. K. *et al.* Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California. *JAMA*, v. 302, n. 17, p. 1896-902, Nov 4 2009.

MARCHANT, A. *et al.* Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet*, v. 343, n. 8899, p. 707-8, Mar 19 1994.

MAUAD, T. *et al.* Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 181, n. 1, p. 72-9, Jan 1 2010.

MEDURI, G. U. *et al.* Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest*, v. 107, n. 4, p. 1062-73, Apr 1995.

MEHTA, R. L. *et al.* Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*, v. 11, n. 2, p. R31, 2007.

MEISNER, M. *et al.* Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. *Crit Care*, v. 3, n. 1, p. 45-50, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância Epidemiológica da Influenza, versão III. Brasília, 5 de agosto de 2009 2009a. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/protocolo_de_manejo_clinico_05_08_2009.pdf >. Acesso em: 3 de janeiro de 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da Influenza Pandêmica (H1N1) 2009 no Mundo e no Brasil, até a Semana Epidemiológica 47 de 2009. 2009b. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza_se_47.pdf >. Acesso em: 2 de janeiro de 2012.

MULLER, B. *et al.* Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med*, v. 28, n. 4, p. 977-83, Apr 2000.

MULLER, B. *et al.* Diagnostic and prognostic accuracy of clinical and laboratory parameters in community-acquired pneumonia. *BMC Infect Dis*, v. 7, p. 10, 2007.

NOBRE, V. *et al.* Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 177, n. 5, p. 498-505, Mar 1 2008.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med*, v. 30, n. 1 Supp, p. S58-S63, Jan 2002.

Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 58, n. 17, p. 467-70, May 8 2009.

Pandemic (H1N1) Influenza 2009. 2010. Disponível em: < <http://www.flupandemic.gov.au/internet/panflu/publishing.nsf/Content/H1N1%2009-1#surveillance> >. Acesso em: 2 de janeiro de 2012.

PARK, W. Y. *et al.* Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 164, n. 10 Pt 1, p. 1896-903, Nov 15 2001.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*, v. 111, n. 12, p. 1805-12, Jun 2003.

PEREZ-PADILLA, R. *et al.* Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med*, v. 361, n. 7, p. 680-9, Aug 13 2009.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 14, n. 3-4, p. 185-91, Jun-Aug 2003.

PIACENTINI, E. *et al.* Procalcitonin levels are lower in intensive care unit patients with H1N1 influenza A virus pneumonia than in those with community-acquired bacterial pneumonia. A pilot study. *J Crit Care*, Aug 31 2010.

PINSKY, M. R. *et al.* Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*, v. 103, n. 2, p. 565-75, Feb 1993.

POVOA, P. *et al.* C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect*, v. 11, n. 2, p. 101-8, Feb 2005.

PRESANIS, A. M. *et al.* The severity of pandemic H1N1 influenza in the United States, from April to July 2009: a Bayesian analysis. *PLoS Med*, v. 6, n. 12, p. e1000207, Dec 2009.

REINHART, K.; MEISNER, M.; BRUNKHORST, F. M. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? *Crit Care Clin*, v. 22, n. 3, p. 503-19, ix-x, Jul 2006.

RICHE, F. C. *et al.* Inflammatory cytokine response in patients with septic shock secondary to generalized peritonitis. *Crit Care Med*, v. 28, n. 2, p. 433-7, Feb 2000.

ROTHBERG, M. B.; HAESSLER, S. D. Complications of seasonal and pandemic influenza. *Crit Care Med*, v. 38, n. 4 Suppl, p. e91-7, Apr 2010.

SCHUETZ, P.; CHRIST-CRAIN, M.; MULLER, B. Procalcitonin and other biomarkers to improve assessment and antibiotic stewardship in infections--hope for hype? *Swiss Med Wkly*, v. 139, n. 23-24, p. 318-26, Jun 13 2009.

SCHUETZ, P. *et al.* Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections: the ProHOSP randomized controlled trial. *JAMA*, v. 302, n. 10, p. 1059-66, Sep 9 2009.

SHIEH, W. J. *et al.* 2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States. *Am J Pathol*, v. 177, n. 1, p. 166-75, Jul 2010.

SIMON, L. *et al.* Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*, v. 39, n. 2, p. 206-17, Jul 15 2004.

SMITH, R. P.; LIPWORTH, B. J. C-reactive protein in simple community-acquired pneumonia. *Chest*, v. 107, n. 4, p. 1028-31, Apr 1995.

SUN, J. *et al.* Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med*, v. 15, n. 3, p. 277-84, Mar 2009.

SUN, K.; TORRES, L.; METZGER, D. W. A detrimental effect of interleukin-10 on protective pulmonary humoral immunity during primary influenza A virus infection. *J Virol*, v. 84, n. 10, p. 5007-14, May 2010.

TAKANO, T. *et al.* Cytokine and chemokine response in children with the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 30, n. 1, p. 117-20, Jan 2011.

TANG, B. M. *et al.* Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, v. 7, n. 3, p. 210-7, Mar 2007.

TILLET, W. S.; FRANCIS, T. JR. Serologic Reactions in pneumonia with a nonprotein fraction from Pnumococcus. *J. Exp. Med.*, v. 52, p. 561-571, 1930.

TO, K. K. *et al.* Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *J Med Virol*, v. 82, n. 1, p. 1-7, Jan 2010.

TO, K. K. *et al.* Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin Infect Dis*, v. 50, n. 6, p. 850-9, Mar 15 2010.

TRACEY, K. J. *et al.* Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, v. 234, n. 4775, p. 470-4, Oct 24 1986.

TRACEY, K. J. *et al.* Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*, v. 330, n. 6149, p. 662-4, Dec 17-23 1987.

TRIFONOV, V.; KHIABANIAN, H.; RABADAN, R. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. *N Engl J Med*, v. 361, n. 2, p. 115-9, Jul 9 2009.

UGARTE, H. *et al.* Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med*, v. 27, n. 3, p. 498-504, Mar 1999.

Update: novel influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-May, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 58, n. 21, p. 585-9, Jun 5 2009.

Update: swine influenza A (H1N1) infections--California and Texas, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 58, n. 16, p. 435-7, May 1 2009.

UZZAN, B. *et al.* Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*, v. 34, n. 7, p. 1996-2003, Jul 2006.

Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med*, v. 342, n. 18, p. 1301-8, May 4 2000.

VINCENT, J. L. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med*, v. 25, n. 2, p. 372-4, Feb 1997.

VINCENT, J. L. *et al.* Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*, v. 26, n. 11, p. 1793-800, Nov 1998.

WEBB, S. A. *et al.* Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand. *N Engl J Med*, v. 361, n. 20, p. 1925-34, Nov 12 2009.

WIEDEMANN, H. P. *et al.* Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med*, v. 354, n. 24, p. 2564-75, Jun 15 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Clinical management of human infection with pandemic (H1N1) 2009: revised guidance. 2009. Disponível em: < http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical_management/en/index.html >. Acesso em: 05 de janeiro de 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pandemic (H1N1) 2009. 2010a. Disponível em: < <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/> >. Acesso em: 2 de janeiro de 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guidelines for pharmacological management of pandemic (H1N1) 2009 influenza and other influenza viruses. 2010b. Disponível em: < http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/index.html >. Acesso em: 5 de janeiro de 2012.

YAMADA, M. *et al.* Interferon-gamma: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 287, n. 5, p. L1042-7, Nov 2004.

YIN, K. *et al.* Role of interferon-gamma in lung inflammation following cecal ligation and puncture in rats. *Shock*, v. 12, n. 3, p. 215-21, Sep 1999.

9 APÊNDICES

Apêndice A- Formulário individual para o registro das características clínicas e laboratoriais

Projeto marcadores inflamatórios e síndrome gripal aguda	DATA :	Nº:
---	---------------	------------

Contatos: Dr. Mariana Paiva (9166-4685) Dr. Vandack Nobre (9831-0004)

Nome completo: _____	Data internação Enf. : _____	Idade: _____
_____	Data internação CTI: _____	Hospital: _____
Sexo : Masc 0 <input type="radio"/> Fem 1 <input type="radio"/>	1-Encaminhamento do:	
DdN : ___ / ___ / _____	1-Ambulatório <input type="radio"/> 2-Central de leitos <input type="radio"/>	
Leito : _____ Idade: _____	3-PA <input type="radio"/> 9- IGN <input type="radio"/>	
Nº Prontuário : _____	2-Coletado swab para H1N1	
	1-Sim <input type="radio"/> 2- Não <input type="radio"/> Data: _____	
	3-Idade ≥ 18 anos	
	1-Sim <input type="radio"/> 2-Não <input type="radio"/>	

4-VACINAÇÃO:

1-GRIPE (ANO CORRENTE) 2-PNEUMOCOCO (ULTIMOS 5 ANOS) 3-NÃO

5-Situações de risco

Idade > 65 anos 1
 Gestante 2 (___) semanas
 Imunossupressão 3 (_____)
 Comorbidade 4 (Preencher abaixo)
 Obesidade 5 (IMC = _____)
 Ausente 6
 IGN 9

6-Epidemiologia (contato com pessoas portadoras de síndrome gripal nos últimos 7 dias)

6A-Contatos domiciliares: 1-Sim 2-Não
 1-Cônjuge 2-Irmão(ã) 3-Filho(a) 9-Outros (especificar) _____
 6B-Contato fora do domicílio: 1-Sim 2-Não
 Se afirmativo: Local: 1-Escola 2-Trabalho 9- Outros _____

7-Epidemiologia (viagem ao exterior)

Viagem recente ao exterior 1-Sim 2-Não Em caso afirmativo:
 Procedência: _____
 Período da viagem: ___ / ___ / ___ a ___ / ___ / ___

8- APACHE II admissão:

9-COMORBIDADES: (marcar todas as presentes, incluindo o motivo da admissão)		
<input type="checkbox"/> 0- AUSENTE	<input type="checkbox"/> 7-HIV / AIDS	<input type="checkbox"/> 12-DOENÇA CÉREBO-VASCULAR
<input type="checkbox"/> 1-CARDIOPATIA	DIABETE	<input type="checkbox"/> 13-USO DE
<input type="checkbox"/> 2-IRC (CL CR <60)	<input type="checkbox"/> 9-INSULINO-DEPENDENTE	IMUNOSSUPRESSOR
<input type="checkbox"/> 3-NEOPLASIA ATIVA	<input type="checkbox"/> 10-NÃO INSULINO-DEPENDENTE	ESPECIFICAR: DROGA : _____
<input type="checkbox"/> 4-DPOC	<input type="checkbox"/> 11-DOENÇA VASCULAR ART. PERIFÉRICA	DOSE/DIA: _____
<input type="checkbox"/> 5-ASMA		
<input type="checkbox"/> 6-INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA		

10-Data início sintomas ___/___/___		Data início febre ___/___/___	
<input type="checkbox"/> 0- AUSENTE	<input type="checkbox"/> 5-TOSSE	<input type="checkbox"/> 11-VOMITOS	
<input type="checkbox"/> 1-FEBRE	<input type="checkbox"/> 6-DISPNEIA	<input type="checkbox"/> 12-OUTROS (especificar)	
<input type="checkbox"/> 2-CALAFRIOS	<input type="checkbox"/> 7-DOR DE GARGANTA		
<input type="checkbox"/> 3-DIARRÉIA	<input type="checkbox"/> 8-MIALGIA		
<input type="checkbox"/> 4-ARTRALGIA	<input type="checkbox"/> 9-CONJUNTIVITE		
	<input type="checkbox"/> 10-CORIZA		
TEMP MAX ATE ADMISSAO <input type="checkbox"/> 1-CONHECIDA: _____, _____ oC			
<input type="checkbox"/> 2-NÃO REGISTRADA			

11-Sinais potenciais de gravidade:		
<input type="checkbox"/> 0- AUSENTE	<input type="checkbox"/> 5-CREPITAÇÕES	<input type="checkbox"/> 9-FC > 120
<input type="checkbox"/> 1-HEMOPTÓICOS	<input type="checkbox"/> 6-SATO2 < 95% (AR AMBIENTE)	<input type="checkbox"/> 10-SONOLÊNCIA
<input type="checkbox"/> 2-DOR TORÁCICA	<input type="checkbox"/> 7-FEBRE PERSISTENTE > 3 DIAS	<input type="checkbox"/> 11-HIPOTENSÃO
<input type="checkbox"/> 3-CONFUSÃO MENTAL	<input type="checkbox"/> 8-CONFUSÃO MENTAL	<input type="checkbox"/> 12-OUTROS (especificar)
<input type="checkbox"/> 4-FR > 25		

EXAME FÍSICO À INTERNAÇÃO			
Peso: _____ kg	Temp. axilar: _____ °C	P.A.: _____ / _____ mmHg	
FC: _____ bpm	FR: _____ irpm		
	Normal	Alterado	Descrição
Pele			
Oroscopia			
COONG			
Linfonodos			
A.R			
A.C.V			
A.D.			
S.N.			
12- CURB-65			

- CONFUSÃO MENTAL
 URÉIA > 40
 FR > 30
 PAS < 90 OU PAD < 60
 IDADE > 65

PONTOS

RESULTADOS LABORATORIAIS (D3, D5 E D7)

	D0	D3	D5	D7
Data:				
PCR				
PCT				
Leucoc				
Bands(%)				
Neut (no.)				
Linf (no.)				
CK TOT				
LDH				
AST				
BBT				
creatinina				
lactato				
pH				
PaO2				
PaCO2				
HCO3				
BE				
FiO2				

13- RX DE TÓRAX

- 0-SEM ALTERAÇÕES
 1-INFILTRADO LOCALIZADO / CONSOLIDAÇÃO
 2-INFILTRADO DIFUSO
 3-PADRÃO ALVEOLAR
 4-PADRÃO INTERSTICIAL
 5-PADRÃO MISTO
 9-OUTROS ACHADOS: _____

14-TRATAMENTO ANTIVIRAL 1-OSELTAMIVIR 2-ZANAMIVIR 3-NÃO RECEBEU
 DATA INÍCIO TRATAMENTO: ____/____/____

15-TRATAMENTO ANTIMICROBIANO 1-Sim 2- Não

Nome do antibiótico	Data início	Data do fim	Duração* (dias)

*Considerar 1 (um) dia, se recebeu apenas 1 dose.

16-MICROBIOLOGIA

- HEMOCULTURA GERME _____ DATA: ___/___/___
 HEMOCULTURA GERME _____ DATA: ___/___/___
 UROCULTURA GERME _____ DATA: ___/___/___
 UROCULTURA GERME _____ DATA: ___/___/___

 AT GERME _____ DATA: ___/___/___
 AT GERME _____ DATA: ___/___/___
 OUTROS* _____ GERME _____ DATA: ___/___/___

*Especificar:

17-INFECÇÃO NOSOCOMIAL (Se ocorre após 72 horas da inclusão no estudo + adição ou troca de antibióticos)

- 1-SIM 2-NÃO

Primeiro episódio: Diagnóstico _____

Data do início : ___ / ___ / ___

Segundo episódio: Diagnóstico _____

Data do início : ___ / ___ / ___

OUTROS TRATAMENTOS

- 18-INTERNAÇÃO NO CTI OU SALA EMERGÊNCIA: 1-SIM 2-NÃO
 DATA INTERNAÇÃO CTI ___/___/___ DATA INTERNAÇÃO SE ___/___/___
 DURAÇÃO INTERNAÇÃO CTI ___ DIAS DURAÇÃO INTERNAÇÃO SE ___ DIAS
 19-SUPORTE VENTILÓRIO MECÂNICO: 1-VI 2-VNI 0-NSA
 DATA INÍCIO ___/___/___ DATA FIM ___/___/___ DURAÇÃO: _____ DIAS
 20-AMINAS: 0-SEM 1-VASOPRESSORES 2-INOTRÓPICOS 3-AMBOS
 21-HEMODIÁLISE / HEMOFILTRAÇÃO 1-SIM 2-NÃO
 22-CORTICOIDES 1-SIM 2-NÃO
 23- PRONO 1-SIM 2-NÃO
 24- RECRUTAMENTO 1-SIM 2-NÃO

25-DIAGNÓSTICO FINAL

- 1-INFLUENZA H1N1
 2-INFLUENZA SAZONAL
 3-NEGATIVO PARA INFLUENZA
 4-INDETERMINADO

26-COMPLICAÇÕES INFLUENZA

- 1-NSA
 2-PNEUMONIA VIRAL
 3-PNEUMONIA BACTERIANA
 4-DESCOMPENSAÇÃO DOENÇA DE BASE
 9- OUTROS: _____

27-OUTRO DIAGNÓSTICO

- 1-PNEUMONIA COMUNITÁRIA GRAVE
- 2-TUBERCULOSE
- 3-PNEUMOCISTOSE
- 4-DPOC EXACERBADO
- 9-OUTRO

28-ULTIMO SEGUIMENTO --- Data : ___ / ___ / ___

1 -SOBREVIVENTE 0- ÓBITO

29-ÓBITO: 0-SE/PA 1- ENF 2- CTI 3- SOBREVIVENTE

DATA DO OBITO ___/___/___

30- DURAÇÃO INTERNAÇÃO HOSPITALAR (DIAS): _____

31- MORTE ASSOCIADA À INFLUENZA 0 = NÃO; 1 = SIM; 2 = NSA

Apêndice B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido / Paciente

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para o paciente)

Projeto: Estudo dos marcadores inflamatórios na Síndrome Gripal Aguda Grave

Pesquisadores responsáveis

Vandack Alencar Nobre Jr

Fernando Antônio Botoni

Marise Fonseca

Unaí Tupinanambá

Mariana Benevides Santos Paiva

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

A Universidade Federal de Minas Gerais convida o Sr. / a Sra. a participar de uma pesquisa sobre infecções causadas pelo vírus da gripe suína, o Influenza A H1N1. Essa é uma doença nova, da qual se sabe muito pouco. Uma minoria das pessoas que adquirem essa infecção pode apresentar quadro grave. Os médicos não têm como prever quando isso ocorrerá. Assim, os pesquisadores da Faculdade de Medicina da UFMG estão fazendo uma pesquisa para tentar descobrir que se algum exame pode ajudar a identificar os pacientes que terão doença mais grave. Além disso, os pesquisadores tentarão identificar exames que auxiliem na diferenciação entre a infecção pelo vírus e outras infecções parecidas. Esses exames são chamados “marcadores inflamatórios”, e são dosados no sangue.

Pacientes internados no CTI do Hospital das Clínicas da UFMG e no Hospital Risoleta Tolentino Neves (Pronto Socorro de Venda Nova) serão convidados a participar. A proposta da pesquisa é avaliar se as dosagens desses “marcadores inflamatórios” no sangue auxiliam a diferenciar entre uma infecção viral e outras infecções; ou ainda, se auxiliam no acompanhamento desses doentes.

Será armazenada uma amostra de sangue à internação, que foi colhida juntamente com os exames de rotina, dos pacientes que aceitarem participar da pesquisa. Também serão armazenadas amostras de sangue nos dias 3, 5 e 7 após admissão no CTI. O sangue será enviado para o Laboratório do Hospital das Clínicas, onde serão realizadas dosagens dos “marcadores inflamatórios”.

Os resultados deste estudo terão valor para elucidar a história natural da doença causada pelo vírus Influenza A H1N1. Dessa forma teremos mais chance de combatê-lo.

Os procedimentos propostos de coleta de sangue são feitos rotineiramente nos pacientes internados no CTI. A coleta de sangue apresenta riscos mínimos e pode causar:

- hematomas no local de coleta
- infecção no local de coleta

Será armazenado um pouco do soro já colhido rotineiramente no CTI. A retirada desse volume de sangue não traz nenhum risco para o paciente, mesmo se ele estiver gravemente doente.

Os pesquisadores assumem o dever de dar assistência aos participantes da pesquisa para problemas relacionados aos procedimentos citados acima ou mesmo para quaisquer outros problemas da saúde apresentados durante a pesquisa.

Os registros (informações dos pacientes) serão mantidos de forma confidencial com códigos de identificação de acesso limitado e o nome do paciente não será mencionado em nenhum momento.

Eu tenho o direito de recusar ou cancelar o meu consentimento de participação a qualquer instante, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, bastando comunicar a minha decisão aos organizadores da pesquisa.

EU _____,
ENTENDI O QUE ME FOI PROPOSTO E TIVE OPORTUNIDADE DE ESCLARECER MINHAS DÚVIDAS. ESTOU CIENTE E CONSINTO QUE SE ARMAZENE PARTE DO SANGUE COLETADO PARA OS EXAMES DE ROTINA DO CTI, E QUE NESSE SANGUE SEJAM MEDIDOS ALGUNS ELEMENTOS RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO. SEI QUE OS RESULTADOS DO ESTUDO SERÃO MANTIDOS EM SIGILO, PODENDO SER INFORMADOS SOMENTE A MINHA PESSOA. ESTOU CIENTE DE QUE OS RESULTADOS SERÃO PUBLICADOS SOMENTE EM CONJUNTO, NÃO PERMITINDO A IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL.

Belo Horizonte, ___/___/___

Assinatura

Impressão digital (se analfabeto – nesse caso ler o consentimento em voz alta após explicá-lo)

Os telefones abaixo podem lhe ser úteis para esclarecimentos:

Pesquisadores

- 1- Dra. Mariana Benevides Santos Paiva (31) 9166-4685/3879-4685
- 2- Dr. Fernando Antônio Botoni (31) 9984-2674
- 3-Dr. Vandack Alencar Nobre Jr (Hospital das Clínicas): (31) 3309-4195 / 9831-0004

Av. Alfredo Balena, 190 – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100

Comitês de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP: Telefax (31) 3409-4592

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar, sl 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 31270-901

Apêndice C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido / Responsável

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para o responsável pelo paciente)

Projeto: Estudo dos marcadores inflamatórios na Síndrome Gripal Aguda Grave

Pesquisadores responsáveis

Vandack Alencar Nobre Jr

Fernando Antônio Botoni

Marise Fonseca

Unaí Tupinanambá

Mariana Benevides Santos Paiva

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

A Universidade Federal de Minas Gerais convida o Sr. / a Sra. a participar de uma pesquisa sobre infecções causadas pelo vírus da gripe suína, o Influenza A H1N1. Essa é uma doença nova, da qual sabe-se muito pouco. Uma minoria das pessoas que adquirem essa infecção pode apresentar quadro grave. Os médicos não têm como prever quando isso ocorrerá. Assim, os pesquisadores da Faculdade de Medicina da UFMG estão fazendo uma pesquisa para tentar descobrir que se algum exame pode ajudar a identificar os pacientes que terão doença mais grave. Além disso, os pesquisadores tentarão identificar exames que auxiliem na diferenciação entre a infecção pelo vírus e outras infecções parecidas. Esses exames são chamados “marcadores inflamatórios”, e são dosados no sangue.

Pacientes internados no CTI do Hospital das Clínicas da UFMG e no Hospital Risoleta Tolentino Neves (Pronto Socorro de Venda Nova) serão convidados a participar. A proposta da pesquisa é avaliar se as dosagens desses “marcadores inflamatórios” no sangue auxiliam a diferenciar entre uma infecção viral e outras infecções; ou ainda, se auxiliam no acompanhamento desses doentes.

Será armazenada uma amostra de sangue à internação, que foi colhida juntamente com os exames de rotina, dos pacientes que aceitarem participar da pesquisa. Também serão armazenadas amostras de sangue nos dias 3, 5 e 7 após admissão no CTI. O sangue será enviado para o Laboratório do Hospital das Clínicas, onde serão realizadas dosagens dos “marcadores inflamatórios”.

Os resultados deste estudo terão valor para elucidar a história natural da doença causada pelo vírus Influenza A H1N1. Dessa forma teremos mais chance de combatê-lo.

Os procedimentos propostos de coleta de sangue são feitos rotineiramente nos pacientes internados no CTI. A coleta de sangue apresenta riscos mínimos e pode causar:

- hematomas no local de coleta
- infecção no local de coleta

Será armazenado um pouco do soro já colhido rotineiramente no CTI. A retirada desse volume de sangue não traz nenhum risco para o paciente, mesmo se ele estiver gravemente doente.

Os pesquisadores assumem o dever de dar assistência aos participantes da pesquisa para problemas relacionados aos procedimentos citados acima ou mesmo para quaisquer outros problemas da saúde apresentados durante a pesquisa.

Os registros (informações dos pacientes) serão mantidos de forma confidencial com códigos de identificação de acesso limitado e o nome do paciente não será mencionado em nenhum momento.

Eu tenho o direito de recusar ou cancelar o meu consentimento de participação a qualquer instante, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, bastando comunicar a minha decisão aos organizadores da pesquisa.

EU _____,
RESPONSÁVEL PELO PACIENTE,
_____, ENTENDI O QUE ME FOI
PROPOSTO E TIVE OPORTUNIDADE DE ESCLARECER MINHAS DÚVIDAS. ESTOU CIENTE
E CONSINTO QUE SE QUE SE ARMAZENE PARTE DO SANGUE COLETADO PARA OS
EXAMES DE ROTINA DO CTI, E QUE NESSE SANGUE SEJAM MEDIDOS ALGUNS
ELEMENTOS RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO. SEI QUE OS RESULTADOS DO ESTUDO
SERÃO MANTIDOS EM SIGILO, PODENDO SER INFORMADOS SOMENTE A MINHA
PESSOA. ESTOU CIENTE DE QUE OS RESULTADOS SERÃO PUBLICADOS SOMENTE EM
CONJUNTO, NÃO PERMITINDO A IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL.

Belo Horizonte, ___/___/___ _____

Assinatura

Impressão digital (se analfabeto – nesse caso ler o consentimento em voz alta após explicá-lo)

Os telefones abaixo podem lhe ser úteis para esclarecimentos:

Pesquisadores

- 1- Dra. Mariana Benevides Santos Paiva (31) 9166-4685/3879-4685
- 2- Dr. Fernando Antônio Botoni (31) 9984-2674
- 3-Dr. Vandack Alencar Nobre Jr (Hospital das Clínicas): (31) 3309-4195 / 9831-0004

Av. Alfredo Balena, 190 – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100

Comitês de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP: Telefax (31) 3409-4592

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar, sl 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 31270-901

10 ANEXOS

Anexo A. Parecer do comitê de ética em pesquisa da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

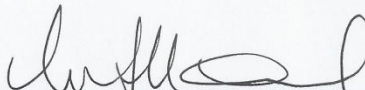
Parecer nº. ETIC 0122.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 05 de maio de 2010, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo dos marcadores inflamatórios na Doença Respiratória Aguda Grave"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo B. Ata da defesa de dissertação.



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 34099640 FAX: (31) 34099641



UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **MARIANA BENEVIDES SANTOS PAIVA**, nº de registro 2010654336. Às quatorze horas do dia vinte e nove do mês de fevereiro de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: "AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DIAGNÓSTICA DA PROCALCITONINA E DA PROTEÍNA C REATIVA EM PACIENTES CRÍTICOS COM SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE E SUSPEITA DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A H1N1 2009", requisito final para a obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde – Infectologia e Medicina Tropical, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Jorge Ibrain Figueira Salluh	Instituição: INCA/RJ	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2012.

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior [Assinatura]

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade [Assinatura]

Prof. Jorge Ibrain Figueira Salluh [Assinatura]

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior/Coordenador [Assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical
Faculdade de Medicina - UFMG

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

Anexo C. Declaração de aprovação



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Vandack Alencar Nobre Júnior, Marcus Vinícius Melo de Andrade e Jorge Ibrain Figueira Salluh, aprovou a defesa de dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DIAGNÓSTICA DA PROCALCITONINA E DA PROTEÍNA C EM PACIENTES CRÍTICOS COM SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE E SUSPEITA DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA H1N1 2009”** apresentada pela mestrand **MARIANA BENEVIDES SANTOS PAIVA** para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 29 de fevereiro de 2012.

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior
Orientador

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Prof. Jorge Ibrain Figueira Salluh